Validation of microscopic diagnosis of malaria in field laboratories of malarious areas of Iran by Nested PCR

A. Shahbazi, PhD [1] A. Raeisi, PhD [2] H. Mirhendi, PhD [3] M. Asgharzadeh, PhD [4] H. Sadeghi Bazargani, MD [5]

Tabriz Research Center of Infectious and Tropical Diseases [1] , Hematology , Oncology Research Center [4] , RDCC Center of Medical School [5] , Tabriz University of Medical Sciences , Tabriz, Iran , Center of Diseases Management Ministry of Health [2] , Assistant Professor [3] , Department of Parasitology and Mycology , School of Public Health , Tehran University of Medical Sciences , Tehran, Iran.

(Received 17 Apr, 2007 Accepted 11 Jan, 2009)

ABSTRACT

Introduction: Examination of Geimsa stained blood smears is the main method of malaria diagnosis in our country, however, accuracy of results is largely depended on the skill and laboratory conditions. This study was designed and carried out to assess the current situation and to determine the effectiveness and quality improvement of malaria diagnosis program.

Methods: In this analytical study, 100 positive blood samples for malaria by microscopic method (85 Plasmodium vivax and 15 Plasmodium falciparum) and 15 negative samples were collected from malarious areas of Iran and processed by Nested PCR to amplify the ssrRNA (small sub-unit ribosomal RNA). Kappa agreement coefficient was calculated by SPSS software.

Results: Except for one case, diagnosis either by microscopic or Nested-PCR was the same. The exception was for one case diagnosed Plasmodium falciparum by microscopic and in agreement method whiteas mix infection (Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum) by Nested-PCR. Agreement coefficient of microscopic and Nested-PCR methods was high.

Conclusion: In contrast to previous studies, high agreement coefficient of microscopic and Nested-PCR methods in this study indicates, the effectiveness of quality improvement of malaria diagnosis program in Iran.

Correspondence:
A. Shahbazi, PhD.
Department of Parasitology School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences.
Tabriz, Iran
Tel: +98 411 3373745
Email:
Shahbazy42@yahoo.com

Key words: Malaria – Plasmodium Falciparum - Plasmodium Vivax – Polymerase Chain Reaction (PCR) - Iran

بررسی صحت تشخیص میکروسکوپی مالاریا در آزمایشگاههای صحرایی مناطق مالاریاخیز ایران با استفاده از روش Nested PCR

دکتر عباس شهبازی [۱] دکتر احمد رئیسی [۲] دکتر حسین میرهندی [۳] دکتر محمد اصغرزاده [۴] دکتر همایون صادقی بازرگانی [۵]

[۱] مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری تبریز، [۴] مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، [۵] مرکز RDCC دانشکده پزشکی تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز [۲] مرکز مدیریت بیماریها، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، [۳] استادیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مجله پزشکی هرمزگان سال سیزدهم شماره سوم پاییز ۸۸ صفحات ۱۷۸-۱۷۲

چکیده

مقدمه: *روش اصلی تشخیص مالاریا در کشور ما، آزمایش گسترش خون محیطی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا است ولی صحت نتایج در این روش به مقدار زیاد بستگی به مهارت و دقت تکنسین آزمایشگاه و شرایط آزمایش دارد. با توجه به انتشار گزارشاتی طی سالهای گذشته مبنی بر اشتباه در تشخیص میکروسکوپی در آزمایشگاههای نظام کنترل مالاریا، این مطالعه با هدف بررسی وضعیت موجود به منظور تعیین میزان اثربخشی برنامه بهبود کیفیت تشخیص مالاریا در کشور طراحی و به اجرا در آمد.*

روش کار: *در این مطالعه تحلیلی، تعداد ۱۰۰ نمونه خون کامل با تشخیص میکروسکوپی اولیه مثبت (۸۵ مورد پلاسمودیوم ویواکس و ۱۵ مورد پلاسمودیوم فالسی پاروم) و ۱۵ نمونه منفی جمع‌آوری شده از مناطق مالاریاخیز با روش Nested PCR بر روی ژن ssrRNA (small sub-unit ribosomal RNA) مجدداً آزمایش گردید و ضریب توافق کاپا توسط نرم‌افزار SPSS محاسبه گردید.*

