

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO			
RAD:	11-121405- -5	FECHA:	2013-09-20 16:22:16
DEP:	2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE:	378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA:	11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS:	7
ACT:	519 PRESENTACION		

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
LUZ CLEMENCIA SUAREZ DE PAEZ

Asunto: Radicación: 11-121405- -5
 Trámite: 11
 Evento: 378
 Actuación: 519
 Oficio: 18207
 Folios: 7

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	PCT/IN2010/000049				
Fecha de Presentación Internacional	27/01/2010				

Como resultado del examen de fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado No 11- 121405-00000-0000	19/Septiembre/2011
Reivindicaciones:	Radicado No 11- 121405-00000-0000	19/Septiembre/2011
	Radicado No 11- 121405-00003-0000	28/Diciembre/2011
Secuencias	Radicado No 11- 121405-00000-0000	19/Septiembre/2011
Dibujos:	Radicado No 11- 121405-00000-0000	19/Septiembre/2011
Prioridad:	IN 00421/che/2009	24/Febrero/2009

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque ésta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Modificaciones no aceptadas (Art 34 D 486 y Art 19, 22 y 34 PCT)

Las modificaciones de las reivindicaciones 1 – 18, folios 68 – 70, no son aceptadas porque mencionan cebadores de SEQ ID Nos 4 a ó 4b, que no habían sido considerados inicialmente, no hay divulgación en la descripción de cebadores con dichas secuencias, por lo cual amplían el objeto de la solicitud.

4. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del capítulo primero del Título 10 de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada.

En el presente caso se estudiarán las reivindicaciones desde la 1 a 21 (Radicado No 11-121405-00000-0000).

Título de la solicitud: “Sondas y Cebadores para la detección de malaria”.

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de proporcionar método para detectar y cuantificar infección por malaria.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona sondas de oligonucleótidos, cebadores, y un método de detección de la infección de malaria.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C12Q1/68; G01N33/48

5. No es una invención (Art 15 D 486 literal (b))

El objeto de las reivindicaciones 1 – 2 no se considera una invención, de acuerdo con el Art citado

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

- 1- La reivindicación 13 carece de claridad, el término “opcionalmente” no limita el alcance de la reivindicación, por lo tanto no se distingue la invención del estado de la técnica
- 2- La reivindicación 20 carece de sustento en la descripción, porque el equipo no está divulgado ni en la descripción ni en los dibujos como característica esencial de la invención.
- 3- La reivindicación 21 que reclama un método presenta falsa dependencia de la reivindicación 20 que reclama un equipo. Se sugiere realizar la corrección correspondiente.

Descripción (Art 28 D 486)

En la descripción se observa que el objeto de la solicitud es un método de diagnóstico y no una mezcla de reacción.
 La descripción no divulga la invención de manera suficientemente completa para que la persona del oficio normalmente versada en la materia pueda ejecutarla ó reproducirla.

Debido a que la solicitud se refiere a material biológico, es necesario presentar el Certificado de Depósito para la cepa de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*.

Se requiere al solicitante hacer las aclaraciones necesarias.

6. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: febrero 24 de 2009 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	Nature; Pág 498-511.	“Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.”	3/Octubre/2002
D2	Journal of clinical microbiology. Vol 40. No 11 Pág. 4343-4345	“Real-Time Fluorescence-Based PCR for Detection of Malaria Parasites	Noviembre /2002

El documento D1¹divulga secuencias nucleótidas de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* (Pág. 498-511.).

El documento D2² divulga PCR en tiempo real que comprende: c Primers y sondas etiquetadas para la detección de la malaria. (Pág. 4343-4345)

7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 7 consiste en “cebadores que tienen secuencias SEQ ID Nos 4 o 10, 5, 6, 7, 8 y 9”.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:.

Características esenciales	D1
Primer de secuencia SEQ ID No 4. TGGAACGAATTCCCTTTTGG	<i>Plasmodium falciparum</i> Query 1 TGGAACGAATTCCCTTTTGG 20 Sbjct 1100607 TGGAACGAATTCCCTTTTGG 1100626
Cebador de secuencia de SEQ ID No 5 CAAACAAGTATACATAGTGTTGC CAAAC	<i>Plasmodium falciparum</i> Query 1 CAAACAAGTATACATAGTGTTGCCAAAC 28 Sbjct 6109

