

새로운 Real Time PCR 방법을 통한 *Malaria(Plasmodium vivax)*의 검출

기연아 · 김소연*

동국대학교 화학과

Novel Real Time PCR Method for Detection of *Plasmodium vivax*. Ki, Yeon Ah and Soyoun Kim*.
Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul, 100-715, Korea - Malaria is a re-emerging infectious disease that is spreading to areas where it had been eradicated, such as Eastern Europe and Central Asia. To avoid the mortality from malaria, early detection of the parasite is a very important issue. The peripheral blood smear has been the gold standard method for the diagnosis of malaria infection. Recently, several other methods have been introduced for quantitative detection of malaria parasites. Real time PCR that employs fluorescent labels to enable the continuous monitoring of PCR product formation throughout the reaction has recently been used to detect several human malaria parasites. 18S rRNA sequences from malaria parasites have been amplified using Taqman real time PCR assay. Here, a SYBR Green-based real time quantitative PCR assay for the detection of malaria parasite-especially, *Plasmodium vivax* - was applied for the evaluation of 26 blood samples from Korean malaria patients. Even though SYBR Green-based real time PCR is easier and cheaper than Taqman-based assay, SYBR Green-based assay cannot be used because 18S rRNA cannot be specifically amplified using 1 primer set. Therefore, we used DBP gene sequences from *Plasmodium vivax*, which is specific for the SYBR Green based assays. We amplified the DBP gene from the 26 blood samples of malaria patients using SYBR Green based assay and obtained the copy numbers of DBP genes for each sample. Also, we selected optimal reference gene between ACTB and B2M using real time assay to get the stable genes regardless of Malaria titer. Using selected ACTB reference genes, we successfully converted the copy numbers from samples into titer, # of parasites per microliter. Using the resultant titer from DBP based SYBR Green assay with ACTB reference gene, we compared the results from our study with the titer from Taqman-based assay. We found that our results showed identical tendency with the results of 18S rRNA Taqman assay, especially in lower titer range. Thus, our DBP gene-utilized real time assay can detect *Plasmodium vivax* in Korean patient group semi-quantitatively and easily.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, quantitative real time PCR, SYBR Green-based real time assay

말라리아는 세계적으로 매우 중요한 감염성 질병 중의 하나로 *Plasmodium* 이라는 원충이 anopheles 모기에 의해 사람의 적혈구에 기생하여 생기는 열성 질환이다. 세계인구의 약 50%가 말라리아 위험지역에 노출되어 있으며 매년 3~5억 명이 감염되고 약 200만 명이 이로 인해 사망한다고 한다. 따라서 인류 보건상 말라리아의 중요성은 다시 강조할 필요가 없으며 최근에는 여행을 통해 이러한 기생충이 만연된 지역을 다녀오는 등의 이유로 말라리아 환자가 증가되고 있고, 최근 우리나라에도 다시 발생하고 있어 더욱 문제가 되고 있다[16, 17]. 사람에게 기생하는 *Plasmodium*에는 *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*의 4가지가 있다[16]. 그 중 우리나라에서 발생하는 말라리아는 모두 *Plasmodium vivax*에

의한 것으로[14, 19], 감염층에 따라 적절히 치료하지 않으면 목숨을 위협한다는 점에서 정확한 진단이 중요하다. 특히, 말라리아 감염자가 발병하기까지의 잠복기는 길게 1년까지도 될 수 있어 잠복기의 환자가 헌혈 등의 경로로 다른 사람에게 전염시킬 수 있어 조기에 말라리아 감염을 확인 할 수 있는 신뢰성 높은 진단법이 필요하다[16].

