DOI: 10.48305/jims.v41.i723.0452

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۲۳/هفته‌ی سوم مرداد ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۳ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۸ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۵/۲۱

ارزیابی روش‌های تشخیص میکروسکوپی و تست تشخیص سریع در مقایسه با تست PCR در تشخیص پلاسمودیوم ویواکس در افراد مشکوک به مالاریا

محمود صادقی[۱]، محمد کاظمی[۲]، امیررضا ظهیر میردامادی[۳]، الهام حیدری[۳]، زهرا غیور نجف‌آبادی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای روش تست تشخیص سریع و روش میکروسکوپی با روش PCR (Polymerase chain reaction) در تشخیص پلاسمودیوم ویواکس در بیماران مشکوک به مالاریا طراحی و به اجرا درآمد.

روش‌ها: در یک مطالعه‌ی مقطعی، از تعداد ۲۰۷ بیمار تب‌دار مشکوک به مالاریا، جهت تشخیص میکروسکوپی، از انگشت هر فرد خون‌گیری و گسترش تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی با گیمسا، با عدسی ۱۰۰X میکروسکوپ نوری، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین از همه‌ی افراد مشکوک، نمونه‌ی خون کامل گرفته شد و تست تشخیص سریع RDT (Rapid diagnostic test) و سپس DNA استخراج و PCR انجام شد. برای بررسی اعتبار روش‌های مختلف، ضمن محاسبه‌ی حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی، رسم منحنی ROC، از ضریب کاپا (κ) برای اندازه‌گیری میزان توافق تست‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، روش میکروسکوپی و RDT نسبت به PCR به ترتیب دارای: حساسیت ۹۶ و ۹۴ درصد و ویژگی ۱۰۰ و ۹۸/۲ درصد می‌باشند. همچنین ضریب کاپا در روش میکروسکوپی، ۰/۹۶ و در RDT، ۰/۹۱ بدست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقادیر حساسیت و ویژگی، همچنین بالا بودن ضریب کاپا در روش میکروسکوپی و RDT، هر دو روش از میزان توافق خیلی خوب با روش PCR برخوردار بودند.

واژگان کلیدی: مالاریا؛ PCR؛ تست تشخیص سریع؛ پلاسمودیوم ویواکس

ارجاع: صادقی محمود، کاظمی محمد، ظهیر میردامادی امیررضا، حیدری الهام، غیور نجف‌آبادی زهرا. **ارزیابی روش‌های تشخیص میکروسکوپی و تست تشخیص سریع در مقایسه با تست PCR در تشخیص پلاسمودیوم ویواکس در افراد مشکوک به مالاریا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۲۳): ۴۵۸-۴۵۲

مقدمه

مالاریا، یکی از شدیدترین بیماری‌ها در کشورهای در حال توسعه است و هر سال خسارت‌های جبران‌ناپذیر در سطح جهان در زمینه‌های اقتصادی و اجتماعی را موجب می‌شود. اغلب مرگ‌های ناشی از مالاریا به علت تشخیص غلط، دیرهنگام و یا در دسترس نبودن ابزار تشخیصی بوده است. یکی از دستورالعمل‌های کلیدی سازمان بهداشت جهانی برای کنترل همه جانبه‌ی مالاریا، تشخیص سریع، دقیق و درمان فوری بیماری است (۱).

تشخیص فوری مالاریا کمتر از ۴۸ ساعت پس از بروز اولین علائم، اصلی‌ترین استراتژی برنامه‌ی کنترل مالاریا در ایران می‌باشد که غالباً با روش تشخیص میکروسکوپی انگل درگسترش‌های خونی انجام می‌شود (۲). استاندارد طلایی (Gold standard) برای تشخیص انگل، هنوز روش آزمایش میکروسکوپی است (۳، ٤). اگرچه این روش تشخیصی راحت و بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دکترای تخصصی، گروه ژنتیک و سلولی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- کارشناس مرکز بهداشت استان اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دکترای تخصصی، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: زهرا غیور نجف‌آبادی: دکترای تخصصی، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: ghayour@med.mui.ac.ir

