

- [2] Zomorodian K, Geramishoar M, Saadat F, *et al.* Facial demodicosis[J]. *Eur J Dermatol*, 2004, 14(2): 121-122.
- [3] Forton F, Germaux MA, Brasseur T, *et al.* Demodicosis and rosacea: epidemiology and significance in daily dermatologic practice [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2005, 52(1): 74-87.
- [4] Jee TK, Seok HL, Yeoun SC, *et al.* Tear cytokines and chemokines in patients with Demodex blepharitis[J]. *Cytokine*, 2011, 53(1): 94-99.
- [5] Kocak M, Yagli S, Vahapoglu G, *et al.* Permethrin 5% cream versus metronidazole 0.75% gel for the treatment of papulopustular rosacea. A randomized double-blind placebo-controlled study[J]. *Dermatology*, 2002, 205(3): 265-270.
- [6] Clyti E, Sayavong K, Chanthavisouk K. Demodicosis in a patient infected by HIV: successful treatment with ivermectin[J]. *Ann Dermatol Venereol*, 2005, 132(5): 459-461.
- [7] Zhao YE, Guo N, Zhang LX. Experimental observation on the *in vitro* killing effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on human mite *Demodex* and its mechanism of action[J]. *Chin J Zoonoses*, 2007, 23(6): 608-611. (in Chinese)
(赵亚娥, 郭娜, 张灵小. DMSO 体外杀螨效果及机制的实验观察[J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(6): 608-611.)
- [8] Dominique P, Patrick H. Effects of mud pack treatment on skin microcirculation[J]. *Joint Bone Spine*, 2003, 70(5): 367-370.
- [9] Matz H, Orion E, Wolf R. Balneotherapy in dermatology[J]. *Dermatol Ther*, 2003, 16(2): 132-140.
- [10] Luo HY, Wu HH, Xie TH, *et al.* Effect of nutrient contents in Zhejiang Xiushan sea mud on antioxidant activity of environmental organisms[J]. *Oceanol Limnol Sin*, 2008, 39(1): 8-13. (in Chinese)
(罗红宇, 吴辉辉, 解延海, 等. 浙江秀山海泥营养物质对环境生物抗氧化性能的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(1): 8-13.)
- [11] Zhao YE, Guo N, Shi R, *et al.* The effect and mechanism of new natural miticide camphor oil in killing *Demodex*[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2006, 27(6): 544-547. (in Chinese)
(赵亚娥, 郭娜, 师睿, 等. 新型天然杀螨药物樟脑精油的杀螨效果观察与机制分析[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2006, 27(6): 544-547.)
- [12] Li CP. Keep observation upon the effect of better medicament on the fungus and *Demodex*[J]. *J Jinzhou Med Coll*, 2000, 21(6): 16-20. (in Chinese)
(李朝品. 百特药液对真菌和蠕形螨抑制作用的观察[J]. *锦州医学院学报*, 2000, 21(6): 16-20.)
- [13] Mao RZ, Ye HD. Skin smoothing effects of Dead Sea minerals [J]. *Israel Int J Cosmet Sci*, 1997(19): 105-110.
- [14] Yu S. *Skin Hospital Beauty Science*[M]. Beijing: China Medical Science Press, 1997: 78-81. (in Chinese)
(于淞. *皮肤医院美容学*[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997: 78-81.)
- [15] Liang P, Shen JZ, You WL. Research on advances of miticides mechanism[J]. *Pest Sci Administ*, 1999, 20(4): 16-20. (in Chinese)
(梁沛, 申继忠, 游文丽. 杀螨剂作用机制研究进展[J]. *农药科学与管理*, 1999, 20(4): 16-20.)