혈액 도말법[12], 항체 검출법[18], 분자생물학적 검출법[2] 등이 말라리아 원충을 탐지, 검출하는데 사용되고 있다. 그 중 혈액 도말법은 말라리아 진단에 가장 많이 사용되는 방법으로 사람에게서 말라리아를 일으키는 기생충들의 감염 단계를 구별할 수 있는 숙련된 실험자에 의해서만 정량이 가능하다[13]. 그러므로 전문인력을 필요로 하고[15], 다양한 말라리아 종의 감염이나, 약물 치료 이후, 또는 정확한 진단을 위해서 긴 관찰 시간이 필요한 경우 등 혈액 속의 기생충의 농도가 낮은 경우에 민감도가 감소하고[22] 또한, 말라리아 질병이 만연된 지역에서 항상 사용할 수 없다는 단점을 가지고 있다[7]. PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법

*Corresponding author
Tel: 82-2-2260-3840, Fax: 82-2-2268-8204
E-mail: skim@dongguk.edu

은 혈액 샘플(약 25 μ l) 당 1개의 기생충을 탐지 하지만 [24] 기생충의 정확한 정량에는 어려움이 있고 위양성을 보일 수 있다는 단점을 가지고 있다[4, 6, 9].

본 연구의 목적은 정량적인 말라리아 검출 방법이면서 보다 간편하고 경제적이면서 민감도와 특이도가 높은 검출 방법을 개발하는데 있다. 이를 위해서 정량적인 real time PCR 방법을 사용하게 되었다. Real time PCR assay는 대표적으로 Taqman based- 와 SYBR Green based-real time PCR assay가 있다. Taqman based-real time PCR은 Taq polymerase의 5' exonuclease activity를 이용한 것으로 Taqman probe가 이 activity에 의해 PCR product가 생기면서 형광을 나타내게 되는 방법으로 2개의 primer와 1개의 특수 제작한 Probe를 이용하는데 이것은 보다 정량적이지만 고비용이어서 임상적으로 많은 환자에 적용하는데 문제가 있을 수 있다. SYBR green based real time PCR은 SYBR Green이라는 fluorescent dye가 생성되는 PCR product 사이에 끼어 들어가면서 지속적으로 확인할 수 있는 방법으로 2개의 공통적인 일반적인 primer 제작하여 쉽고 저비용으로 정량적으로 검출 할 수 있는 방법이다[3]. 기존 말라리아 정량적 검출을 위한 연구에서는 18S rRNA를 사용하였는데 이 18S rRNA는 반복적으로 나타나기 때문에 2개의 primer 만으로는 특이적으로 증폭이 안되어 1개의 추가 probe를 이용하는 고비용인 Taqman based-assay 만을 사용할 수 있었다. 이러한 점을 개선하여 저비용이고 간편한 검출법을 개발하기 위하여, 본 연구에서는 DBP 유전자를 사용하여 2개의 저비용 primer 만을 사용하는 SYBR Green based-assay을 시도하였다. DBP(Duffy Binding Protein)는 사람의 적혈구에 있는 Duffy glycoprotein receptor에 대한 ligand로 알려져 있는데 [1] real time PCR 방법으로 말라리아를 검출 하는 데는 최초로 사용 된 것이다[16]. 또한 정량적인 SYBR Green based-assay을 수행하기 위해서는 좋은 Reference 유전자의 선정에 필요한데 [9], 말라리아 환자의 혈액 샘플에서 환자의 상태에 따른 변화가 적은 유전자를 선정하기 위해서 real time PCR assay을 사용하여 선정하였고 이렇게 얻어진 말라리아의 정량적인 결과를 기존의 Taqman assay와 비교하여 본 연구에서 개발한 검출 방법의 유용성을 검증하였다.

재료 및 방법

Preparation of DNA samples

한국인 26명의 말라리아 환자 혈액(고대 구로 병원)에서 genomic DNA을 분리 정제 하였고, 이 DNA는 4°C에 보관하여 PCR assay에 사용되었다. 이렇게 분리 정제된 각각의 샘플을 기존의 분석 방법을 사용하여 titer(μ l당 말라리아 원충의 개수)를 측정하였고 측정된 titer에 따라 3개의 그룹으로 나누었다. Group I은 titer 5이상인 샘플 8개, Group II는

titer 1이상인 샘플 8개, Group III는 titer 1 이하인 샘플 10개이다.

