مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، ویژه نامه ۱، زمستان ۹۲، صفحات ۶ تا ۱۰

Original Article

تنوع ژنتیکی ژن دی هیدرو پتروات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس در استان هرمزگان

علی حقیقی[۱]، فاطمه صغری مقصودلو راد[۲]، خجسته شریفی سراسیابی[۳]، سید جواد سید طبایی[۱]، نیلوفر تقی پور[۱]، احسان ناظم الحسینی مجرد[۴]، ناهید حسین زاده[۱]، لطیف گچکار[۵]

[۱] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
[۳] دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان
[۴] مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۵] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *مالاریا مهم‌ترین بیماری انگلی در جهان است و در مناطق مالاریا خیز جدی‌ترین خطر برای سلامتی انسان محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی پلی‌مورفیسم ژن دی هیدرو پتروات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس(Pvdhps) در استان هرمزگان و بررسی وجود موتاسیون در کدون‌های ۳۸۲، ۳۸۳، ۵۱۲، ۵۵۳ و ۵۸۵ بود که در ارتباط با بروز مقاومت پلاسمودیوم ویواکس به سولفادوکسین هستند.*

روش بررسی: *۱۱۸ ایزوله پلاسمودیوم ویواکس که در سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ جهت بررسی ژن دی هیدروفولات ردوکتاز تیمیدیلات سنتاز تهیه شده بودند، در مطالعه تنوع ژنتیکی ژن دی هیدرو پتروات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس مورد بررسی قرار گرفتند. روش آزمایش PCR و تعیین ترادف نوکلئوتیدها (سکوئنسینگ) بود.*

یافته‌ها: از ۱۱۸ نمونه خون آلوده به پلاسمودیوم ویواکس، به ترتیب ۴۶ نمونه به *میناب و ۷۲ نمونه به جاسک تعلق داشت. در نمونه‌های مورد مطالعه هیچ گونه موتاسیونی در ۵ کدون هدف با استفاده از روش PCR و سکوئنسینگ دیده نشد. اما در بین این ۱۱۸ نمونه، سه ایزوله (۲/۵۴٪) دارای یک موتاسیون در کدون جدید ۴۲۱ بودند.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به بررسی موتاسیون در ژن دی هیدروفولات ردوکتاز (Pvdhfr) (مطالعه گزارش نشده) بر روی همین نمونه‌ها و عدم مشاهده موتاسیون در هیچ یک از ۵ کدون اصلی در ژن Pvdhps در این مطالعه، می توان نتیجه گیری نمود که با وجود مقاومت احتمالی نسبت به پریمتامین، احتمالا" نسبت به سولفادوکسین و لذا فنسیدار در پلاسمودیوم ویواکس در استان هرمزگان تاکنون مقاومت ایجاد نشده است.*

واژگان کلیدی: *تنوع ژنتیکی، ژن دی هیدرو پتروآت سنتاز، پلاسمودیوم ویواکس، PCR، استان هرمزگان.*

مقدمه

پلاسمودیوم فالسی پاروم و پلاسمودیوم ویواکس از مهم‌ترین انگل‌های منتقله توسط بندپایان هستند که دارای پراکندگی جهانی بوده و از قدرت بیماری‌زایی بالایی برخوردارند. در نتیجه اجرای موفقیت آمیز نیم قرن برنامه های پیش گیری و کنترلی، در حال حاضر در بخش وسیعی از ایران انتقال مالاریا مشاهده نمی شود و فقط در نواحی محدودی که عمدتا" در

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دکتر علی حقیقی (**email**: ahaghighi110@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۸