11 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368867>

2 <http://jcm.asm.org/content/40/11/4343.full.pdf+html>

	CAAACAAGTATACATAGTGTGGCAAAC 6136
Cebador de secuencia de SEQ ID No 6 GCGGATTACGCATCAGTTA	<i>Plasmodium vivax</i> Query 1 GCGGATTACGCATCAGTTA 20 Sbjct 247 GCGGATTACGCATCAGTTA 266
Cebador de secuencia de SEQ ID No 7 CGCATTTCTCACTTGTTCCA	<i>Plasmodium falciparum</i> Query 1 CGCATTTCTCACTTGTTCCA 20 Sbjct 1100757 CGCATTTCTCACTTGTTCCA 1100738
Cebador de secuencia de SEQ ID No 8 TGTTACCACTATGTGTCTCATTTTCC	<i>Plasmodium falciparum</i> Query 1 TGTTACCACTATGTGTCTCATTTTCC 26 Sbjct 41641 TGTTACCACTATGTGTCTCATTTTCC 41616
Cebador de secuencia de SEQ ID No 9 TATCCGAATGGTAAAGCAAATAAGTG	<i>Plasmodium vivax</i> Query 1 TATCCGAATGGTAAAGCAAATAAGTG 27 Sbjct 370 TATCCGAATGGTAAAGCAAATAAGTG 344
Cebador de secuencia de SEQ ID No 10	<i>Plasmodium falciparum</i> Query 1 GTCAAATACAAGACCAAGAAACC 23 Sbjct 1100630 GTCAAATACAAGACCAAGAAACC 1100652

Las características esenciales de los cebadores de la reivindicación 7 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual revela las secuencias de los cebadores SEQ ID Nos 4, 10, 5, 6, 7, 8 y 9.(Pág. 4343-4345).

En consecuencia, la reivindicación 7 no es nueva o carece de novedad, según lo divulgado en el documento D1.

Las reivindicaciones dependientes 8 y 9 no mencionan alguna característica que hagan nuevo a los cebadores de la reivindicación 7, por lo cual se considera que no son nuevas.

Nivel inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 3 consiste en “las sondas como se reivindica en la reivindicación 1 en donde dichas sondas se conjugan con etiquetas detectables que tienen fluoruro en el extremo 5 y un extintor en la región interna o en el extremo 3”.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D2
Sondas etiquetada para la detección de la malaria que tienen secuencias SEQ ID Nos 1, 2, 3, que tienen fluoruro en el extremo 5 y un extintos en la región interna o en el extremo 3.	Sondas etiquetadas para la detección de la malaria 5'-TCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGA-3'

El documento D2 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 3 porque divulga sondas etiquetadas para la detección de la malaria 5'-TCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGA-3', (Pág. 4343), además divulga que en el extremo 5 tienen carboxifluorosceína y extintor tetrametil- 6 carboxirodamina.

La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 3 y las sondas de D1 consiste en las secuencias SEQ ID Nos 1, 2, 3.

El efecto que logra el incluir sondas con las secuencias SEQ ID Nos 1, 2, 3 es la detección de la malaria.

Por lo tanto el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: Cómo modificar las sondas del documento D1 para la detección de la malaria.

Sin embargo la utilización de sondas en la detección de la malaria, ya está divulgada en el documento D1 que se refiere a sondas etiquetadas para la detección de la malaria 5'-TCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGA-3', (Pág. 4343), además divulga que en el extremo 5 tienen carboxifluorosceína y extintor tetrametil- 6 carboxirodamina (Pág. 4343),

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría sondas etiquetadas para la detección de la malaria del documento D1 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 4-6 no mencionan características adicionales, por lo cual tampoco tienen nivel inventivo.

Conclusión:

La reivindicación 3 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 20 consiste en *“un equipo para la detección de la infección de malaria, dicho equipo comprende sondas etiquetadas duales de las SEQ ID Nos 1, 2 y3 individualmente o en combinación; que corresponde al par de cebadores de las SEQ ID Nos 4 o 10, 5, 6, 7, 8 y 9 individualmente o en combinación y reactivos de amplificación”*.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D2
Equipo para detección de malaria que comprende:	PCR en tiempo real que comprende: (Pág. 4344)
Sondas etiquetadas duales de las SEQ ID Nos 1, 2 y3 individualmente o en combinación; que corresponde al par de cebadores de las SEQ ID Nos 4 o 10, 5, 6, 7, 8 y 9 individualmente o en combinación y reactivos de amplificación”.	Primers y sondas etiquetadas para la detección de la malaria (Pág. 4344)

El documento D2 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 3 porque divulga PCR en tiempo real que comprende, Primers y sondas etiquetadas para la detección de la malaria. (Pág. 4344)

La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 20 y el equipo de D1 es que emplea sondas etiquetadas duales de las SEQ ID Nos 1, 2 y3 individualmente o en combinación; que corresponde al par de cebadores de las SEQ ID Nos 4 o 10, 5, 6, 7, 8 y 9 individualmente o en combinación y reactivos de amplificación.