Oligonucleotides

PCR에 사용한 primer는 DBP의 경우는 Forward: 5'-agaatggggaagggtacg-3' Reverse: 5'-tcattctcaaaagccacct-3'이고 Reference의 경우 [10]는 두개의 유전자로 ACTB(β -actin)의 경우는 Forward: 5'-ctggaacggtgaaggtgac-3'이고 Reverse: 5'-aaggactctctgtaacaatgc-3'이고 B2M(β -2-microglobulin)의 경우는 Forward: 5'-aaggactctctgtaacaatgc-3'와 Reverse: 5'-tctctgctccccacctctaag-3'이다.

PCR(Polymerase Chain Reactions)

샘플을 real time PCR 하기 전에 PCR 조건을 찾아 증폭 산물을 확인하기 위하여 먼저 PCR을 수행하였다. PCR 반응액은 1 μ l의 DNA, 5U Taq DNA polymerase (TaKaRa), 10 μ l의 10X buffer(100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 각 4 μ M의 primer, 10 mM dNTP를 넣고 최종 반응용액의 부피를 100 μ l로 조절 하였다. DNA thermal cycler(Eppendorf, Germany)를 사용하여 94°C에서 5분간 초기 denaturation을 행하고, 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 확인 하였다(data는 나타내지 않음).

SYBR Green Based-Real time PCR 환자 샘플의 genomic DNA template와 primer를 2X Quanti Tect% SYBR, Green PCR Master Mix(Qiagen, Germany)와 혼합하였고 Rotor Gene% real time PCR machine(Corbett research, Australia)을 사용하여 40회 반복하였다. 제작회사 매뉴얼에 따라서 standard를 제작하여 copy number를 알고 있는 standard sample($10^5 \sim 10^8$ copies)을 준비하여 real time PCR을 환자 샘플들과 동시에 수행하여 Rotor Gene program에 의해 환자 샘플의 copy number를 계산하였다. 샘플양의 변이를 보정해 주는 Reference 유전자로는 ACTB(β -actin)과 B2M(β -2-microglobulin)을 사용하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 새로운 말라리아 원충의 검출방법 및 조기 진단법을 개발하기 위해 real time PCR을 사용하였고, 이미 개발된 Taqman based-real time PCR 방법에서 사용한 18S rRNA 대신에 DBP 유전자를 사용하였다. 말라리아를 진단하기 위해 여러 PCR 방법들이 보고 되었으며 대부분 기생충의 18S single strand rRNA 유전자 검출을 사용하여 진단한다[5, 8, 20, 21, 23]. 그러나, 18S rRNA는 반복적인 유전자로 일반적인 PCR에서는 연속적으로 두쌍의 PCR

primer을 사용하는 Nested PCR 기법을 이용해야 하며, real time PCR assay에서는 한쌍의 primer 뿐만 아니라 1개의 특수 labeling 된 probe을 사용하는 Taqman Assay을 사용하여야 한다. 그렇지 않으면 말라리아에서 반복되지 않는 특정 크기의 Primer 쌍을 design 하기 어렵기 때문에 특정 크기의 PCR 산물을 얻기 힘들고, 이에 따라 정량적인 실험을 하기 어렵다. 우리는 추가적으로 사용되어야 하는 고가의 Probe 사용 없이 real time PCR을 진행하기 위해서 SYBR Green-base Real time PCR assay을 사용하였고 이것을 사용하기 위해 DBP 라는 새로운 유전자를 증폭 하도록 한쌍의 primer 를 design 하였다(재료 및 방법 참조). DBP(Duffy Binding Protein)는 말라리아에만 있는 유전자로서 말라리아로 하여금 적혈구에 잘 침투하도록 해주는 역할을 하여 기생생활을 용이하게 해주는데 real time PCR을 이용한 정량적 검사에는 본 연구에서 처음 사용되는 것이다[11].