Archive of SID
www.SID.ir

جنوب شرق کشور واقع شده است، انتقال محلی بیماری مالاریا وجود دارد (۱). پلاسمودیوم ویواکس نوع غالب انگل مالاریا در ایران است و استان هرمزگان یکی از سه استان اندمیک کشور، از نظر ابتلا به انگل مالاریا می باشد (۱، ۲). مطالعه بر روی اکثریت داروهای ضد مالاریا در سال‌های اخیر متوجه پلاسمودیوم فالسی پاروم بوده است، اما ظهور مقاومت به کلروکین در پلاسمودیوم ویواکس که به سرعت در حال گسترش است موجب توجه محققین به لزوم جایگزینی داروهای ضد مالاریا درمالاریای ویواکس شده است. به طور کلی به نظر می‌رسد که مقاومت دارویی در اثر جهش نقطه‌ای خاص در یک یا چند نوکلئوتید اتفاق می افتد، که این روند باعث کاهش حساسیت نسبت به داروهای معین یا یک کلاس از داروها می‌شود (۳). به دلیل این که پی گیری حساسیت پلاسمودیوم ویواکس به داروهای آنتی مالاریا به کمک تست‌های آزمایشگاهی مشکل و در بعضی موارد غیر ممکن می‌باشد، استفاده از مارکرهای مولکولی که درارتباط با مقاومت دارویی هستند، ابزار مفیدی در جهت شناسایی ساختار موتاسیون‌ها در ایزوله‌های پلاسمودیوم ویواکس می‌باشد (۴، ۵). پریمتامین و سولفادوکسین از پرکاربردترین داروهای آنتی مالاریا هستند که روی مسیر تولید فولات اثر می‌گذارند. با قطع مسیر فولات توسط آنتی فولات‌ها، تبدیل گلایسین به سرین و نیزسنتز متیونین احیا شده کاهش پیدا کرده و در نهایت باعث افت مقدار تیمیدیلات و همانند سازی DNA می‌شود (۶، ۷). برای پلاسمودیوم فالسی پاروم و پلاسمودیوم ویواکس که به طور طبیعی انسان را آلوده می‌کنند، مقاومت در برابر داروهای آنتی مالاریا مشخص شده است که پلاسمودیوم فالسی پاروم تقریبا" مقاومت در حال گسترشی نسبت به تمام داروهای آنتی مالاریا که در حال حاضر استفاده می شود دارد (۸). مقاومت به فنسیدار به وسیله جهش نقطه-ای خاص در ژن‌های دی هیدرو فولات ردوکتاز و دی هیدروپتروآت سنتاز صورت می‌گیرد و به ترتیب باعث مقاومت به پریمتامین و سولفادوکسین می شود. پنج کدون مطرح ۳۸۲، ۳۸۳، ۵۱۲، ۵۵۳ و ۵۸۵ در ژن دی هیدروپتروآت سنتاز پلاسمودیوم ویواکس (*Pvdhps*) در ارتباط با مقاومت انگل به سولفادوکسین هستند. موتاسیون در این ژن و شیوع موتاسیون در دو کدون ۳۸۳ و ۵۵۳ احتمالا" باعث افزایش سطح مقاومت می‌شود (۱۱-۹). بررسی وجود یا عدم وجود موتاسیون در کدون‌های مرتبط با مقاومت در ژن دی هیدروپتروات سنتاز، در نمونه‌های پلاسمودیوم ویواکس استان هرمزگان هدف اصلی این تحقیق بود.

مواد و روشها

از بیماران مبتلا به مالاریا که به مراکز بهداشتی درمانی شهرهای میناب و جاسک استان هرمزگان مراجعه کرده بودند، تعداد ۱۱۸ نمونه خون مثبت پلاسمودیوم ویواکس در لوله‌های حاوی EDTA در سال ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ توسط شریفی و همکاران تهیه شد (۱۲، ۱۳) و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد در گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی نگهداری شدند و در این مطالعه ژن دی هیدروپتروات سنتاز بر روی همان نمونه‌ها بررسی شد.

از کیت DNGplus از شرکت سیناژن جهت استخراج DNA پلاسمودیوم ویواکس استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه خون با ۷۰۰ میکرولیتر محلول DNG مخلوط و با توجه به منوال شرکت DNA استخراج شد. جهت تخمین مقدار DNA از دو روش تعیین غلظت با دستگاه اسپکتروسکوپی اولتراویوله و تخمین غلظت نمونه های DNA با روش ژل الکتروفورز استفاده شد.

برای انجام PCR از یک جفت پرایمر خارجی جهت تکثیر قطعه bp ۱۳۵۴ ژن پیروات کیناز دی هیدروپترات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس (*P. vivax pppk-dhps*) با استفاده از سکانس ژن موجود در بانک ژن با شماره دستیابی AY186730 استفاده شد (جدول ۱). با استفاده از یک جفت پرایمر داخلی جهت Nested-PCR یک قطعه ۷۰۵ نوکلئوتیدی

جدول ۱. ترادف نوکلئوتیدهای پرایمرهای خارج و داخلی ژن هیدروپترات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس

نام پرایمر	ترادف نوکلئوتیدی پرایمرها	اندازه قطعه
VDHPS-OF	5'- ATTCCAGAGTATAAGCACAGCACATTTGAG-3'	bp۱۳۴۵
VDHPS-OR	5'- CTAAGGTTGATGTATCCTTGTGAGCACATC-3'	
VDHPS-NF	5'-AATGGCAAGTGATGGGGCGAGCGTGATTGA-3'	bp ۷۰۵
VDHPS-NR	5'- CAGTCTGCACTCCCCGATGGCCGCGCCACC-3'	

Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر یافت. PCR با استفاده از کیت PreMix از شرکت INTRON Biotechnology (Cat.No: 25026, 96) با دمای آنیلینگ ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای قطعه خارجی و ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای قطعه داخلی در ۳۰ سیکل انجام گرفت.