می‌باشد ولی دارای معایبی از قبیل حساسیت نسبتاً کم (توانایی تشخیص ۵۰-۱۰ انگل در هر میکرولیتر خون) است که می‌تواند ناشی از عواملی همچون میزان تبحر کارشناس آزمایشگاه و کیفیت رنگ‌آمیزی باشد. جهت تشخیص این بیماری علاوه بر روش میکروسکوپی تهیه‌ی گسترش خونی، می‌توان از آزمایش‌های سرولوژی نظیر ملانوفلوکولاسیون (Melano-flocculation)، هماگلوتیناسیون (Haemagglutination)، ایمنوفلورسانس (Immunofluorescent) و الایزا (ELISA) استفاده کرد. یکی دیگر از روش‌هایی که می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، روش تست‌های تشخیص سریع (Rapid diagnostic test) RDT می‌باشد. این روش به حداقل فضا و تجهیزات نیاز داشته و به راحتی قابل خوانش است (۵، ٦).

روش تست‌های تشخیص سریع می‌توانند مالاریا را تشخیص دهند، ولی گونه‌ی انگل را مشخص نمی‌کنند. این تست‌های تشخیصی در مناطقی که میکروسکوپ و یا میکروسکوپیست آموزش دیده در دسترس نیست، بسیار مفید هستند. به دلیل محدودیت‌های روش میکروسکوپی و RDT، روش‌های سرولوژی جدید و مولکولی توسعه یافته‌اند. در مواردی که به دلیل کمی انگل، تشخیص با روش میکروسکوپی امکان‌پذیر نباشد، از روش PCR (Polymerase chain reaction) می‌توان استفاده کرد، که دارای مزایای دیگری نظیر آنالیز گونه‌ها در سطح تشخیص گونه و سوش، تنوع ژنتیکی، بررسی مقاومت دارویی و حتی جهش‌های ژنتیکی می‌باشد (۷). مطالعه‌ی حاضر با هدف مقایسه‌ی حساسیت و ویژگی دو روش معمول و در حال استفاده‌ی میکروسکوپی و RDT با روش مولکولی PCR به عنوان یک روش حساس‌تر و با ویژگی بالاتر (۸) برای تشخیص مالاریای ناشی از پلاسمودیوم ویواکس می‌باشد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مقطعی، تعداد ۲۰۷ فرد مشکوک به بیماری مالاریا که به مراکز بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان طی سال‌های ۱۳۹٦ تا ۱٤۰۰ مراجعه کرده بودند، تحت بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که بیماری مالاریا در اصفهان بومی نمی‌باشد و اکثر موارد بیماری در اصفهان از نوع مالاریای وارده (Imported malaria) و بیشتر اتباع خارجی می‌باشند.

روش میکروسکوپی: از نوک انگشت هر فرد مشکوک، با لانست خون‌گیری شده و اسمیر نازک و ضخیم روی یک اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. نمونه‌ها با رنگ گیمسا، رنگ‌آمیزی و با عدسی X ۱۰۰ میکروسکوپ نوری اشکال مختلف انگلی (فرم رینگ، تروفوزوئیت در حال رشد و شیزونت نارس و وجود دانه‌های شوفنر) مورد بررسی قرار گرفتند.

همچنین به منظور تشخیص سریع‌تر و اقدام درمانی فوری، تست RDT نیز از مراجعین مشکوک به عمل می‌آید.