(收稿日期: 2011-03-01 编辑: 衣凤芸)

文章编号: 1000-7423(2011)-04-0263-04

【研究简报】

巢式 PCR 法在疟疾检测及虫种鉴别中的应用

师永霞*, 黄吉城, 苏锦坤, 洪烨, 李小波, 郑夔, 幸芦琴, 郭波旋

【提要】 根据疟原虫小亚单位核糖体核糖核酸(SSU rRNA)基因序列设计疟原虫通用型和种特异性的引物, 对 60 份血样进行巢式 PCR 检测及虫种鉴定, 并与血样的吉氏染色镜检结果进行比较。巢式 PCR 检出 40 份疟原虫阳性血样, 其中 22 份为恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*) 阳性、13 份为间日疟原虫(*P. vivax*) 阳性、3 份为恶性疟原虫和间日疟原虫混合感染、1 份为卵形疟原虫阳性 (*P. ovale*)、1 份未能分型。与镜检结果一致的血样为 46 份, 占 76.7% (46/60), 其中恶性疟原虫阳性 18 份、间日疟原虫阳性 11 份和阴性 17 份。将两种检测结果不一致的血样进行扩增片段序列测定和实时荧光 PCR 分析, 检测结果均与巢式 PCR 结果一致。卵形疟原虫阳性血样扩增片段的序列分析结果显示, 该序列与卵形疟原虫 SSU rRNA 基因序列(GenBank 登录号 DQ845247)的对应部分同源性为 100%, 证实该病例为输入性卵形疟原虫感染病例。

【关键词】 疟疾; 巢式 PCR; 小亚单位核糖体核糖核酸

中图分类号: R531.3

文献标识码: B

Nested PCR for Malaria Detection and *Plasmodium* Species Identification

SHI Yong-xia*, HUANG Ji-cheng, SU Jin-kun, HONG Ye, LI Xiao-bo,

ZHENG Kui, XING Lu-qin, GUO Bo-xuan

(Health Quarantine Laboratory, Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510700, China)

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技计划项目 (No. 2007GDK32)

作者单位: 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510700

* 通讯作者, E-mail: syx0817@yahoo.com.cn

【Abstract】 According to the sequences of small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene of *Plasmodium* spp., universal and species-specific primers were designed to detect malaria and identify species. 60 blood samples were detected by the established nested PCR method. The results were compared with those of microscopic examination. 40 blood samples were *Plasmodium*-positive by nested PCR with 22 samples of *P. falciparum*, 13 of *P. vivax*, 3 with *P. falciparum* and *P. vivax* mixed infection, 1 of *P. ovale* and 1 of unclassified malaria infection. Altogether, the coincidence between the results of nested PCR and microscopy stood for 76.7% (46/60), including 18 of *P. falciparum*, 11 of *P. vivax* and 17 negatives. Further sequence analysis and real-time PCR were performed to detect blood samples with discrepancy, results of which were the same as that of nested PCR. The amplified product of *P. ovale* was sequenced and showed 100% homology to the corresponding part of *P. ovale* SSU rRNA gene sequence (GenBank No. DQ845247), which confirmed that the case was imported ovale malaria.

【Key words】 Malaria; Nested PCR; Small subunit ribosomal RNA

Supported by Science and Technology Project of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (No. 2007GDK32)

* Corresponding author, E-mail: syx0817@yahoo.com.cn

厚薄血膜镜检法是疟疾诊断的金标准, 但需要操作者具有丰富的经验, 而且当原虫密度较低时, 镜检容易出现漏诊^[1], 对于国内少见的卵形疟和三日疟, 容易错判^[2]。近年来国内外将巢式 PCR 技术应用于疟疾的快速检测和分型^[3-6], 它能准确判断疑似病例是否感染或携带疟原虫, 以便及时发现和采取必要的防控措施, 防止该病经由国境口岸输入或输出。本文根据疟原虫小亚单位核糖体核糖核酸(SSU rRNA)基因序列, 设计了疟原虫通用型和种特异性的引物, 建立了疟原虫通用型和种特异性的巢式 PCR 扩增方法, 检测了 60 份疑似患者的血样。