총 26명의 말라리아 환자의 혈액으로부터 분리 정제된 genomic DNA를 이용하여 SYBR Green-based real time quantitative PCR assay를 수행하였다. DBP 유전자가 real time PCR cycle 숫자가 증가 할수록 그 양이 증폭되는 것

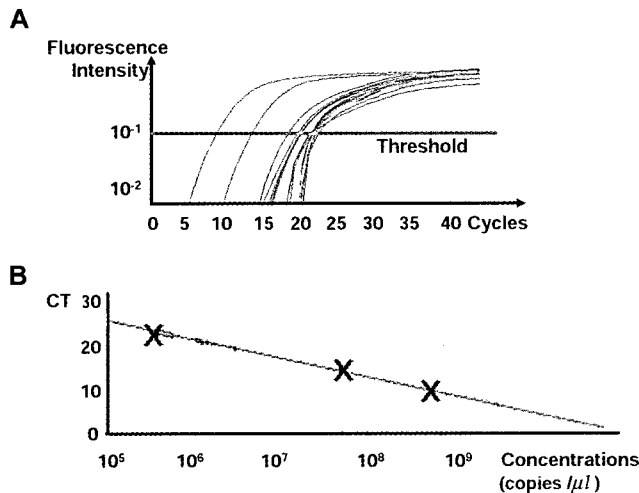


Fig. 1. Quantification of DNA Samples from 26 Malaria Patients using DBP Gene. **A.** Using SYBR Green based-real time assay (see Materials and Methods for details), this shows the amplification curve of DBP genes as log scales (X axis: number of cycles, Y axis: intensity signals of fluorescence from the intercalated SYBR Green dyes). Threshold line indicates the level of detection for quantification and the threshold line is set in the exponential phase of the amplification for the most accurate reading. Each graph indicates each assay using 26 Malaria patient samples and 4 standard samples. The CT values in B were calculated by linear function of the values met in threshold and log curves (Rotor Gene Program). **B.** DBP copy number of samples shows linear function ($R^2=0.99726$) by plotting the mean CT values and copy numbers of standard samples with known copy numbers (10^5 , 10^7 , 10^8 copies). X marks in the line indicate the copy numbers of standard samples. Other dots indicate the samples of interests. The copy numbers of 26 Malaria samples were in the range between 10^5 and 10^7 .

을 SYBR Green fluorescence intensity가 증가 됨으로 볼 수 있었고 그 증폭 되는 양이 증폭되는 초반 cycle(5-15)에는 정량적으로 증가하나 cycle 수가 증가 할수록 그 양이 점점 수렴되고 직선적이지 않음을 볼 수 있었다(Fig. 1A). Fluorescent signal을 정량화 하기 위해서 가장 직선적으로 DBP 유전자의 양이 증가 하는 부분을 ‘Threshold’라고 하여 Fig. 1A에서 보는 바와 같이 잡고 각각 샘플의 fluorescence intensity 그래프와 만나는 점을 CT 값으로 변환하였다 (Fig. 1B). 이때, 실험 초반부터 μl 당 copy number 를 알고 있는 standard sample(10^5 ~ 10^8)을 사용하여 Fig. 1B의 X축의 값 (X marks in the Fig. 1B)으로 변환 하였다. 이 과정은 software program(Rotor Gene)을 이용하여 real time PCR 과정이 끝난 후 진행 되었고, 이를 바탕으로 Fig. 1B에서 보는 바와 같이 샘플의 titer 들이 10^5 에서 10^7 사이에 모여 있는 것을 볼 수 있었다.