انجام تست تشخیص سریع (RDT): برای این کار از کیت Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo Card Test با شماره مرجع PQDx 0285-01000 استفاده گردیده است. مقدار ۵ میکرولیتر خون کامل با اپلیکاتور مخصوص داخل جایگاه نمونه به آرامی ریخته، سپس دو قطره از بافر نیز در جایگاه بافر اضافه می‌گردد و نتیجه بین ۲۰ تا ۳۰ دقیقه خوانش می‌شود. در صورتی‌که باند مقابل جایگاه C پر رنگ شده باشد نتیجه منفی، اگر باند C و P.f رنگی باشد، نتیجه فالسیپارم، اگر باند C و PAN رنگی باشد، انگل پلاسمودیوم شایع در منطقه مثبت است و اگر هر سه باند رنگی باشد، واکنش نشان‌دهنده‌ی وجود فالسیپاروم و دیگر پلاسمودیوم‌های شایع در منطقه است (شکل ۱).

شکل ۱. استفاده از کیت تشخیص سریع (Rapid diagnostic test) RDT

جهت آزمایشات تکمیلی نیز از هر فرد، ۲ سی‌سی خون همراه با (EDTA ماده‌ی ضدانعقاد) در یک لوله‌ی در پیچ‌دار استریل گرفته شد که پس از پایان کار و انجام آزمایشات درخواستی توسط پزشک مرکز، نمونه‌های حاوی ضد انعقاد در شرایط سرما (حفظ زنجیره سرد) به آزمایشگاه مرکز بهداشت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل گردید و تا هنگام استخراج DNA در فریزر منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند.

بررسی مولکولی نمونه‌ها با روش PCR: استخراج DNA از کیت FAVORGEN استفاده گردید و طبق دستورالعمل کیت، استخراج DNA صورت گرفت و سپس DNA به دست آمده در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت انجام PCR نگهداری شد.

انجام PCR: با توجه به اینکه بیش از ۹۵ درصد نمونه‌های مالاریا مثبت از نوع پلاسمودیوم ویواکس بود، از یکی از پرایمرهای اختصاصی ویواکس، به شماره (GenBank acc. no. NC_009914) محصول شرکت Metabion استفاده گردید:

پرایمر رفت: از قسمت '۵ به '۳ -(5´-CCCCAAAT TAACGTCCAAGTTCCAAG-3´)

پرایمر برگشت: از قسمت '۵ به '۳ -(5´- CGCAAGTGATTCAAATCGACGGAAC-3´)

برای تهیه‌ی محصول مورد واکنش، نسبت‌های مختلف از ترکیبات به شرح زیر تهیه گردید: مخلوط ۲۵ میکرو لیتری حاوی، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/٤ میکرو لیتر از هر پرایمر، ۹/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه و ۲ میکرو لیتر DNA استخراج شده بود. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد که از دستگاه BIORAD مدل T100 استفاده شد. مراحل مختلف به شرح ذیل در دستگاه فوق تعریف گردید:

۱- مرحله‌ی واسرشتگی: ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۳ دقیقه

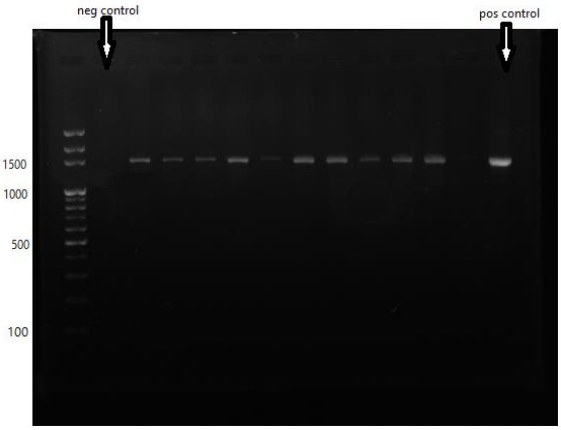
۲- مرحله‌ی اتصال: در یک چرخه‌ی ۳۵ سیکلی، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای مرحله‌ی واسرشتگی، ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه برای مرحله‌ی جفت شدن و مرحله‌ی طویل شدن به مدت ٤۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

۳- مرحله‌ی گرمایی نهایی به مدت ۳ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد.