1 材料和方法

1.1 血样来源 30 份镜检疟原虫阳性血样由云南省寄生虫病防治所提供。10 份镜检疟原虫阳性血样和 20 份镜检疟原虫阴性血样为国境口岸入境发热患者的抗凝血, 由本实验室保存。血样采集均为静脉取血, 2% EDTA-Na₂ 抗凝, -20 °C 低温保存。镜检按照 WS 259-2006 疟疾诊断标准操作。部分血样的镜检由云南省寄生虫病防治所完成。60 份血样经吉氏染色镜检, 其中 24 份为恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*) 阳性, 16 份为间日疟原虫(*P. vivax*) 阳性, 20 份为疟原虫阴性。

1.2 试剂 全血 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Blood Extraction Minikit)和染料掺入法荧光 PCR 试剂(QuantiTect SYBR Green PCR Kit)购自德国 Qiagen 公司。探针法荧光 PCR 试剂

(TaqMan Fast Universal PCR Master Mix)购自美国 ABI 公司。Taq 酶购自德国 Roche 公司。100 bp DNA 标志物和琼脂糖购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 巢式 PCR

1.3.1 血样 DNA 提取 参照全血 DNA 提取试剂盒说明书进行, 提取的总 DNA 于 -20 °C 低温保存。

1.3.2 引物设计合成 根据恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫(*P. ovale*) 和三日疟原虫(*P. malariae*) 的 SSU rRNA 基因序列, 以及 4 种疟原虫 SSU rRNA 基因中的相同序列^[3], 设计疟原虫种特异性和通用型引物 (表 1)。合成上、下游引物间的 DNA 片段作为 PCR 扩增时的阳性对照。引物和 DNA 片段委托上海生工生物技术有限公司合成。

1.3.3 巢式 PCR 巢式 PCR 第一次扩增, 以血样抽提的 DNA 为模板, 反应体系为: 缓冲液 2.5 μl, 10 mmol/L 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP) 0.5 μl, 10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μl, Taq 酶 0.25 μl, 模板 5 μl 和双蒸水 15.75 μl。反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C。

第二次扩增取第一次扩增产物各 2 μl 为模板, 分别加入通用型, 或恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫或三日疟原虫特异性上、下游引物各 0.5 μl, 加水 18.75 μl, 其余同第一次 PCR 扩增。同时设阴性和阳性对照。反应条件为: 94 °C 2 min;

表 1 疟原虫巢式 PCR 检测引物

基因	参考序列	引物序列(5'→3')	引物名称	扩增片段长度
恶性疟原虫 SSU rRNA	M19172	rPLUout-FP: TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA	巢式 PCR 第一次扩增引物	1 815 bp
		rPLUout-RP: CCTGTTGTTGCCTTAAACTTCC		
	rPLUin-FP: AAGGATAACTACGGAAAAGCTGT	巢式 PCR 第二次扩增通用型引物	240 bp	
				rPLUin-RP: TACCCGTCATAGCCATGTTAGCCAATACC
rFAL-FP: TTAAACTGGTTGGGAAAAC	巢式 PCR 第二次扩增恶性疟原虫特异性引物	204 bp		
			rFAL-RP: ACAATGAACTCAATCATGACTACC	
间日疟原虫 SSU rRNA	U03079	rVIV-FP: CTCTAGCTTAATCCACATAAAGTCC	巢式 PCR 第二次扩增间日疟原虫特异性引物	119 bp
		rVIV-RP: ACTTCCAAGCCRAAGCAAAGAAAGTCC		
卵形疟原虫 SSU rRNA	L48987	rOVA-FP: CGGGGAAATTTCTTAGATTGC	巢式 PCR 第二次扩增卵形疟原虫特异性引物	456 bp
		rOVA-RP: GAGAAACAGCATGAATTGCC		
三日疟原虫 SSU rRNA	M54897	rMAL-FP: AACAWAGTTGTACRTTAAGAATAAACGC	巢式 PCR 第二次扩增三日疟原虫特异性引物	141 bp
		rMAL-RP: AATTCCCATGCATAAAAAATTAYACAAA		