이 정량화 된 copy number 을 실제 임상적으로 사용되는 titer(μl 샘플 당 들어 있는 말라리아 원충수)로 전환하기 위해서는 reference 유전자를 이용하여야 한다. 이때 human 샘플에서 흔하게 사용되는 reference 유전자로는 ACTB(β -actin)와 B2M(β -2-microglobulin)[9] 등으로 우리는 말라리

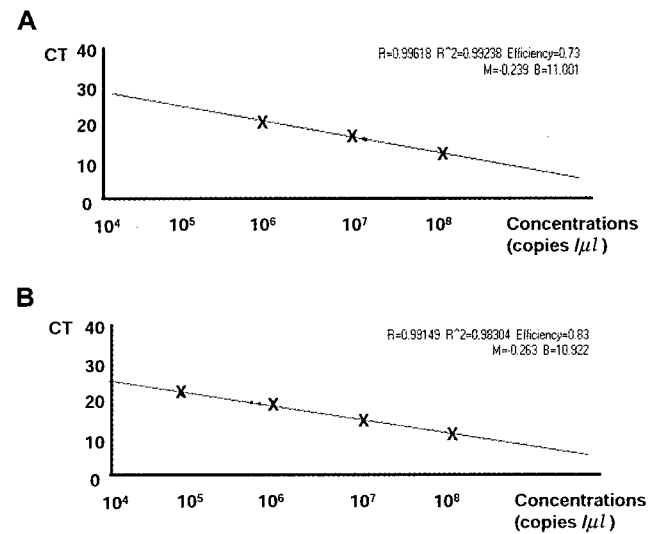


Fig. 2. Quantification of 2 selective reference genes. **A. ACTB** and **B. B2M.** To get the accurate quantification results using real time PCR assay, it is important to use correct reference gene to convert the copy numbers of samples to titers with clinical meaning. Here, we used two reference gene candidates, ACTB and B2M to evaluate the stability between Malaria samples. We used 2 high and low titer Malaria samples for SYBR green based-real time assay with 2 genes, ACTB (**A**) and B2M (**B**). X marks indicate the copy numbers from known standard copy numbers. Other two dots indicate the 2 Malaria samples. For ACTB gene in **A**, two samples did not show much difference in copy numbers. For B2M gene in **B**, two samples showed a little difference in copy number. Therefore, ACTB gene showed more stable expression than B2M. Then, ACTB gene was used for reference gene for conversion the copy number in Fig.1 into titer (# of Malaria parasite).

아 질환에 따라 변이가 적은 더 좋은 reference 유전자를 찾기 위해서 SYBR Green-based real time PCR 을 이용하였다. 우선 임상적으로 titer 차이가 많이 나는 말라리아 환자 샘플 2개를 이용하여 각각 ACTB과 B2M의 primer 쌍(재료 및 방법 참조)을 이용하여 각각 reference 유전자를 증폭하였다. 이렇게 증폭된 결과를 CT 값으로 변경시켜 그 값의 차이를 ACTB 에 대해서는 Fig. 2A, B2M에 대해서는 Fig. 2B에 표시 하였다. ACTB 유전자의 경우는 말라리아 titer 가 10배 이상 차이가 나는 샘플을 사용했음에도 ACTB 자체 유전자의 변화는 거의 없음을 볼 수 있었고, 같은 샘플에 대해서 B2M은 차이를 조금 보였다. 그러므로 ACTB가 말라리아 질환에 대해서는 더 좋은 reference 로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 그러므로 ACTB 유전자를 reference 유전자로 26개 모든 샘플에 대해서 real time PCR을 실시 하였고 그 결과를 Fig. 1의 copy number에 적용하여 실제 titer 로 보정하였다(Rotor Gene Software).

본 연구에서는 real time PCR assay에 DBP라는 유전자를 사용하였을 뿐 아니라 titer 보정을 위한 reference 유전자, ACTB를 real time PCR assay을 통해 확보하여 더 정확한 titer 값을 얻고자 했다. 이렇게 얻어진 titer 값은 Group I 환자 샘플(titer 2 이상)에 대해서는 2.4~26.3을 보였고, Group II 환자 샘플(titer 1~2)에 대해서는 1.4~2.0의 분포를 보였으며, Group III 환자 샘플(titer 1이하)에 대해서는 0.5~1.4의 titer 분포를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 기존의 Taqman-based real time Assay와 비교 하기 위해서 Taqman을 사용한 data(unpublished data, Suh et al)를 각각의 샘플 Group 별로 비교하여 Fig. 3에 정리하였다.