شناسایی محصول: پس از انجام واکنش PCR مقدار ۳ میکرولیتر از محصول PCR در کنار لدر و یک نمونه‌ی منفی و یک نمونه‌ی مثبت (نمونه‌ای که قبلاً با روش توالی‌یابی پلاسمودیوم ویواکس بودن آن مشخص شده بود) روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز، برای ارزیابی باندها از دستگاه ترانس لومیناتور ساخت شرکت UVITEC استفاده شد و باندهای DNA مربوط به محصول PCR مشاهده گردید که در شکل ۲ جایگاه باند ۱۵۰۵bp در کنار مارکر وزنی و کنترل منفی و مثبت مشخص شده است.

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version 23, IBM Corporation, Armonk, NY) استفاده شد. برای بررسی اعتبار روش‌های مختلف ضمن محاسبه‌ی حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی، رسم منحنی ROC، از ضریب کاپا (κ) برای اندازه‌گیری میزان توافق تست‌ها استفاده شد. درجه‌ی توافق طبق رفرنس (۹) به صورت زیر تفسیر گردید:

(<۰/۲) ضعیف، (۰/٤۰-۰/۲۱) نسبتاً خوب، (۰/٦۰-۰/٤۱) متوسط، (۰/۸۰-۰/٦۱) خوب، (۸۱-۰/۱) خیلی خوب.



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد. Lader: ۱۰۰ جفت بازی، Con Neg: کنترل منفی، Con Pos: کنترل مثبت، ستون‌های ۱۱-۱ نمونه‌ی مبتلا به پلاسمودیوم ویواکس با باند ۱۵۰۵ bp

پژوهش حاضر برگرفته از داده‌های پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی به شماره‌ی ۳۹۹۹۸٤، مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.1074 می‌باشد.

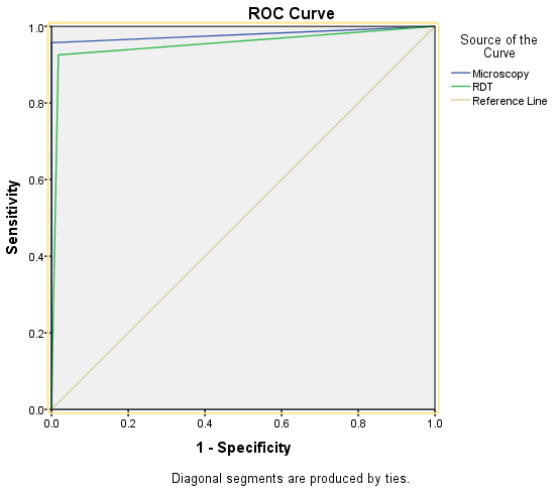
یافته‌ها

از تعداد ۲۰۷ نمونه‌ی مورد بررسی، تعداد ۹٤ نمونه با روش PCR پلاسمودیوم ویواکس تشخیص داده شد (شکل ۲). نتایج حاصل از میکروسکوپی با دو بار بازبینی توسط کارشناسان متبحر، ۹۰ مورد مثبت پلاسمودیوم ویواکس مشاهده شد که در مقایسه با روش مولکولی، ٤ مورد منفی کاذب گزارش گردید. حساسیت روش میکروسکوپی در مقایسه با PCR، معادل۹٦ درصد و با ویژگی ۱۰۰ درصد به دست آمد. از طرف دیگر نتایج RDT با ٦ منفی کاذب و ۲ مثبت کاذب در مقایسه با PCR، به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی معادل ۹٤ درصد و ۹۸/۲ درصد بود. مقادیر ارزش اخباری مثبت و منفی طبق فرمول ارائه شده در رفرنس (۱۰) محاسبه و در جدول ۱ ارائه گردید. همان طور که در منحنی ROC در (شکل۳) مشاهده می‌شود، روش میکروسکوپی ۹۹/۳ درصد و روش RDT ۹۵/٤ درصد، سطح مشترک را با روش PCR نشان می‌دهند. همچنین میزان توافق (ضریب کاپا) در روش میکروسکوپی ۰/۹٦ و در RDT، ۰/۹۱ می‌باشد.