باندهای قطعه تکثیر یافته پس از PCR بر روی ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد با دستگاه ترانس ایلومیناتور با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و الکتروفورز بر روی ژل آگارز مشاهده شدند. نمونه هایی که با انجام PCRدارای باند قابل قبول بودند، جهت بررسی موتاسیون احتمالی، نوکلئوتیدهای محصول PCR کلیه نمونه‌ها در مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد تعیین توالی شدند و با نمونه های استاندارد موجود در GenBank مقایسه شدند.

یافته‌ها

از تعداد ۱۱۸ نمونه خون آلوده به پلاسمودیوم ویواکس از دو منطقه میناب و جاسک در استان هرمزگان به ترتیب ۴۶ نمونه به میناب و ۷۲ نمونه دیگر به جاسک تعلق داشت. از این تعداد، ۷۹ بیمار (۶۷٪)، مرد و ۳۹ بیمار (۳۳٪) زن بودند. میانگین سنی بیماران ۲۲ سال و اکثریت آنان را (۹۱/۵٪) ایرانی‌ها تشکیل می‌دادند. هدف اصلی مطالعه، بررسی وجود موتاسیون در پنج کدون اصلی ۳۸۲، ۳۸۳، ۵۱۲، ۵۵۳ و ۵۸۵ در ژن دی هیدروپترات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس بود. محصول Nested-PCR تعداد ۹ مورد از نمونه ها در شکل ۱ با اندازه ۷۰۵ نوکلئوتید نشان داده شده است. کلیه ایزوله ها باند یکسان و مشابه با شکل ۱ نشان دادند.

شکل۱. تصویرالکتروفورز قطعه bp ۷۰۵ ژن *pvdhps* تعداد ۹ ایزوله پلاسمودیوم ویواکس استان هرمزگان

M: 100bp DNA Ladder; Numbers: The isolated numbers PC: Positive Control; NC: Negative Control

محصول PCR کلیه نمونه‌ها که یک قطعه ۷۰۵ نوکلئوتیدی بود، تعیین توالی شدند. در نمونه‌های مورد مطالعه هیچ گونه موتاسیونی با استفاده از روش PCR و سکوئنسینگ دیده نشد. اما در بین این ۱۱۸ نمونه، سه ایزوله (۲/۵۴ ٪) دارای موتاسیونی گزارش نشده در کدون جدید ۴۲۱ بودند که مشخصات آنها در جدول ۲ آمده است. این ایزوله‌ها هرسه در یک جایگاه و دارای یک موتاسیون بودند. سکانس سه ایزوله پلاسمودیوم ویواکس با توالی نوکلئوتیدی ژن‌های موجود در بانک ژن تفاوت در کدون ۴۲۱ را برای اولین بار در این مطالعه نشان داد. توالی این کدون در ایزوله غیر موتانت GTG بود که در ایزوله موتانت تبدیل به GAG شده بود. در اثر این موتاسیون، اسید آمینه والین به اسید آمینه گلوتامیک اسید تبدیل می‌شود. سکانس نمونه میناب و یکی از نمونه‌های جاسک در GneBank ثبت و با شماره AB609599 و AB609600 قابل دستیابی هستند. هیچ کدام از افراد مثبت سابقه مسافرت به کشورهای افغانستان و پاکستان را نداشتند.

جدول ۲. مشخصات ایزوله‌های موتانت در استان هرمزگان درکدون ۴۲۱ از ژن دی هیدروپترات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس

کد ایزوله	ملیت	محل زندگی بیمار	جنس	سن
ShH(PV)17M-IR*	ایرانی	میناب	مرد	۹
ShH(PV)54J-IR	ایرانی	جاسک	مرد	۲۰
ShH(PV)70J-IR	ایرانی	اطراف جاسک	زن	۱۴

* Sh:Sharifi, H:Haghighi, Pv:*Plasmodium vivax*, M:Minab, J:Jask, Numbers: The isolated numbers, IR: Iran

