

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİNDE SİTMALILARDA VE SİTMA RİSKİ
ALTINDA OLANLARDA İNDİREK FLORESAN ANTİKOR
TEKNIĞİ (IFAT) İLE *PLASMODİUM VIVAX*'A KARŞI
OLUŞAN ANTİKORLARIN GÖSTERİLMESİ

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF.DR.KADRI ÖZCAN

DOKTORA TEZİ

BİLİM UZMANI
İSMAİL SONER KOLTAŞ

ADANA - 1995

33/41

KABUL VE ONAY SAYFASI

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından Parazitoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

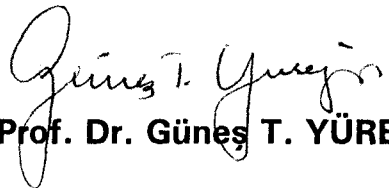
21 Mart 1995

Başkan : Prof. Dr. Kadri ÖZCAN

Üye : Prof. Dr. Ergene BÜGET

Üye : Doç. Dr. Pauline AKSUNGUR

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
12.4.1995.... gün ve 10/22-4 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Güneş T. YÜREĞİR
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER	Sayfa No:
İÇİNDEKİLER	I-II
TABLO LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
ÖZ	V
ABSTRACT	VI
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1-2
2.GENEL BİLGİLER	3-20
2.1.Organizmanın tanımı	3-4
2.2.Karaciğerdeki gelişme şekilleri	4
2.3.Alyuvarlardaki gelişme şekilleri	4-5
2.4.Anofeldeki gelişme şekilleri	6-8
2.5.Patogenez	8-9
2.6.Klinik belirtiler	9-10
2.7.Sıtmada bağışıklık	10-11
2.8.Sıtmada tanı	11-12
2.9.Sıtmanın serolojik tanısı	12-13
2.9.1.işaretleme ilkesine dayanan yöntemler	13
2.9.1.1.İndirek floresan antikor tekniği (IFAT)	14-16
2.9.1.2.Radio-immünoassay (RIA) yöntemi	16-17
2.9.1.3.Enzyme-linked immunosorbent assay (ELİSA) yöntemi.....	17
2.9.2.İndirek hemaglutinasyon (IHA) yöntemi	17-18
2.9.3.Kompleman birleşmesi deneyi (KBD)	18
2.9.4.İmmünodiffüzyon (İD)	18-19
2.9.5.İmmünoelektroforez (İE)	19
2.9.5.1.Counter current immünoelektroforez (CCIE)	19
2.9.5.2.Crossed immünoelektroforez (Laurell Tekniği)	19
2.9.6.Şizont ile infekte hücrelerin aglutinasyonu (SICA)	19
2.9.7.İn vitro büyümeyi önleyen test	19-20

3.GEREÇ VE YÖNTEM	21-23
3.1. Antijenin hazırlanması	21
3.1.1. Homolog antijenin hazırlanması	21-22
3.1.2. Heterolog antijenin hazırlanması	22
3.2. Testin uygulanması	22-23
4.BULGULAR	24-32
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	33-38
6.ÖZET	39
7.İNGİLİZCE ÖZET	40
8.KAYNAKLAR	41-45
9.ÖZGEÇMİŞ	46



Tablo-I. 652 kişinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.....	24
Tablo-II. Kalın damla incelemesi yapılan 441 parazitli ve 211 parazitsiz olgunun IgG ve IgM antikorları yönünden karşılaştırılması (IgG ve IgM değerleri aynı kişiden elde edilen değerlerdir).....	25
Tablo-III. Kalın damla incelemesi sonucu <i>P.vivax</i> saptanan olgularda homolog antijen ile elde edilen IFAT IgG değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.....	27
Tablo-IV. Kalın damla incelemesi sonucu <i>P.vivax</i> saptanan olgularda homolog antijen ile elde edilen IFAT IgM değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.....	27
Tablo-V. Kalın damla incelemesi sonucu <i>P.vivax</i> saptanan olgularda heterolog antijen ile elde edilen IFAT IgG değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.....	28
Tablo-VI. Kalın damla incelemesi sonucu <i>P.vivax</i> saptanamayan olgularda homolog antijen ile elde edilen IFAT IgG değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.....	29
Tablo-VII. Kalın damla incelemesinde parazit bulunan ve bulunmayan gruplarda daha önceki yıllarda sıtma geçiren ve geçirmeyenlerin, ayrıca elde edilen antikorların oranları.....	30
Tablo-VIII. Sıtma tanısı konduğunda ve 60 gün sonrasında alınan serum örneklerinde homolog antijen ile elde edilen antikorlar.....	31