جدول ۱. مقدار حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی آزمایش میکروسکوپی و تست تشخیص سریع در مقایسه با روش PCR به عنوان استاندارد

روش آزمایش	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)
میکروسکوپی	۹۶	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۶
RDT	۹۴	۹۸/۲	۹۷/۹	۹۵

RDT: Rapid diagnostic test



Area Under the Curve

Test Result Variable(s)	Area
Microscopy	.979
RDT	.954

The test result variable(s): Microscopy, RDT has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

شکل ۳. منحنی ROC و جدول سطح زیرمنحنی مقایسه‌ی دو روش میکروسکوپی (آبی) و RDT (سبز) با PCR (قهوه‌ای)

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، سه روش میکروسکوپی، RDT و PCR برای تشخیص بیماری مالاریا، مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد، روش میکروسکوپی و RDT نسبت به PCR به ترتیب دارای حساسیت ۹۶ و ۹۴ درصد و ویژگی ۱۰۰ و ۹۸/۲ درصد می‌باشند. بسیاری از مطالعات حساسیت و ویژگی بالاتر PCR را در مقایسه با روش میکروسکوپی نشان داده‌اند. در مطالعه‌ی حاضر، روش PCR نه تنها تمام موارد مثبت میکروسکوپی، مواردی از عفونت‌هایی با بار انگلی پایین که با روش میکروسکوپی تشخیص داده نشده بود، را شناسایی کرد. این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعات دیگران همخوانی داشت (۱۳-۱۱).

تشخیص میکروسکوپی مالاریا همچنان به عنوان استاندارد طلایی تشخیص آزمایشگاهی مالاریا مورد توجه است، اما این روش دارای نقاط ضعفی می‌باشد. در مطالعات مختلف ضعف روش میکروسکوپی در تشخیص مالاریای توأم (Mix) و برتری روش PCR در تشخیص این موارد (حدود ۱٤درصد) گزارش گردیده که در بیشتر موارد به دلیل کم دقتی، عدم تبحر و تعجیل کارشناس آزمایشگاه در گزارش مورد مثبت بوده است (۱٤، ۱۵).

بر اساس گزارش‌های مورد بررسی در منابع علمی، میزان اشتباه در تشخیص انگل و به خصوص اشتباه در تشخیص عفونت توأم در ایران بطور چشمگیر گزارش شده است (۱۸-۱٦). در مطالعه‌ی حاضر، نتایج روش میکروسکوپی با دو بار بازبینی توسط کارشناسان متبحر در مقایسه با روش مولکولی تفاوت چندانی از نظر تعداد نداشت و تنها در ٤ نمونه نتایج متفاوت داشتند، که ٤ مورد منفی کاذب گزارش گردید. بنابراین، نتایج نشان داد که روش مولکولی (PCR) دارای حساسیت و ویژگی بالاتری برای تشخیص انگل‌های مالاریا است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر همچنین نشان داد، میزان توافق (ضریب کاپا) در روش میکروسکوپی (۰/۹٦) و RDT (۰/۹۱) بالا می‌باشد و هر دو روش از میزان توافق خیلی خوب (۹) با روش PCR برخوردارند. در یک تحقیق در سنگال، ۲۷۳ نمونه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که مقایسه بین RDT و اسمیر ضخیم ۱۹ اختلاف را نشان داد (٤ منفی کاذب و ۱۵ مثبت کاذب). حساسیت آنتی‌ژن مالاریا RDT Pf® در مقایسه با PCR (۹۷/۱ درصد) و ویژگی (۹٦/۹ درصد) و حساسیت RDT در مقایسه با اسمیر ضخیم، (۹۸/۲ درصد) بود (۱۹). نتایج مطالعه‌ی حاضر، حساسیت و ویژگی روش RDT را در مقایسه با PCR به ترتیب ۹٤ و ۹۸/۲ درصد نشان داد که تقریباً با مطالعه‌ی (۱۹) همخوانی داشت.