نتایج: *در کلیه موارد تشخیص اولیه (صرفاً مثبت یا منفی بودن نمونه‌ها) در هر دو روش کاملاً یکسان بودند. یکی از نمونه‌ها با روش میکروسکوپی پلاسمودیوم فالسی‌پاروم و با روش مولکولی عفونت مخلوط (پلاسمودیوم فالسی‌پاروم و پلاسمودیوم ویواکس) تشخیص داده شد و میزان توافق تشخیص میکروسکوپی در آزمایشگاههای مالاریا در مناطق مالاریاخیز کشور با روش PCR در حد عالی طبقه‌بندی گردید.*

نتیجه‌گیری: *عدم تطابق نتایج این مطالعه با مطالعات سالهای گذشته و توافق نتایج دو روش تشخیص میکروسکوپی و مولکولی مالاریا در این مطالعه می‌تواند بیانگر اثربخشی برنامه‌های ارتقاء کیفیت تشخیص میکروسکوپی مالاریا در آزمایشگاههای نظام کنترل مالاریا باشد.*

کلیدواژه‌ها: *مالاریا – پلاسمودیوم فالسیپاروم – پلاسمودیوم ویواکس – واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) – ایران*

نویسنده مسئول:
دکتر عباس شهبازی
گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تبریز
تبریز – ایران
تلفن: ۳۳۷۳۷۴۵ ۴۱۱ ۹۸+
پست الکترونیکی:
Shahbazy42@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۲۸ اصلاح نهایی: ۸۷/۸/۸ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۲۲

مقدمه:

مالاریا یکی از جدی‌ترین بیماریها در کشورهای در حال توسعه است و همه ساله ضررهای جبران‌ناپذیر اقتصادی و اجتماعی را در سطح جهان به بار می‌آورد (۱). اولین استراتژی کنترل مالاریا در برنامهٔ جامع کنترل مالاریای کشور تشخیص دقیق و سریع موارد بیماری می‌باشد (۲). استاندارد طلایی (gold standard) برای تشخیص انگل در خون، هنوز آزمایش گسترش‌های خونی رنگ شده با گیمسا است (۳،۴). این روش در صورتی که توسط فرد متبحر و آموزش دیده بکار گرفته شود دارای فوایدی است منجمله، تمایز گونه‌های انگل، تمایز مراحل تکاملی انگل، تشخیص تغییرات مورفولوژیک انگل، تعیین تعداد انگل در خون (parasitemia) و امکان ذخیرهٔ نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده بمنظور انجام مراحل کنترل کیفیت (۵). اگرچه انجام این روش راحت است و نیاز به تجهیزات گرانقیمت و پیچیده ندارد ولی دارای معایبی نیز هست که از جملهٔ آنها می‌توان به حساسیت نسبتاً کم آن (توانایی تشخیص ۱۰-۵۰ انگل در هر میکرولیتر خون) اشاره کرد که ناشی از عواملی همچون میزان تبحر تکنسین آزمایشگاه و کیفیت مواد مورد استفاده می‌باشد (۹-۶).

از بین روشهای متعددی که بعنوان جایگزین روش تشخیص میکروسکوپی انگل در گسترش‌های خونی معرفی شده‌اند روش تشخیص مولکولی Nested PCR با استفاده از ۴ پرایمر برای ژن (small sub-unit ribosomal RNA) ssrRNA بعنوان روشی حساس با ویژگی مناسب برای تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم (پلاسمودیوم فالسی‌پاروم، پلاسمودیوم ویواکس، پلاسمودیوم مالاریه و پلاسمودیوم اووال) در سال ۱۹۸۹ معرفی گردید که از آن سال تاکنون در اکثر مطالعات مولکولی تشخیص مالاریا از این روش و پرایمرهای مذکور استفاده می‌گردد (۱۰،۱۱).

در ایران نیز همچون سایر کشورها تشخیص میکروسکوپی انگل در گسترش‌های خونی روش پایه برای تشخیص مالاریا است. در سال ۱۳۸۵ حدود ۲۰۰۰۰ مورد مالاریا در کشور گزارش گردید که کلیهٔ آنها با روش مذکور تشخیص داده شده‌اند (۱۲). با توجه به انتشار گزارشاتی مبنی بر میزان بالای اشتباه در تشخیص میکروسکوپی مالاریا در ایران در سالهای اخیر (۱۵-۱۳)، این مطالعه جهت به روز نمودن اطلاعات قبلی بدنبال اقدامات انجام شده در جهت رفع مشکل از سوی نظام سلامت کشور طراحی و به اجرا در آمد.