Şekil-1. Sıtmalı ve sıtmasız 652 kişinin yaş gruplarına göre dağılımı.....	24
Şekil-2. Kalın damlada parazit bulunan ve bulunmayan gruplarda, homolog ve heterolog antijenlerle <i>P. vivax</i> sıtmasına karşı elde edilen antikorların karşılaştırılması.....	26
Şekil-3. Sıtma saptanan olgularda homolog antijen ile elde edilen IgG ve IgM tipi antikorların karşılaştırılması.....	28
Şekil-4. Sıtma saptanan olgularda heterolog antijen ile elde edilen IgG antikorları.....	29
Şekil-5. Sıtmasız grupta homolog antijen ile elde edilen IgG antikorları.....	30
Şekil-6. Homolog antijen ile antikor elde edilen bir örneğin floresan mikroskobundaki görünüşü (x40).....	32
Şekil-7. Homolog antijen ile antikor elde edilen bir örneğin floresan mikroskobundaki görünüşü (x100).....	32

ÖZ

Klasik kalın damla inceleme yöntemiyle, özellikle kronik sıtmalılarda kanda parazit çok az bulunduğundan sıtma tanısını koymak güç olmaktadır. Bu durumlarda parazite rastlama olasılığı azalmakta ve immünolojik yöntemler tanıya yardımcı olmaktadır.

Çalışmada, serolojik tanı yöntemlerinden İndirek Floresan Antikor Tekniği (IFAT) ile kalın damlada parazit saptanan (sıtmalı) 441 ve parazit saptanamayan (sıtmasız) 211, toplam 652 kişinin serumlarında *Plasmodium vivax*'a karşı oluşan IgG ve IgM antikorları arandı.

Sıtma infeksiyonunu ilk defa geçiren ve hastalığın akut döneminde kan alınanlarda %59.01; daha önce sıtma geçirmeyen ve kalın damla incelemesinde parazite rastlanmayanlarda ise %2.76 oranında 1/64 ve üstündeki titrelerde antikor bulundu. Deneyde *P. vivax* homolog ve *P. berghei* heterolog antijenleri kullanıldı. Yöntemin duyarlılığı: homolog antijende %69.16, heterolog antijende ise %4.30 olarak saptandı.

Sıtma tanısında, sadece kalın damla yönteminin kullanılmasının bazı durumlarda yetersiz kaldığı dikkate alınarak, IFAT'ında endemik bölgelerde kalın damla ile birlikte yapılmasının faydalı olacağı kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: *Plasmodium vivax*, Sıtma, İndirek Floresan Antikor Tekniği (IFAT).

**DEMONSTRATION OF ANTIBODIES AGAINST *PLASMODIUM VIVAX*
USING THE INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE (IFAT)
IN PATIENTS WITH MALARIA AND THOSE UNDER RISK
IN THE REGION OF ÇUKUROVA**

ABSTRACT

Since few parasites are found in the blood, particularly in the case of patients with chronic malaria, the diagnosis of malaria is difficult with the classic thick smear method. In this situation, the possibility of finding the parasite decreases and the use of immunological methods are of value in the diagnosis.

In this study, the thick smear method and the indirect fluorescent antibody technique (IFAT) were used. The presence of IgG and IgM antibodies against *Plasmodium vivax* was determined in the sera of a total of 652 persons including 441 persons in whom the malaria parasite was detected and 211 persons in whom the parasite was not detected.

Titres of 1/64 and above were detected in 59.01% of patients with a primary case of malaria in an acute stage and in 2.76% of patients who had not had malaria and were thick smear negatives. In the serological test, homologous *P. vivax* and heterologous *P. berghei* antigens were used. The sensitivity with the homologous antigen was found to be 69.16% and with the heterologous antigen, 4.30%.

Taking into consideration that the use of the thick smear is insufficient in certain cases, it was decided that the use of IFAT along with the thick smear in endemic regions will be of value.