بحث

ظهور مقاومت به کلروکین در پلاسمودیوم ویواکس در برخی از مناطق مالاریا خیز جهان که به سرعت در حال گسترش است موجب توجه محققین به لزوم جای گزینی داروهای ضد مالاریا در مالاریای ویواکس شده است (۳). سالهاست که از گزارش مقاومت دارویی در پلاسمودیوم فالسی پاروم به کلروکین در ایران گذشته است و لذا پشه‌های آنوفل انگل‌های مقاوم به دارو را در سراسر مناطق مالاریا خیز منتقل کرده‌اند (۱۴). علی‌رغم این که سولفادوکسین برای درمان پلاسمودیوم ویواکس در کشور استفاده نمی‌شود، اما مشاهده موتاسیون (داده‌های چاپ نشده) در ژن دی هیدروپتروات سنتاز پلاسمودیوم ویواکس در چابهار و مناطق اطراف ثابت می‌کند که پلاسمودیوم ویواکس به نحوی در معرض داروی سولفادوکسین در جنوب شرقی ایران قرار گرفته است. در این مطالعه در ۱۱۸ ایزوله پلاسمودیوم ویواکس هیچگونه

Archive of SID

www.SID.ir

موتاسیونی در ایزوله‌های میناب و جاسک مشاهده نشد، ولی سه ایزوله موتانت در کدون جدید ۴۲۱ در ژن *Pvdhps* دیده شد (جدول ۲)، که ممکن است آغاز بروز موتاسیون در این ژن و احتمالاً در کدون‌های شناخته شده در این منطقه باشد. مطالعات ابتدایی در سال ۱۹۵۹ حاکی از مقاومت ذاتی پلاسمودیوم ویواکس به فنسیدار بود (۱۵). در آن زمان با ظهور سویه‌های پلاسمودیوم فالسی پاروم مقاوم به کلروکین، داروهای آنتی فولات مانند پروگوآنیل، سیکلوگوآنیل و پریمتامین به عنوان داروی جانشینی کلروکین و یا حتی پیشگیری از مالاریا در مناطقی که هر دو گونه پلاسمودیوم فالسی پاروم و ویواکس وجود داشت مورد استفاده وسیع قرار گرفتند. اما به زودی موارد زیادی از شکست درمان و یا شکست در پیش گیری بیماری در مورد پلاسمودیوم ویواکس گزارش شد. این امر بعضی از مالاریالوژیست‌ها را متقاعد کرد که این انگل به طور ذاتی به داروهای ضد فولات مقاوم است (۱۵). اما با مطالعاتی که بعدا" صورت گرفت خلاف این مطلب ثابت شد (۱۶). محققین قبلا" مقاومت پلاسمودیوم ویواکس به فنسیدار را به دلیل مقاومت ذاتی انگل به این دارو می‌دانستند، اما مطالعات در سال‌های اخیر نشان داد که مکانیسم درگیر در مقاومت شامل جهش‌های نقطه‌ای در ژن *pvdhfr* و *pvdhps* می‌باشد (۳، ۶، ۱۷، ۱۸). سولفادوکسین - پریمتامین (فنسیدار) معمولا" برای درمان عفونت‌های ناشی از پلاسمودیوم ویواکس تجویز نمی‌شود، اما به دلیل رایج بودن عفونت توام با پلاسمودیوم فالسیپاروم و مشکلات تشخیص صحیح، درمان آن با فنسیدار نیز ممکن است صورت گیرد (۲۳-۲۱). هر چند در این مطالعه ارتباط وجود موتاسیون در ۵ کدون اصلی و بروز مقاومت به سولفادوکسین در مناطق مورد بررسی دیده نشد، اما با استناد به موتاسیون در کدون جدید ۴۲۱ و مشاهده ایزوله دارای دابل موتاسیون در ژن *Pvdhfr* در دو کدون ۵۸ و ۱۱۷ در همین ایزوله‌ها در هرمزگان (داده‌های گزارش نشده) که باعث مقاومت به پریمتامین می‌شود، می‌توان گفت که مقاومت پلاسمودیوم ویواکس به فنسیدار در هرمزگان ممکن است در حال بروز باشد. در هر حال، اگرچه احتمال بروز مقاومت به پریمتامین در جنوب ایران قابل توجه است، به دلیل استفاده هم زمان آن با سولفادوکسین در داروی فنسیدار و تقویت اثر این دو دارو در مجاورت یکدیگر هم چنان امکان ادامه استفاده از فنسیدار وجود دارد، مگر این که مقاومت به سولفادوکسین نیز روز به روز افزایش پیدا کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد انگل شناسی و طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده پزشکی شهید بهشتی با شماره ۱۳/۳۱۶۴۲ مصوب مورخ ۱۳۸۹/۵/۳۰ است که در گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت. نویسندگان مقاله از همکاری حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی و کلیه همکاران و کارشناسان گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