روش کار:

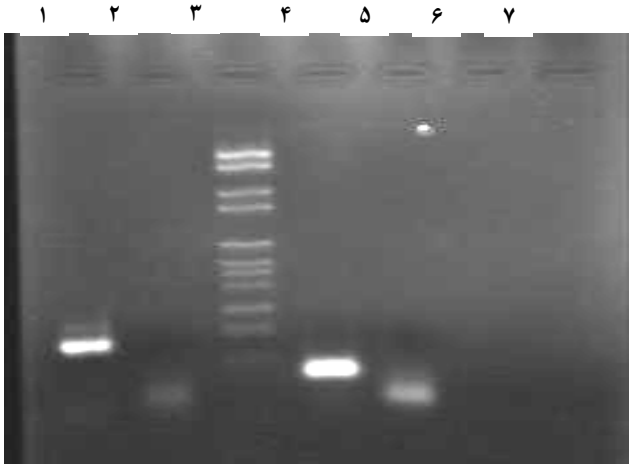
در این بررسی تعداد ۱۰۰ نمونهٔ خون کامل با تشخیص میکروسکوپی اولیهٔ مثبت (۸۵ مورد پلاسمودیوم ویواکس و ۱۵ مورد پلاسمودیوم فالسی‌پاروم) همراه با ۱۵ نمونهٔ منفی از مناطق مالاریاخیز استانهای سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان و بوشهر جمع‌آوری شد. از آنجا که این نمونه‌ها به منظور دیگری جمع‌آوری شده بودند هیچگونه دقت اضافی در تشخیص اولیه از سوی میکروسکوپیست‌ها در فیلد صورت نگرفت. کلیهٔ نمونه‌ها در محلول EDTA با حفظ زنجیرهٔ سرما به آزمایشگاه مرکزی منتقل و در دمای ^{c}۲۰° - درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات مربوطه نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از کیت QIAamp (Cat. No.51104) ساخت آمریکا خریداری شده از شرکت زیست باران استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر DNA در روش Nested PCR (۱۱) در جدول شماره ۱ توصیف شده‌اند. در مرحلهٔ اول PCR پرایمرهای rPLU5 و rPLU6 و در مرحلهٔ دوم برای تشخیص گونهٔ پلاسمودیوم فالسیپاروم از پرایمرهای rFLA1 و rFLA2 و برای تشخیص گونهٔ پلاسمودیوم ویواکس از پرایمرهای rVIV1 و rVIV2 استفاده شد. شرایط ترموسایکلر برای تکثیر قطعات موردنظر عبارت بود از واکنش اولیه در ^{c}° ۹۴ بمدت ۳ دقیقه در یک سیکل، ^{c}°۹۴ بمدت ۶۰ ثانیه، ^{c}°۵۶ بمدت ۲ دقیقه و ^{c}° ۶۸بمدت ۲/۵ دقیقه در ۳۰ سیکل و در نهایت به مدت ۷ دقیقه در حرارت ^{c}°۲۷ استفاده شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ برای تشخیص گونه با آغشته نمودن به اتیدیوم بروماید در بافر TBE الکتروفورز گردید و سپس به کمک دستگاه UV مشاهده شدند. از نمونه‌های نگهداری شده در مخزن آزمایشگاه مالاریاشناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و نمونه‌های پرانگل فیلدی جهت کنترل مثبت و از خون افراد سالم مناطق عاری از مالاریا بعنوان شاهد منفی استفاده شد. ضریب توافق کاپا بعنوان روش اصلی آنالیز در نظر قرار گرفته شد که توسط نرم افزار SPSS محاسبه گردید.

نتایج:

کلیهٔ نمونه‌هایی که تشخیص اولیهٔ میکروسکوپی آنها مثبت بود در آزمایش Nested PCR نیز مثبت تشخیص داده شدند. تنها در یک مورد که تشخیص اولیه پلاسمودیوم فالسی‌پاروم بود، در روش Nested PCR عفونت میکس (عفونت توأم پلاسمودیوم فالسیپاروم و پلاسمودیوم ویواکس) تشخیص داده شد (تصویر شماره ۱). از لحاظ نوع انگل نیز تفاوتی در تشخیص اولیهٔ میکروسکوپی و روش Nested PCR مشاهده نشد. هر ۱۵ نمونه با تشخیص اولیهٔ منفی با روش مولکولی نیز منفی شدند.