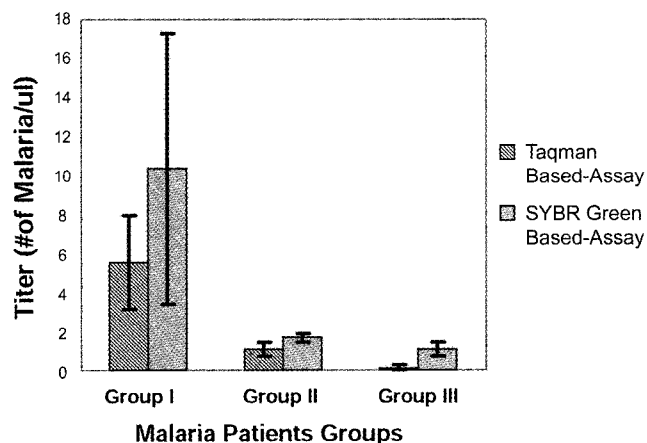


Fig. 3. Comparison of titers between two real time assay methods. Group I is 8 patient samples with high Malaria titer, Group II is 8 patient samples with moderate Malaria titer and Group III is 10 patient samples with low Malaria titer (See Materials and Methods). The stipend bar graphs indicate the titer from Taqman based-assay (unpublished data, Suh et al.) and filled bar graphs indicate the titer from SYBR Green-based real time PCR assay. The SYBR Green-based assay showed semi-quantitative results for detecting Malaria parasite.

그 결과를 살펴보면 각각의 Group 별로 titer의 상대적인 경향성은 일치 하지만 titer 값에서 SYBR Green-based assay 가 Taqman base assay 보다 더 큰 titer 값을 보이는 것을 알 수 있었다. Titer 절대값이 일치 하지 않는 이유는 두 방법에서 사용한 target 유전자가 다르다는 점 때문일 것으로 추정된다. Taqman-based real time assay는 18S rRNA을 이용하였고, 본 연구에서는 DBP 유전자를 이용하여 SYBR Green-based assay로부터 결과를 얻었으며 보정시 ACTB 유전자를 사용하였다. SYBR Green-based assay의 경우는 18S rRNA 유전자의 염기서열이 비슷한 염기가 계속 반복 되어 한쌍의 primer 만으로 증폭 될 수 없어 본 연구에서 최근에 발견된 DBP 유전자를 사용하게 된 것이다. 하지만 다른 유전자들은 유전자마다 증폭률이 다르기 때문에 차이가 발생할 수 있을 것으로 보인다. 특히 이것이 특히 titer가 높은 Group I에서 더욱 문제가 두드러지게 보일 것으로 사료 된다. 다른 이유로는 다른 유전자이기 때문에 염기 배열이 달라서 SYBR Green이 들어가는 효율이 달라서 SYBR Green 방법은 원천적으로 Taqman 방법에 비해서 정량적으로 불리한 점을 가지고 있다. 그렇기 때문에 실제 혈액 도마 법과 비교한 절대 titer 값은 Taqman 방법과 유사한 것을 알 수 있었다(data not shown). 하지만, 본 연구결과는 결론적으로 정성적이고 semi-정량적인 말라리아 검출법으로 사용 될 수 있다.