در سال‌های اخیر در مناطق مختلف جهان، مقایسه‌ی کیت تشخیص سریع آنتی‌ژن مالاریا RDT با اسمیر ضخیم و PCR، به ترتیب حساسیت‌های خوبی را بین ۹۸/۲ و ۹۷/۲ درصد نشان داد که عملکرد مناسب این روش را تأیید می‌کند (۲۱-۲۰). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، کیت RDT در تشخیص مالاریا دارای حساسیت ۹٤ درصد و نیز سطح مشترک ۹۵/٤ درصد در مقایسه با روش PCR (منحنی ROC شکل ۳) می‌باشد. همچنین نتیجه‌ی میزان توافق خیلی

خوب روش RDT در مقایسه با PCR بدست آمد. بنابراین با توجه به نتایج و با در نظر گرفتن مزایای روش RDT که استفاده از آن ساده و آسان است، نگهداری آن‌ها در دمای محیط امکان‌پذیر می‌باشد و به ابزار و تجهیزات تخصصی جهت تشخیص نیاز ندارد. به ویژه در مناطقی که با کمبود آزمایشگاه‌های مجهز و کارشناس آزمایشگاهی کارآزموده روبه‌رو است، این روش می‌تواند به عنوان یک استراتژی در مدیریت بیماری مالاریا کاربرد گسترده‌تری پیدا کند. با این حال، وجود یک سیستم کنترل کیفیت برای نظارت بر عملکرد و کیفیت کیت‌ها و آموزش کارکنان به ویژه برای واحدهای بهداشتی ضعیف، امری ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که روش RDT به نسبت از حساسیت و ویژگی، سطح مشترک بالا و میزان توافق خیلی خوب در مقایسه با میکروسکوپی و PCR برخوردار بود و قادر است بر حسب شرایط و امکانات هر منطقه در کنار روش میکروسکوپی و یا جایگزین این روش بکار گرفته شود، به خصوص در مناطقی که امکان استقرار آزمایشگاه نباشد، می‌توان از روش RDT بهره‌مند شد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از داده‌های پایان‌نامه کارشناسی ارشد انگل‌شناسی به شماره‌ی ۳۹۹۹۸٤، مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.1074 می‌باشد. از همکاری معاونت پژوهشی، گروه انگل‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی و مراکز بهداشتی استان اصفهان و بیماران تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. World Health Organization. World malaria report 2022. Geneva, Switzerland: WHO; 2022.
2. Shahbazi A, Raeisi A, Mirhendi SH, Asgharzadeh M, Sadeghi Bazargani H. Validation of microscopic diagnosis of malaria in field laboratories of malarious areas of Iran by Nested PCR [in Persian]. Hormozgan Med J 2009; 13(3): 166-72.
3. Basu S, Sahi PK. Malaria: an update. Indian J Pediatr 2017; 84(7): 521-8.
4. Warrell DA, Gilles HM. Rationale and technique of malaria control. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. Essential malariology. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2017. p. 107-90.
5. Berzosa P, de Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. Malar J 2018; 17(1): 333.
6. Siahaan L. Laboratory diagnostics of malaria. Proceeding of the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science; 2018 Mar 1; Bristol, England: IOP Publishing.
7. Fitri LE, Widaningrum T, Endharti AT, Prabowo MH, Winaris N, Nugraha RY. Malaria diagnostic update: From conventional to advanced method. J Clin Lab Anal 2022; 36(4): e24314.
8. Slater L, Ashraf S, Zahid O, Ali Q, Oneeb M, Akbar MH,et al. Current methods for the detection of Plasmodium parasite species infecting humans. Curr Res Parasitol Vector Borne Dis 2022; 2: 100086.
9. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Fam Med 2005; 37(5): 360-3.
10. Shreffler J, Huecker MR. Diagnostic testing accuracy: Sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
11. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva, Switzerland: WHO; 2019.
12. Hommel M. Diagnostic methods in malaria. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. Essential malariology. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2017. p. 35-58.
13. Mbanefo A, Kumar N. Evaluation of malaria diagnostic methods as a key for successful control and elimination programs. Trop Med Infect Dis 2020; 5(2): 102.
14. 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(4): 535-43.
15. Das S, Rajkumari N, Revathi U, Gururajan A. Comparision of the various routine diagnostic modalities of malaria and a new method: the Parasight™ platform. J Parasit Dis 2020; 44(3): 528-35.
16. 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(3): 336-42.
17. 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(1): 61-4.
18. Zakeri S, Talebi Najafabadi S, Zare A, Dinparast Djadid N. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. Malar J 2002; 1(1): 2.
19. Faye B, Nath-Chowdhury M, Tine RC, Ndiaye JL, Sylla K, Camargo FW, et al. Accuracy of HRP2 RDT (Malaria Antigen Pf®) compared to microscopy and PCR for malaria diagnosis in Senegal. Pathog Glob Health 2013; 107(5): 273-8.
20. Charpentier E, Benichou E, Pagès A, Chauvin P, Fillaux J, Valentin A, et al. Performance evaluation of different strategies based on microscopy techniques, rapid diagnostic test and molecular loop-mediated isothermal