El efecto que logra el incluir sondas etiquetadas duales de las SEQ ID Nos 1, 2 y3 individualmente o en combinación; que corresponde al par de cebadores de las SEQ ID Nos 4 o 10, 5, 6, 7, 8 y 9 individualmente o en combinación y reactivos de amplificación es la detección y cuantificación de la malaria.

Por lo tanto el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: Cómo modificar el PCR en tiempo real del documento D1, para detectar y cuantificar la malaria.

Sin embargo la utilización de PCR en tiempo real con sondas etiquetadas y primers para la detección y cuantificación de la malaria, ya está divulgada en el documento D1 que se refiere a primers y sondas etiquetadas para la detección de la malaria. (Pág. 4344)

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría sondas etiquetadas y primers en equipo para la detección y cuantificación de la malaria del documento D1 para llegar así al objeto de la reivindicación 20 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Conclusión:

La reivindicación 21 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

Aplicación industrial (Art 19 D 486)

Las reivindicaciones 10 – 19 y 21 no tienen aplicación industrial de acuerdo al artículo citado.

8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Nature; Pág 498-511	7-9	Novedad
D2	Journal of clinical microbiology. Vol 40. No 11 Pág. 4343-4345I	3-6, 20	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2013-09-24

Elaboró: Edna Milena Bautista Rodriguez
Revisó: Jeny Paola Villate Becerra

Real-Time Fluorescence-Based PCR for Detection of Malaria Parasites

May-Ann Lee, Chiew-Hoon Tan, Lay-Tin Aw, Choon-Siang Tang, Mulkit Singh, Sze-Hee Lee, Hwee-Pin Chia and Eric P. H. Yap

J. Clin. Microbiol. 2002, 40(11):4343. DOI:
10.1128/JCM.40.11.4343-4345.2002.

Updated information and services can be found at:
<http://jcm.asm.org/content/40/11/4343>

REFERENCES

These include:

This article cites 10 articles, 4 of which can be accessed free at:
<http://jcm.asm.org/content/40/11/4343#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Real-Time Fluorescence-Based PCR for Detection of Malaria Parasites

May-Ann Lee,^{1*} Chiew-Hoon Tan,¹ Lay-Tin Aw,¹ Choon-Siang Tang,¹
Mulkit Singh,² Sze-Hee Lee,³ Hwee-Pin Chia,⁴
and Eric P. H. Yap¹

Defence Medical Research Institute, Defence Science and Technology Agency,¹ and Department of Microbiology² and Department of Community and Occupational Medicine,⁴ National University of Singapore, Singapore 117597, and Division of Haematology, National University Hospital, Singapore 119074³

Received 17 April 2002/Returned for modification 7 June 2002/Accepted 5 August 2002

A fluorescence-based real-time 5' nuclease PCR capable of detecting all four human malaria parasites was developed to screen large numbers of samples during an outbreak to prevent further transmission of malaria. The effectiveness of antimalarial therapy for malaria patients can be monitored by determining the reduction of parasitemia by this method.

Malaria is a major tropical infection causing up to 500 million clinical cases and 2.7 million deaths per year worldwide. For proper treatment of malaria patients, accurate and rapid diagnosis of malaria is essential. The microscopic examination of a blood smear is the "gold standard" for malaria diagnosis. The method is sensitive and specific but laborious and time-consuming (6). Alternative methods, such as PCR and rapid antigen capture assays (ParaSight F test, OptiMAL rapid malaria test, and ICT Malaria P.f/P.v), have been developed. A PCR to detect *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* was previously developed and evaluated (1, 7, 8, 9). We have developed a method for malaria diagnosis that can be adapted for high-throughput rapid screening of hundreds of samples with a sensitivity and specificity comparable to those of the microscopic method. The method is a fluorescence-based real-time 5' nuclease PCR based on the TaqMan technology (Roche Molecular Diagnostics Systems) (3, 4), with primers and a probe from the small-subunit (SSU) rRNA gene.

Malaria samples. Clinical blood samples were obtained from the Malaria Reference Center in the Department of Microbiology, National University of Singapore. Clinical samples of patients undergoing treatment were obtained from the National University Hospital, Singapore. The Gombak A strain of *P. falciparum* (5) was cultured by the method of Trager and Jensen (10). Two *P. ovale* (Po1 and Po2) and three *P. malariae* (Pm1, Pm2, and Pm3) samples were obtained.

DNA extraction. DNA was extracted from 200 μ l of EDTA-treated blood samples with a QIAamp DNA blood minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4°C.