위와 같이 Real time PCR 을 이용하면 유전자의 발현 양을 정량적으로 알 수 있기 때문에 말라리아와 같은 기생충의 검출에도 용이 하게 쓰일 수 있다. 특히 Taqman based-PCR assay의 경우 추가적인 probe을 이용하여 좀더 정량적으로 rRNA를 검출할 수 있지만, 이것은 특수 제작한 probe 가 무척 고가이고 유전자 변형에 더 민감하여 여러 종류의 말라리아 검출에는 적용하기 힘들어 실용적인 병원균 검출 및 진단방법으로 사용되기 적절하지 않은 면이 있다. 반면에 SYBR Green based-PCR assay 방법을 이용한 말라리아의 검출은 일반적인 primer 쌍을 이용하기 때문에 경제적이고 실용적인 진단방법이 될 수 있다. 그러나 한편으로는 기준 유전자의 올바른 선택 및 유전자 염기 서열에 따른 SYBR Green 효율의 변이 등 때문에 SYBR Green-based assay가 Taqman based-assay에 비해 정량성이 떨어진다고 볼 수 있다. 특히 본 연구에서 보듯이 titer가 아주 높은 Group I의 경우 정량성이 떨어진다고 보여진다. 하지만 정성적인 감염여부는 정확히 알 수 있었으며 특히 titer의 경향성은 올바르게 증폭하는 것을 알 수 있기 때문에 Semi-quantitative 하지만 간편하고 경제적인 진단법으로 사용 될 수 있으리라 보인다. 특히, Real time PCR machine이 많이 보급됨에 따라 조건을 최적화 하여 보완한다면 PCR 을 통한 말라리아의 검출 및 진단방법 자체가 증폭기술이기 때문에 적은 양의 환자 sample 도 진단이 가능할 뿐 만 아니라 많은 환자를 기존의 방법보다 적은 시간으로 정량적으로 검

출할 수 있게 되므로 유용한 진단방법으로 사용될 수 있으리라 보인다.

요 약

말라리아는 세계적으로 다시 발생하는 감염성 질환으로 모기에 의해 옮겨지는 말라리아 원충에 의해서 발병한다. 말라리아 원충을 검출하기 위하여 혈액 도말법 등 여러 가지 정량적인 assay가 활용 되고 있다. Real time PCR 은 반응이 일어나는 동안 PCR 산물의 생성을 계속적으로 모니터링 할 수 있는 방법으로서 최근 많은 환자들의 말라리아 원충을 한번에 탐지 하는데 적용되고 있다. 본 연구에서는 말라리아 원충 중 한국에서 질환을 일으키는 *Plasmodium vivax* 를 탐지하기 위해 26명의 환자 혈액에서 분리 정제한 genomic DNA를 가지고 SYBR Green based-real time PCR을 수행하였다. 특히, 기존의 real time PCR에 사용한 18S rRNA와는 달리 DBP 유전자를 사용하여 새로운 말라리아 검출방법을 정량적이면서도 간편하고 경제적인 방법으로 개발하였다. 특히, real time PCR로 나온 결과를 임상적인 titer 로 바꾸어 주기 위해서 reference 유전자로는 말라리아 환자의 상태와 관계없이 ACTB이 안정하다는 것을 real time PCR 로 입증하였고 ACTB 유전자를 reference 유전자로 사용하였다. 본 연구에서는 real time PCR assay에 DBP 라는 유전자를 처음 사용하였을 뿐 아니라 titer 보정을 위한 reference 유전자, ACTB를 real time PCR assay을 통해 확보하여 더 정확한 titer 값을 얻고자 했다. 이런 결과를 바탕으로 Taqman based-real time PCR과 본 연구의 결과를 정량비교를 하였다. 특히, 26명의 말라리아 환자 샘플을 3 group(Group I, II, III)로 나누어서 그 결과 정량적인 경향성 일치를 나타내었다. 특히, 높은 titer을 갖는 말라리아 샘플 (Group I)에서 가장 많은 정량적인 차이를 보였지만, 간편하고 경제적인 SYBR Green-based real time PCR을 이용하여 DBP 유전자를 증폭하는 새로운 방법으로 말라리아를 Semi-quantitative 하게 검출할 수 있음을 보였다.

감사의 말

This work was supported by KRF (Grant # D0006).