amplification assay for the diagnosis of imported malaria. Clin Microbiol Infect 2020; 26(1): 115-21.

21. Rogier E, Hamre KE, Joseph V, Plucinski MM, Presume J, Romilus I, et al. Conventional and high-sensitivity malaria rapid diagnostic test performance in 2 transmission settings: Haiti 2017. J Infect Dis 2020; 221(5): 786-95.

DOI: *10.48305/jims.v41.i723.0452*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 723, 3rd Week, August 2023**

Received: 22.02.2023 Accepted: 09.07.2023 Published: 12.08.2023

Evaluation of Microscopic Method and Rapid Diagnostic Test Compared to Polymerase Chain Reaction Test in the Detection of *Plasmodium Vivax* Parasite in Suspected Malaria Cases

Mahmood Sadeghi[1], Mohammad Kazemi[2], Amirreza Zahirmirdamadi[3], Elham Heidari[3], Zahra Ghayour Najafabadi[4]

Original Article

Abstract

Background: This study was carried out with the aim of evaluating the rapid diagnostic test (RDT) and microscopic method in comparison with PCR in the detection of *Plasmodium vivax* parasites in suspected malaria cases.

Methods: In a cross-sectional study, out of 207 febrile patients suspected of malaria, for microscopic diagnosis, blood sample was taken from each person's finger and spread, and after staining with Giemsa dye, were examined with a 100 X optical microscope lens. Whole blood samples were collected from all suspected individuals and rapid diagnostic test (RDT), and also DNA extraction and PCR was performed. To check the validity of different methods while calculating sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, drawing ROC curve, Kappa coefficient (κ) was used to measure the agreement of the tests.

Findings: In this study, microscopy and RDT compared to PCR have sensitivity of 96% and 94% and specificity of 100% and 98.2%, respectively also, the kappa coefficient in the microscopic method is 0.96 and the RDT was 0.91.

Conclusion: Considering the values of sensitivity and specificity, as well as the high kappa coefficient in the microscopic method and RDT, both methods have a very good agreement with the PCR.

Keywords: Malaria; PCR; RDT; *Plasmodium vivax*

Citation: Sadeghi M, Kazemi M, Zahirmirdamadi A, Heidari E, Ghayour Najafabadi Z. **Evaluation of Microscopic Method and Rapid Diagnostic Test Compared to Polymerase Chain Reaction Test in the Detection of *Plasmodium Vivax* Parasite in Suspected Malaria Cases.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(723): 452-8.

1- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD, Department of Genetic, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Health Vice Chancellery of Isfahan Medical University, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Zahra Ghayour Najafabadi, PhD, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: ghayour@med.mui.ac.ir