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده شده جهت تشخیص پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم با غلظت استفاده شده و طول محصول PCR

	نام	توالی	غلظت پرایمرها	طول محصول
جنس	rPLU5	5'-CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3	۱/۲۸ µm	۱۲۰۰bp
پلاسمودیوم	rPLU6	5'- TAA AAA TTG TTG CAG TTA CG-3	۱/۰۴ µm	
گونه	rFAL1	5'- TTA ACC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3	۰/۷۶ µm	۲۰۵bp
فالسیپاروم	rFAL2	5'- ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3	۰/۸ µm	
گونه	rV1V1	5'- CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAA TGA TAC-3	۰/۷۲ µm	۱۲۰bp
ویواکس	rV1V2	5'- ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3	۰/۵۲ µm	



شکل شماره ۱- ستون یک حاوی نمونه پلاسمودیوم فالسیپاروم با باند حدود طول ۲۰۵bp، ستون دو حاوی نمونه منفی با تشخیص میکروسکوپی، ستون پنج حاوی نمونه شاهد منفی، ستون چهار حاوی نمونه پلاسمودیوم ویواکس با باند حدود ۱۲۰bp و ستون سه حاوی مارکر ۶ (Rosche) است

با روش PCR نمونه‌های شاهد مثبت همگی مثبت و نمونه‌های شاهد منفی همگی منفی شدند. با توجه به نوع نمونه‌گیری بعمل آمده از آنجا که تعداد نمونهٔ مثبت و منفی از توزیع طبیعی در جامعه تبعیت نمی‌کند (که بدلیل محدودیت مالی و اجرایی طرح بوده است). محاسبهٔ ارزش اخباری مثبت و منفی تست قابل انجام نبود، لذا محاسبهٔ ضریب توافق کاپا بعنوان روش اصلی آنالیز مدنظر قرار گرفته است که بر اساس اطلاعات بدست آمده (جدول شماره ۲) در هر یک از حالات با توجه به محاسبات انجام شده میزان توافق در حد عالی قابل طبقه‌بندی است.

جدول شماره ۲- میزان توافق دو روش میکروسکوپی در آزمایشگاههای مالاریای مناطق مالاریاخیز کشور و Nested PCR در تشخیص عفونت و نوع انگل مالاریا

فعالیت	ضریب کاپا	خطای معیار	بازده اطمینان ۹۵٪
تشخیص عفونت در موارد مثبت	۱	-	-
تشخیص نوع انگل	۰/۹۶۱	۰/۰۴	۱-۸۸۵٪
تشخیص همزمان عفونت و نوع انگل	۰/۹۷۹	۰/۰۲	۱-۹۳۹٪

بحث و نتیجه‌گیری:

کشف سریع موارد مالاریا در کمتر از ۴۸ ساعت پس از بروز علائم نخستین، مهمترین استراتژی برنامهٔ جامع کنترل مالاریا در ایران است (۲). در حال حاضر بخش عظیمی از منابع (انسانی و غیرانسانی) برنامهٔ کنترل مالاریا صرف خدمات تشخیصی می‌گردد که تقریباً بطور کامل مبتنی بر تشخیص میکروسکوپی انگل در گسترش‌های خونی است (۲). بدیهی است در چنین شرایطی صحت و دقت تشخیص میکروسکوپی اهمیت قابل ملاحظه‌ای در اثربخشی برنامهٔ