REFERENCES

- Barnwell, J. W., M. E. Nichols, and P. Rubinstein. 1989. *In vitro* evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J. Exp. Med.* **169**: 1795-1802.
- Barker, R. H., T. Banchongaksorn, J. M. Courval, W. Suwonkerd, K. Rimwungtragoon, and D. F. Wirth. 1994. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors effecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria. *Exp. Parasitol.* **74**: 41-49.
- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**: 23-39.
- Färnert, A., A. P. Arez, A. T. Correia, A. Björkman, G. Snounou, and V. do Rosário. 1999. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**: 50-53.
- Gunderson, J. H., M. L. Sogin, G. Wollett, M. Hollingdale, V. F. de la Cruz, A. P. Waters, and T. F. McCutchan. 1987. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science* **238**: 933-937.
- Hermesen, C. C., D. S. Telgt, E. H. Linders, L. A. van de Locht, W. M. Eling, E. J. Mensink, and R. W. Sauerwein. 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* **118**: 247-251.
- Kain, K. C., M. A. Harrington, S. Tennyson, and J. S. Keystone. 1998. Jul Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 142-149.
- Kawamoto, F., H. Miyake, O. Kaneko, M. Kimura, T. D. Nguyen, T. D. Nguyen, Q. Liu, M. Zhou, D. D. Le, S. Kawai, S. Isomura, and Y. Wataya. 1996. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2287-2289.
- Kain, K. C., D. E. Kyle, and C. Wongsrichanalai. 1994. Qualitative and semi-quantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. *J. Infect. Dis.* **170**: 1626-1630.
- Kim, S. and T. Kim. 2003. Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver diseases. *Biotechniques* **35**: 456-460.
- Kho, W. G., J. Y. Chung, E. J. Sim, D. W. Kim, and W. C. Chung. 2001. Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. *Kor. J. Parasitol.* **39**: 143-150.
- Levine, R. A., S. C. Warlaw, and S. P. Patton. 1989. Detection of haematoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes. *Parasitol. Today* **5**: 132-134.
- Milne, L. M., M. S. Kyi, P. L. Chiodini, and D. C. Warhurst. 1994. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J. Clin. Pathol.* **47**: 740-742.
- Paik, Y. H., H. I. Ree, and J. C. Shim. 1988. Malaria in Korea. *Jpn. J. Exp. Med.* **58**: 55-60.
- Payne, D. 1988. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull. World Health Organ.* **66**: 621-626.
- Perandin, F., N. Manca, A. Calderaro, G. Piccolo, L. Galati, L. Ricci, M. C. Medici, M. C. Arcangeletti, G. Snounou, G. Dettori, and C. Chezzi. 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical

- diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1214-1219.
17. Phillips, R. S. 2001. Current status of malaria and potential for control. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 208-226.
 18. Pieroni, P., C. D. Mills, C. Ohrt, M. A. Harrington, and K. C. Kain. 1998. Comparison of the ParaSight-*F* test and the ICT Malaria Pf test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 166-169.
 19. Scopel, K. K., C. J. Fontes, A. C. Nunes, M. F. Horta, and E. M. Braga. 2004. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apuacas-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop.* **90**: 61-64.
 20. Seesod, N., P. Nopparat, A. Hedrum, A. Holder, S. Thaithong, M. Uhlen, and J. Lundeberg. 1997. An integrated system using immunomagnetic separation, polymerase chain reaction, and colorimetric detection for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**: 322-328.
 21. Singh, B., A. Bobogare, J. Cox-Singh, G. Snounou, M. S. Abdullah, and H. A. Rahman. 1999. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 687-692.
 22. Snounou, G., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, and K. N. Brown. 1993. 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.* **58**: 283-292.
 23. Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong, and K. N. Brown. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* **61**: 315-320.
 24. Weiss, J. B. 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 113-130.

(Received May 30, 2005/Accepted June 4, 2005)