94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C。取扩增产物各 5 μl 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, GelGreen 染色, 凝胶成像系统观察结果并拍照。实验重复 3 次。

对巢式 PCR 与镜检结果不一致的血样, 取 PCR 扩增片段由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定, 再对碱基组成进行 Blast 比较分析。

1.4 实时荧光 PCR 检测 对巢式 PCR 与镜检结果不一致的血样进行实时荧光 PCR 检测, 其中卵形疟原虫阳性血样检测

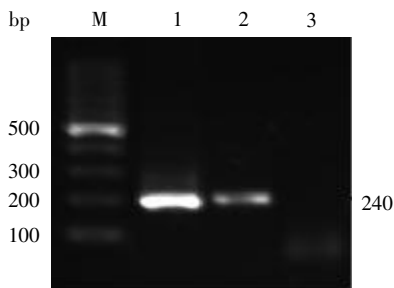
采用染料掺入法, 恶性疟原虫和间日疟原虫阳性血样采用水解探针法(表 2)。染料掺入法的反应体系为: 预混液 12.5 μl, 10 μmol/L 上、下游引物各 0.75 μl, 模板 2 μl 和双蒸水 9 μl。反应条件为: 95 °C 15 min; 94 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 溶解曲线分析。水解探针法的反应体系为: 预混液 10 μl, 10 μmol/L 上、下游引物各 1 μl, 5 μmol/L 探针 1 μl 和模板 7 μl。反应程序为: 95 °C 20 s; 95 °C 1 s, 58 °C 20 s, 40 个循环。分别设阴性和阳性对照。

表 2 实时荧光 PCR 检测的引物和探针

基因	参考序列	引物和探针序列(5'→3')
卵形疟原虫 SSU rRNA	L48987	OVA-FP: ATTAATGTGTCCTTTCCCTATTCT OVA-RP: GCTTTACAATCAAACGAATACATTC
恶性疟原虫 SSU rRNA	M19172	FAL-FP: CTTTTGAGAGGTTTTGTACTTTGAGTAA FAL-RP: TATTCATGCTGTAGTATTCAAACACAA FAL-Pro: FAM-TGTTTCATAACAGACGGCTAGTCATGATTGAGTTCA-BHQ1
间日疟原虫 SSU rRNA	U03079	VIV-FP: ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT VIV-RP: ACTTCCAAGCCRAAGCAAAGAAAAGTCC VIV-Pro: FAM-TTCGTATCGACTTTGTCCGATTTTGC-BHQ1

2 结果

2.1 疟原虫通用型巢式 PCR 检测 疟原虫通用型巢式 PCR 扩增结果显示, 有 40 份血样扩增出预期大小的 240 bp 特异性扩增条带, 为疟原虫阳性, 20 份血样没有扩增条带, 为疟原虫阴性(图 1)。

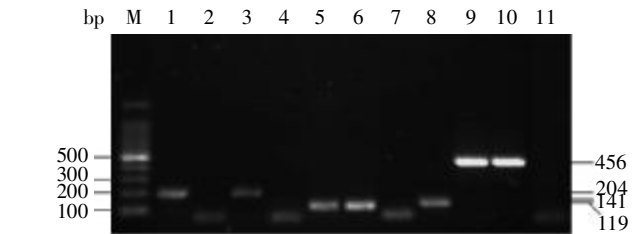


M: DNA 标志物; 1: 疟原虫阳性血样 PCR 结果; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照。

图 1 疟原虫通用型巢式 PCR 检测结果

2.2 疟原虫种特异性巢式 PCR 检测 使用种特异性引物进行巢式 PCR 扩增, 恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和三日疟原虫阳性血样的预期扩增条带大小分别为 204 bp、119 bp、456 bp 和 141 bp(图 2)。结果显示, 有 22 份为恶性疟原虫阳性, 13 份为间日疟原虫阳性, 3 份为恶性疟原虫和间日疟原虫混合感染, 1 份为卵形疟原虫阳性, 1 份未分型。