Key words: *Plasmadium vivax*, Malaria, Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT)

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Sıtma, dünyada yaygın bir hastalıktır. Tarih boyunca büyük dalgalar halinde ölüm saçmış, toplumun sağlığını ve ekonomisini etkilemiştir. Eski Mezopotamya, Eti ve Yunan uygarlıklarını etkileyen en önemli etken olduğu bilinmektedir. Türkiye’de sıtma, her dönemde büyük bir sorun olmuş ve özellikle Birinci Dünya ve Kurtuluş Savaşı yıllarında büyük zararlara yol açmıştır. Yıllardır sıtmaya karşı yapılan savaşımara karşın günümüzde de hala önemli bir sağlık sorunudur^{13,47,53}.

Bugün, dünyada milyonlarca insan sıtma riski altında yaşamaktadır¹⁷. Yurdumuzda sıtma tanısı konduktan sonra tedaviye alınan veya sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde yetersiz tedavi gören ya da tedavi edilmeyen kişilerde iş gücü kaybına bağlı olarak ekonomik bakımdan kayıplara neden olmaktadır³⁴.

Sıtma olgularının tanısı, eskiden beri kanda *Plasmodium*’un gösterilmesiyle konulmaktadır. Ancak, kan muayenelerinde akut ve kronik olgularda yanımlar olabilmektedir. Bu nedenle, kan muayeneleriyle bazı sıtma olguları gösterilememekte ve özellikle kronik sıtmalılarda kanda parazit çok az bulunmaktadır. Bu durum, kan muayenelerinde parazite rastlama olasılığını azaltmaktadır. Böyle durumlarda immünolojik yöntemler tanıda yardımcı olmaktadır. Ayrıca, sıtma geçirmiş ve/veya tedavi olmuş kişilerde sıtma antikor düzeyinin saptanması yararlı olmaktadır^{34,43,49}.

Ülkemizde, sıtmaya karşı 1950 ve 1960’lı yıllarda uygulanan eradikasyon programı ile başarı elde edilmiş olmasına karşın daha sonra sivrisineklerin insektisitlere direnç kazanmasıyla birlikte yeniden artma görülmüştür^{31,47}. Çukurova’da 1993 yılı içerisinde kalın damla yöntemiyle 206803 kan preparatının 3512’sinde, 1994 yılında 211988 kan preparatının 7092’sinde sıtma saptanmıştır¹. Bu da Çukurova’da sıtmanın hala etkisini sürdürdüğünü göstermektedir. Sıtmanın belirtili şekli yanında, belirtisiz şekillerini de saptamak için; kalın damla preparat incelemelerinde *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) sıtma tanısı konanlarda ve parazit görülmediği için; sıtma belirlenmeyenlerde İndirek Floresan Antikor Tekniği (IFAT) ile homolog ve heterolog sıtma antijenlerine karşı IgG ve IgM antikorları arandı.

Çalışma, bölgemizde akut sıtma tanısı konanlarda, kalın damla sonucu negatif ancak ateş etiyolojisi bulunanlarda ve kan donörlerinde *P. vivax* antikorlarını araştırmak ve belirtisiz sıtma infeksiyonunun dağılımını göstermek amacıyla yapıldı.

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonunca SBE.93.2 no'lu proje olarak desteklenmiştir.



2.GENEL BİLGİLER

Sıtma, çok eskiden beri bilinen bir hastalıktır. Otuz milyon yıllık jeolojik katmanlarda sivrisinek fosillerinin bulunması, insanlığın, çok önceleri de sıtmaya yakalanmış olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Sıtmanın Afrika'dan kaynaklanarak göçlerle; Akdeniz kıyıları, Mezopotamya, Hindistan, Güney-Doğu Asya'ya, köle ticaretiyle de Amerika'ya yayıldığına inanılmaktadır³¹.

Hipokrat, sıtmayı ateşli, titremeli ve ölümlü biten bir hastalık olarak tanımlamıştır. Romalılar, bataklık ve pis havalı yerlerde sık rastlanması nedeniyle mal = kötü, aria = hava, kötü hava anlamına Malaria adını vermişlerdir^{21,31}.

Plasmodium'lar için arakonak insan, son konak *Anopheles* cinsinde bulunan bazı sivrisinek türlerinin dişileridir. *Anofel*'lerin sokmasıyla insana bulaşan *Plasmodium* türlerinin infektivitesine göre: ateş nöbetleri, kansızlık, dalak büyümesi ve iç organlarda hematinin birikmesiyle sıtma (*malaria*, *Paludisme*) denen hastalık gelişir^{13,29,31,47,50}.