Sequences of primers and probes. Primers (Mach 60 [5'-ACATGGCTATGACGGGTAACG-3'] and Mach 61 [5'-TGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCTA-3']) and a probe (Mach 62 [5'-TCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGA-3']) were designed to detect the SSU rRNA genes of all four human malarial

species (accession numbers M19172 for *P. falciparum*, X13926 for *P. vivax*, M54897 for *P. malariae*, and L48987 for *P. ovale*). The probe was labeled with a reporter dye, FAM (5-carboxy-fluorescein), and a quencher dye, TAMRA (*N,N,N,N*-tetramethyl-6-carboxyrhodamine) (Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

5' nuclease PCR. Five microliters of DNA, 900 nM Mach 60, 300 nM Mach 61, 200 nM Mach 62, and 1 $\times$ TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems) in a total reaction volume of 25 μ l were amplified on an iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). The following conditions were used for PCR: an initial denaturation at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The cycle threshold value (C_T) indicates the cycle where the fluorescence detected from the amplification of the quantity of the target gene exceeded the preset threshold.

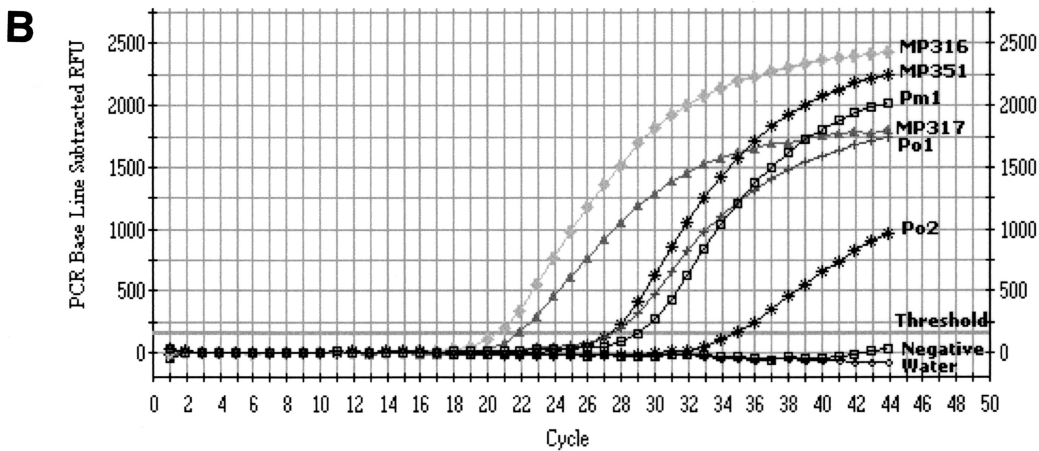
Specificity. The primers amplified an 84-bp fragment from DNA prepared from *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, and *P. ovale* samples (Fig. 1A). The probe, designed specifically to detect the amplified PCR fragment, gave an increased fluorescent signal as the PCR progressed (Fig. 1B). The specificity of the method was evaluated with 153 blood samples, and the method was compared with blood film microscopic examination (Table 1). One hundred twenty-five samples were positive by both blood film examination and the fluorescence-based PCR method. Two other samples were positive by PCR but negative by blood film examination. These two samples were from patients who were undergoing antimalarial therapy, and the blood film method failed to detect the small amount of parasite DNA present on the last day of treatment; the PCR method, being more sensitive, could detect the parasites. All 26 samples that were negative by blood film were also negative by PCR. The positive samples had C_T values of 16 to 37, while the negative samples had C_T values greater than 38.

Sensitivity. The sensitivity of the method was determined by fivefold dilution of genomic DNA isolated from the cultured Gombak A strain of *P. falciparum*. Fluorescence can be detected from 90 ng (C_T , 16) to 0.002 pg (C_T , 35) of *P. falciparum*

* Corresponding author. Mailing address: Defense Medical Research Institute, 10 Medical Dr., #02-04, Singapore 117597. Phone: (65) 6778 7396. Fax: (65) 6779 1677. E-mail: nmiv13@nus.edu.sg.



FIG. 1. Specificity of the PCR-based method for detecting four species of human malaria parasites. (A) Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products with SSU rRNA primers. Lanes: MP 317 and MP316, *P. falciparum* samples; MP 351, *P. vivax* sample; Po1 and Po2, *P. ovale* samples; Pm3, *P. malariae* sample; NC, noninfected sample (negative control); H₂O, no-template control; M, molecular size markers. (B) Amplification plot for the samples listed in the legend for panel A, with the threshold being set at 150 relative fluorescence units (RFU).