2.3 两种方法的比较 将疟原虫镜检和巢式 PCR 扩增方法进行比较, 与镜检结果一致的血样为 46 份, 占 76.7% (46/60), 其中恶性疟原虫阳性 18 份、间日疟原虫阳性 11 份和阴性 17 份。2 份镜检为间日疟原虫阳性和 2 份镜检为阴性的血样经巢式 PCR 扩增显示为恶性疟原虫阳性, 2 份镜检为恶性疟原虫阳性的血样经巢式 PCR 扩增显示为间日疟原虫阳性, 1 份镜检为阴性的血样经巢式 PCR 扩增显示为卵形疟原虫阳性, 2 份镜检



M: DNA 标志物; 1: 恶性疟原虫阳性血样; 2: 恶性疟原虫阴性对照; 3: 恶性疟原虫阳性对照; 4: 间日疟原虫阴性对照; 5: 间日疟原虫阳性血样; 6: 间日疟原虫阳性对照; 7: 三日疟原虫阴性对照; 8: 三日疟原虫阳性对照; 9: 卵形疟原虫阳性血样; 10: 卵形疟原虫阳性对照; 11: 卵形疟原虫阴性对照。

图 2 疟原虫种特异性巢式 PCR 检测

为恶性疟原虫阳性和 1 份镜检为间日疟原虫阳性的血样经巢式 PCR 扩增显示为恶性疟原虫和间日疟原虫混合感染, 1 份镜检为间日疟原虫阳性的血样经巢式 PCR 未能分型, 2 份镜检为恶性疟原虫阳性和 1 份镜检为间日疟原虫阳性的血样经巢式 PCR 扩增显示为阴性(表 3)。

表 3 血样的疟原虫巢式 PCR 和镜检结果比较

巢式 PCR 检测	镜检检测				阴性	总数
	Pf	Pv	Pm	Po		
Pf	18	2	0	0	2	22
Pv	2	11	0	0	0	13
Pm	0	0	0	0	0	0
Po	0	0	0	0	1	1
Pf+Pv	2	1	0	0	0	3
未分型	0	1	0	0	0	1
阴性	2	1	0	0	17	20
总数	24	16	0	0	20	60

注: Pf: 恶性疟原虫阳性; Pv: 间日疟原虫阳性; Pm: 三日疟原虫阳性; Po: 卵形疟原虫阳性; Pf+Pv: 恶性疟原虫和间日疟原虫混合感染。

2.4 实时荧光 PCR 检测和序列分析 对发现的卵形疟血样进行实时荧光 PCR 检测和序列测定。实时荧光 PCR 结果为阳性, 为典型的 S 形扩增曲线。测序结果表明, PCR 扩增片段由 434 个碱基组成, 将该序列递交到 GenBank 上, 登录号为 JF505386。Blast 比对发现, 它与卵形疟原虫 SSU rRNA (GenBank 登录号为 DQ845247、AB182491、AB18249、AB182493、AJ001527 和 X99790) 对应部分的基因序列同源率为 100%。两种检测结果不一致的其余 13 份血样的扩增片段序列测定和实时荧光 PCR 检测结果均与巢式 PCR 结果一致。

3 讨论

传统镜检法的局限性以及熟练镜检人员的缺乏导致疟疾病例的确诊与鉴别诊断困难, 成为疟疾监测中的新挑战。Coleman 等^[7]报告, 在泰国西部疟疾主动侦察血片中, <250 个/μl 的低密度 (无症状) 带虫者约占阳性总数的 76.2%~90%, 然而即使是有经验的专业镜检员检测原虫低密度血样, 镜检的敏感性和特异性也会显著下降。而且疟原虫混合感染时, 镜检不易将恶性疟的环状体或早期滋养体与间日疟的环状体区分开, 特别是用药后虫体形态发生变化, 虫种鉴别较困难, 容易出现误诊或漏诊。因此以传统的镜检法作为金标准评价其他的诊断方法也存在局限性^[8,9]。