پرهزینهٔ کنترل مالاریا پیدا کرده است. تشخیص میکروسکوپی مالاریا همچنان بعنوان روش اصلی تشخیص آزمایشگاهی مالاریا باقی مانده است، اما این روش نقاط ضعفی هم دارد. مطالعه‌ای در انگلستان نشان داد که حدود ۱۰٪ لامها در این روش به اشتباه تشخیص داده می‌شوند (۱۶). بر اساس راهنماهای موجود حد اقل ۲۰۰ میدان گسترش ضخیم خون قبل از گزارش منفی بودن باید بررسی شود که این کار به حدود ۱۰-۵ دقیقه زمان توسط یک میکروسکوپیست متبحر نیاز دارد (۱۷،۱۸) و اگر تنها گسترش نازک بررسی شود به حدود ۴۵-۳۰ دقیقه زمان نیاز است تا به حد تشخیص گسترش ضخیم برسد (۱۹). در شرایط مناسب روش میکروسکوپی می‌تواند ۵۰-۱۰ انگل را در هر میکرولیتر خون تشخیص دهد، اما این حساسیت بندرت در آزمایشگاهها قابل تحقق است و عوامل زیادی منجمله آموزش ناکافی میکروسکوپیست، فقدان مواد و تجهیزات با کیفیت مناسب و رنگ‌آمیزی و مشاهدهٔ تعداد زیادی لام خونی در زمان کوتاه بطور چشمگیری احتمال خطای تشخیصی را افزایش می‌دهند (۷). در حال حاضر روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR بالاترین میزان حساسیت و ویژگی را برای تشخیص انگلهای مالاریا دارند (۱۹). روش PCR توانایی تشخیص تعداد یک انگل در میکرولیتر خون یا پارازیتمی معادل ۰/۰۰۰۰۲ درصد یا یک انگل در ۴۰۰ میدان میکروسکوپ را دارد که پنج برابر قدرت تشخیص میکروسکوپی گسترش‌های ضخیم با رنگ‌آمیزی گیمسا است (۲۰). روش PCR کاملاً اختصاصی نیز هست و نه تنها گونهٔ انگل بلکه تنوع ژنتیکی بین و یا داخل جمعیت‌ها را نیز می‌تواند مشخص نماید (۲۰). متأسفانه اخیراً در منابع علمی میزان چشمگیر اشتباه در تشخیص انگل و اشتباه در تشخیص عفونت میکس مالاریا در ایران گزارش گردیده است (۱۵-۱۳). هرچند که اشتباه در تشخیص میکروسکوپی مالاریا در حد حساسیت و ویژگی این روش همچون سایر روش‌های تشخیصی قابل انتظار است ولی میزان بالای اشتباه در تشخیص گذشته از اینکه زنگ خطری برای برنامهٔ کنترل مالاریا است، اعتبار بین‌المللی برنامه کنترل مالاریای ایران را نیز می‌تواند زیر سؤال ببرد. ابراهیم‌زاده و همکاران میزان اشتباه در تشخیص انگل را در کشور ۴۳٪ و اشتباه در تشخیص عفونت میکس را حدود ۲۷٪ دانسته‌اند (۱۴). همچنین ذاکری و همکاران نیز میزان اشتباه در تشخیص انگل را در مناطق مالاریاخیز کشور حدود ۳۴٪ و اشتباه در تشخیص عفونت میکس را حدود ۲۶٪ گزارش نمودند (۱۵)، در حالی که در مطالعهٔ حاضر نتایج دو روش PCR و تشخیص میکروسکوپی در نظام کنترل مالاریا در حد عالی و بر هم منطبق بود. در جدول شماره ۲ ضریب کاپای ۱ برای تشخیص عفونت و ۹۶۱/. برای تشخیص نوع انگل و تنها ۱٪ اشتباه در تشخیص عفونت میکس به روش میکروسکوپی مشاهده شد و البته فراوانی یک درصدی عفونت میکس که در روش مولکولی بدست آمد مطابق با اطلاعات نظام جاری آماری کشور می‌باشد (۱۲). ضعف روش میکروسکوپی در تشخیص عفونت توأم (Mix) و توانایی روش PCR در تشخیص این موارد (تا حد ۱۴٪) در سایر مطالعات نیز گزارش شده است که عمدتاً ناشی از کم دقتی و تعجیل میکروسکوپیست در گزارش مورد مثبت می‌باشد (۲۱،۲۲). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه و همچنین مطالعهٔ دیگری که در منطقهٔ کهنوج واقع در استان کرمان انجام شده است (۲۳)، دقت تشخیص میکروسکوپی مالاریا در آزمایشگاههای صحرایی مالاریا در مناطق مالاریاخیز کشور قابل قبول است. بدیهی است که عدم تطابق نتایج مطالعهٔ حاضر با مطالعات سالهای گذشته نمی‌تواند الزاماً به معنی کم‌دقت بودن یکی از آنها باشد، چرا که حدوداً از سال ۱۳۸۳ ادارهٔ کنترل مالاریای مرکز مدیریت بیماریها در وزارت بهداشت با همکاری دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران دهها دورهٔ بازآموزی تشخیص میکروسکوپی مالاریا در سطوح مختلف آزمایشگاهی بخصوص در مناطق مالاریاخیز کشور برگزار نموده و همچنان نیز برگزار می‌نمایند که نتایج حاصله در این مطالعه می‌تواند گویای اثربخشی مداخلات مذکور باشد.