DNA. The amount of 0.002 pg of *P. falciparum* DNA is equivalent to 0.1 parasite, based on one genome equivalent of the parasite being 0.02 pg (2). The assays were repeated seven times and found to be reproducible, with the C_T value varying from 34 to 36 for 0.002 pg of DNA.

Monitoring antimalarial treatment. The PCR method was used to monitor the progress of the antimalarial treatment of three patients and compared with the microscopic examination of blood film. The numbers of parasites in the patients undergoing treatment were determined daily with fluorescence-based PCR and blood film methods. The parasitemia determined from the blood film for one patient fell from 0.45 to 0% from days 1 to 5 of treatment. The fluorescence PCR method indicated that the number of parasites detected fell from 2×10^4 parasites to 0.17 parasite per 5 μ l of blood from days 1 to

5, with the serially diluted cultured Gombak A strain being used as the standard. Both methods could monitor the reduction of parasitemia during the course of treatment, though the fluorescence-based PCR method was more sensitive and could detect very small numbers of parasites from the samples on the day before the patients were discharged. Similar results were obtained for two other patients undergoing antimalarial therapy (data not shown).

In summary, a real-time fluorescence PCR method with specific primers and a labeled probe of the SSU rRNA gene was developed for the detection of malaria parasites. This method has a sensitivity of 0.002 pg of *P. falciparum* DNA, which is equivalent to 0.1 parasite. The method is also specific for all *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. vivax* parasites, since all the samples that tested positive by blood film were also positive by real-time PCR.

The method would be useful in monitoring the effectiveness of antimalarial therapy, especially in situations where drug-resistant strains of the parasites are prevalent. Determining parasitemia by microscopy could be subjective, depending on the technician counting the numbers of parasites and red blood cells, and could vary from person to person and from day to day. The real-time PCR will provide an objective method for determining the parasitemia in the samples.

The method developed in this study will be useful in countries where malaria is not endemic and there is a lack of skilled technicians. A large number of negative samples may need to be screened for malaria as a measure to prevent further transmission of malaria. This was demonstrated in a recent malaria outbreak in Singapore, where 242 samples from asymptomatic

TABLE 1. Comparison of fluorescence-based PCR assays with microscopic blood film examination for detection of malaria parasites in blood samples

Species	No. of samples detected by:	
	Blood film	Fluorescence-based PCR
<i>P. falciparum</i>	42	42
<i>P. vivax</i>	74	76
<i>P. ovale</i>	2	2
<i>P. malariae</i>	3	3
Mixed species	4	4
None (negative)	28	26
Total	153	153

individuals suspected of harboring the malaria parasites were screened. One positive malaria case was detected by PCR but not from blood film examination (data not shown).

Victor Koh provided technical support for this study. For malaria samples, we are grateful to Mak Jeon Wah and Patricia Lim, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur, Malaysia; Bill Collins, Malaria Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.; and M. Kimura, Institutes of Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

This work was supported by the Defence Medical Research Institute, Defence Science and Technology Agency, and the Singapore Armed Forces.

REFERENCES

1. Das, A., B. Holloway, W. E. Collins, V. P. Shama, S. K. Ghosh, S. Sinha, S. E. Hasnain, G. P. Talwar, and A. A. Lal. 1995. Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria parasites. *Mol. Cell. Probes* 9:161–165.
2. Goman, M., G. Langsley, J. E. Hyde, N. K. Yankovsky, J. W. Zolg, and J. G. Scaife. 1982. The establishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and identification of individual clones by hybridization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5:391–400.
3. Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986–994.
4. Livak, K. J., S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4:357–362.
5. Mak, J. W., P. K. C. Lim, M. A. J. A. Tan, P. L. W. Lam, A. Noor Rain, G. D. Selvadurai, and K. Hanjeet. 1987. Parasitological and serological surveys for malaria among the inhabitants of an aborigine village and an adjacent Malay village. *Acta Trop.* 44:83–89.
6. Payne, D. 1988. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull. W. H. O.* 66:621–626.
7. Sethabur, O., A. E. Brown, S. Panyim, K. C. Kain, H. K. Webster, and P. Echeverria. 1992. Detection of *Plasmodium falciparum* by polymerase chain reaction in a field study. *J. Infect. Dis.* 166: 145–148.
8. Snounou, G., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaitong, and K. N. Brown. 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58:283–292.
9. Tham, J. M., S. H. Lee, T. M. C. Tan, R. C. Y. Ting, and U. A. K. Kara. 1999. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria Pf tests in a clinical environment. *J. Clin. Microbiol.* 37:1269–1273.
10. Trager, W., and J. B. Jensen. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673–675.