近年来, 国内外学者将巢式 PCR 技术用于疟疾的检测^[3,6]。本文建立了疟疾的通用型和种特异性巢式 PCR 检测, 并对 60 份血样进行了 3 次巢式 PCR 重复实验, 46 份血样的巢式 PCR 检测结果与镜检结果相符, 14 份血样的检测结果不一致。对这 14 份血样进行了扩增片段的序列测定和实时荧光 PCR 检测, 结果与巢式 PCR 一致。镜检初筛时没有发现疟原虫的混合感染, 但巢式 PCR 方法检测发现 3 份血样存在恶性疟原虫和间日疟原虫混合感染, 表明疟原虫混合感染时, 镜检可能对疟原虫密度较低的虫种漏检^[10]。1 份镜检间日疟的血样经巢式 PCR 扩增为疟疾通用型阳性, 但未能分型, 用疟原虫通用型引物扩增出的产物进行了序列分析, 发现与诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*) 的序列相同, 目前正对该血样做进一步的鉴定。

本研究发现了一例卵形疟病例, 该患者为归国劳务人员, 曾在赤道几内亚国家工作 2 年, 期间曾患疟疾, 并多次发作, 入境时查体体温为 38.3℃。血样制备的涂片初次镜检结果为疟原虫阴性, 但该血样的巢式 PCR 和实时荧光 PCR 检测均为卵形疟原虫阳性, 无其他种疟原虫混合感染。扩增片段的同源性比较显示, 扩增序列与 GenBank 登录号为 DQ845247 和 AB182491 等的卵形疟原虫 SSU rRNA 对应部分的序列完全相同, 证实该病例为输入性卵形疟。说明卵形疟除在中东和东南亚等地流行外^[11], 在非洲中西部国家也有分布。

因此, 本研究建立的巢式 PCR 方法可用于疟疾的初步检

测和虫种鉴定, 有利于提高疟疾的检出率和准确性, 避免漏检和误诊。

参 考 文 献

- [1] Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, et al. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria [J]. Med Trop, 2005, 65(2): 176-183.
- [2] Imirzalioglu C, Soydan N, Schaller M, et al. Diagnosis of mixed *Plasmodium malariae* and *P. vivax* infection in a development aid volunteer by examination of bone-marrow specimens by real-time PCR [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6): 2307-2310.
- [3] Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, et al. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6): 2694-2700.
- [4] Xia H, Shen YZ, Gao Q, et al. Field evaluation for malaria surveillance using a *Plasmodium vivax* PCR detection kit [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2000, 13(4): 247-249. (in Chinese)
(夏惠, 沈毓祖, 高琪, 等. 间日疟原虫 PCR 检测试剂盒用于疟疾监测的现场评价 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13(4): 247-249.)
- [5] Guo CK, Li XM, Lin Z, et al. Primary evaluation on the application of nested/multiplex PCR in malaria diagnosis and surveillance [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(4): 277-280. (in Chinese)
(郭传坤, 黎学铭, 林珍, 等. 套式/多重 PCR 方法应用于疟疾诊断与监测的初步评价 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(4): 277-280.)
- [6] Xu JQ, Yuan FY, Zhan FX, et al. Study on the establishment and application of detecting *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [J]. J Pub Health Prev Med, 2009, 20(2): 11-14. (in Chinese)
(徐军强, 袁方玉, 詹发先, 等. 套式 PCR 检测恶性疟原虫与间日疟原虫方法的建立及其应用研究 [J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20(2): 11-14.)
- [7] Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand [J]. Malaria J, 2006, 5(1): 121-127.
- [8] Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavony MV, et al. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 1087-1089.
- [9] Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5636-5643.
- [10] Perandin F, Manca N, Piccolo G, et al. Identification of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae* and detection of mixed infection in patients with imported malaria in Italy [J]. New Microbiol, 2003, 26(1): 91-100.
- [11] Win TT, Lin K, Mizuno S, et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar [J]. Trop Med Int Health, 2002, 7(3): 231-239.

(收稿日期: 2011-03-11 编辑: 瞿麟平)