محدودیت عمدهٔ این مطالعه عدم تبعیت توزیع تعداد نمونه‌های مثبت و منفی مطالعه شده از توزیع طبیعی در جامعه است که ناشی از محدودیتهای مالی و اجرایی طرح بوده است که امید است در مطالعات آینده این محدودیت برطرف گردد.

در نهایت با توجه به اهمیت حیاتی تشخیص صحیح مالاریا نیاز به اجرای برنامه‌های آموزش مداوم میکروسکوپیستها و مجهز نمودن آزمایشگاههای رفرانس در استانها به روشهای مولکولی و آموزش کارشناسان آن

مراکزجهت پایش و کنترل مداوم و مدون کیفیت تشخیص میکروسکوپی مالاریا کاملاً احساس می‌شود.

سپاسگزاری:

از کلیهٔ اساتید و همکارانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند بویژه آقای دکتر منصور رنجبر و سرکار خانم لیلا فرجی در ادارهٔ کنترل مالاریا وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و آقایان ساکنی، یریان، صفاری و دارابی از استانهای مالاریاخیز، سطوت از دانشکدهٔ پزشکی و سرکار خانم عباسپور از دانشکدهٔ پزشکی تبریز صمیمانه قدردانی می‌کنیم. این مطالعه با حمایت مالی ادارهٔ کنترل مالاریای مرکز مدیریت بیماریها به اجرا در آمد.

References منابع

1. Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim DW, Chung WC. Analysis of polymorphic regions of Plasmodium vivax Duffy binding protein of Korean isolates. *Korean J Parasitol.* 2001;39:143-150.
2. Raeisi A, Shahbazi A, Ranjbar M, Shoghli A, Vatandoust H, Faraji L. Comperhensive malaria control program (I.R.Iran 2004-2008). 1st ed. Tehran:Nasher Seda;2004. [Persian]
3. Hänscheid T. Diagnosis of malaria: 1st ed: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol*. 1999;21:235–245.
4. Warrell DA, Gilles HA, Gilles HM. Essential Malariology. 4th ed. London: Hodder Arnold; 2002.
5. World Health Organization (WHO). New Perspectives: Malaria diagnosis. Report of a joint WHO/USAID informal consultation. Geneva: WHO 2000.
6. Bruce-Chwatt LJ. Essential malariology. 2nd ed. London: William Heinemann; 1985.
7. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binka F, et al. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:564-573.
8. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ*. 1988;66:621-626.
9. World Health Organization (WHO). Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84(suppl 2):1-65.
10. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;58:283-292.
11. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensivity of detection of human malaria parasites by the use of nested Polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61:315-320.
12. Annual report of Disease Management center of MOH of I.R.Iran. Tehran: Ministry of Health and Medial Education; 2006.
13. Zakeri S, Mamaghani S, Mehrizi AA, Shahsavari Z, Raeisi A, Arshi S, et al. Molecular evidence of mixed P. vivax and P. falciparum infections in northern Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*. 2004;10:336-342.
14. Ebrahimzadeh A, Fouladi B, Fazaeli A. High rate of detection of mixed infections of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum in South-East of Iran, using nested PCR. *Parasitol Int*. 2007;56:61–64.
15. Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. *Malar J*. 2002;1:2.

16. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol*. 1994;47:740–742.

17. Bain BJ, Chiodini PL, England JM, Bailey JW. The laboratory diagnosis of malaria. *Clin Lab Haematol*. 1997;19:165–170.

18. Warhurst DC, Williams JE. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol*. 1996;49:533–538.

19. Dowling MA, Shute GT. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull World Health Organ*. 1996;34:249–267.

20. Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franco AS, Snounou G, do Rosario VE. Plasmodium sp: Optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (Anopheles sp.) samples. *Exp Parasitol*. 2000;94:269-272.

21. Rodulfo H, De Donato M, Mora R, González L, Contreras CE. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:535-543.

22. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed Plasmodium falciparum and P.vivax infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86:609-612.

23. Haghdoost AA, Mazhari S, Bahadini K. Comparing the results of light microscopy with the results of PCR method in the diagnosis of Plasmodium vivax. *J Vector Borne Dis*. 2006;43:53-57.