1. Raeisi A, Nikpoor F, Ranjbar Kahkha M, Faraji L. The trend of Malaria in I.R. Iran from 2002 to 2007. Hakim Research Journal 2009; 12: 35- 41. [In Persian]
2. Edrisian Gh, Rezaeian M, Ghorbani M, Keshavarz H, editors. Medical protozoology. 1st ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences press; 2007. [In Persian]
3. Rungsihirunrat K, Sibley CH, Mungthin M, Na-Bang chang K. Geographical distribution of amino acid mutations in *Plasmodium vivax* DHFR and DHPS from malaria endemic areas of Thailand. Am J Trop Med Hyg 2008; 78:462-467.
4. Barnadas C, Tichit M, Bouchier C, Ratsimbasoa A, Randrianasolo L, Raherinjafy R, et al. *Plasmodium vivax dhfr* and *dhps* mutations in isolates from Madagascar and therapeutic response to sulphadoxine-pyrimethamine. Malar J 2008; 7:1-11.
5. Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K, Sattabongkot J. Culti-vation of Plasmodium vivax. Trends Parasitol 2008; 24:85-88.
6. Hawkins VN, Joshi H, Rungsihirunrat K, Na-Bangchang K, Sibley CH. Antifolates can have a role in the treatment of Plasmodium vivax. Trends Parasitol 2007; 23: 213-222.
7. Ferone R. Folate metabolism in malaria. Bull World Health Organ 1977; 55: 291-298.
8. ter Kuile FO, Dolan G, Nosten F, Edstein MD, Luxemburger C, Phaipun L, et al. Halofantrine versus mefloquine in treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. Lancet 1993; 341:1044-49.

Archive of SID

www.SID.ir

9. de Pecoulas PE, Tahar R, Ouatas T, Mazabraud A, Basco LK. Sequence variations in the Plasmodium vivax dihydrofolate eductase-thymidylate synthase gene and their relationship with pyrimethamine resistance. Mol Biochem Parasitol 1998; 92:265-73.

10. Imwong M, Pukrittakayamee S, Looareesuwan S, Pasvol G, Poirreiz J, White NJ, et al. Association of genetic mutations in Plasmodium vivax dhfr with resistance to sulfadoxine-pyrimeth-amine: geographical and clinical correlates. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3122-3127.

11. Schousboe ML, S Rajakaruna R, Salanti AC, Hapuarachchi H, NL Galappaththy G, C Bygbjerg I, et al. Island-wide diversity in single nucleotide polymorphisms of the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes in Sri-Lanka. Malar J 2007; 6:28: 1-6.

12. Sharifi Sarasiabi K. Genetic analysis of the dihidrofolate reductase - thymidylate synthase gene in *plasmodium vivax* in Hormozgan province, Iran [PhD thesis]. Tehran: Shahid Beheshti University of Medical Sciences; 2010. [In Persian]

13. Sharifi K, Haghighi A, Gachkar L, Kazemi B, Taghipour N, Hosseinzadeh N. Molecular characterization of dihydrofolate reductase – thymidylate synthase gene concering antifulate resistance of *Plasmodium vivax*. Iranian J Parasitol 2009; 4: 10-18.

14. Hamedi Y. Malaria drug resistance in Iran. Hormozgan Medical Journal 2006; 10: 93-99. [In Persian]

15. Young MD, Burgess RW. Pyrimethamine resistance in Plasmodium vivax malaria. Bull World Health Organ 1959; 20: 27–36.

16. Ahmed A, Bararia D, Vinayak S, Yameen M, Biswas S, Dev V. *Plasmodium falciparum* isolates in India exhibit a progressive increase in mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:879-889.

17. Imwong M, Pukrittayakamee S, Cheng Q, Moore C, Looareesuwan S, Snounou G, et al. Limited polymorphism in the dihydropteroate synthetase gene (*dhps*) of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:4393-95.

18. Martha Sa J, Yamamoto MM, Fernandez-Becerra C, Ferreira de Azevedo M, Papakrivos J , Naude B ,et al. Expression and function of pvcrt-o, a *Plasmodium vivax* ortholog of pfcrt in *Plasmodium falciparumand* Dictyostelium discoideum. Mol Biochem Parasitol 2006; 150: 219–228.

19. Handunnetti SM, Gunewardena DM, Pathirana PP, Ekanayake K, Weerasinghe S, Mendis KN. Features of recrudescent chloroquine-resistant Plasmodium falciparum infections confer a survival advantage on parasites and have implications for disease control. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90:563-67.

20. Wernsdorfer WH. Epidemiology of drug resistance in malaria. Acta Tropica 1994; 56:143–56.

21. Payne D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? Parasitol Today 1988; 4:112–15.

Archive of SID

www.SID.ir