Bugün, başta Afrika, Asya (özellikle Hindistan), Orta ve Güney Amerika olmak üzere tropikal ülkelerde 2.4 milyar insan sıtma riski altında yaşarken, her yıl 200 milyon yeni sıtma olgusu ortaya çıkmakta ve yalnız Afrika'da büyük çoğunluğunu çocukların oluşturduğu 1 milyon insan sıtmadan ölmektedir³¹.

Dünyada sıtmanın %95 kadarının etkeni *P.vivax* ve *P.falciparum*'dur. *P.vivax*, sıtma infeksiyonlarının %80'inden sorumludur²⁹.

Yurdumuzda *P.vivax* en sık rastlanan türdür. *P.falciparum* çok seyrek olarak saptanmıştır. Birkaç hastada da *P.malaria* görülmüştür. *P.ovale*'ye ise rastlanmamıştır⁴⁶.

2.1.Organizmanın tanımı

Protozoa'ların Apikomplexa alt kolundan olan *Plasmodium* cinsi insanda RES hücrelerinde yaşayan zorunlu hücre-içi parazitidir.

Plasmodium'ların yaşam evreleri, insanda aseksüel çoğalma şeklinde olur. *Plasmodium*'un *P.vivax*, *P.falciparum*, *P.malaria* ve *P.ovale* olmak üzere 4 türü insanda hastalık yapar. Herbirinin klinik ve biyolojik özelliklerinde farklar vardır.

Plasmodium'ların gelişme evreleri:

I. İnsan vücudunda

A. Karaciğer parankim hücrelerinde:

1. Alyuvar öncesi veya ilk doku dönemi (ekzoeritrositik dönem).
2. İkinci ekzoeritrositik dönem.

B. Alyuvarda şizont ve gametositlerin oluşumu.

II. Anofelde

A. Gametlerin oluşumu.

B. Sporogonik gelişim dönemi.

2.2. Karaciğerdeki gelişme şekilleri:

İnfekte dişi anofelin sokmasıyla insan vücuduna giren sporozoitler 1-2 saat içinde kanda kaybolurlar. Karaciğer parankim hücrelerine girer ve alyuvar öncesi dönemi veya ilk ekzoeritrositik dönemi başlatırlar. Burada, parazit karaciğer hücresi içinde büyür ve çekirdeğin bölünmesiyle şizont ve bundan da binlerce merozoit oluşur. Hücrenin parçalanmasıyla kriptomerozoit adı da verilen merozoitler serbest kalır. Bunların bir kısmı alyuvara girer, büyük bir bölümü ise bunları yutan fagositlerle ortadan kaldırılır⁴⁷.

P. falciparum ve *P. malaria*'nın tüm ekzoeritrositik şekilleri aynı zamanda parçalanırlar ve karaciğer de süregen olarak kalmazlar. Aksine, *P. vivax* ve *P. ovale*'de ekzoeritrositik şekillerin 2 tipi vardır. Birinci tip ekzoeritrositik dönemde; infeksiyondan sonra, 1-2 haftada karaciğer şizontları gelişir, parçalanır ve parazitler kana geçer. İkinci tip ekzoeritrositik şizogonide ise; ekzoeritrositik şekiller karaciğerde aylar veya yıllarca sessiz kalarak tekrar aktive olan hipnozoitleri oluştururlar. Bunlar, sonra parankim hücrelerini parçalayarak kana karışırlar^{31,47,53}.

Eritrositik döneme bir kez giren parazitler karaciğer parankim hücrelerine bir daha giremezler. Bu nedenle, taransfüzyonla bulaşan sıtmanın karaciğerde geçen ekzoeritrositik evresi bulunmaz^{31,47}.

2.3. Alyuvarlardaki gelişme şekilleri:

Merozoitler, eritrositlere girince vakuol oluşur. Çok az amoboid hareket ederler, tek

çekirdekli dirler ve taşlı yüzüğe benzediklerinden yüzük veya halka şekil adını alırlar. Bu şekiller: giemsa, field ve leishman ile iyi boyanırlar²⁹. Giemsa ile boyandıklarında kırmızı renkli çekirdek ve mavi sitoplazma görülür. Bu halkanın sitoplazması artar ve trofozoit adını alır. Bu sırada hemoglobin ile beslenir. Fakat, onu tam metabolize edemez. Globin ve bir demir porfirin olan hematine kadar parçalanır. Globin aminoasitlere kadar parçalanarak protein sentezinde kullanılır. Halbuki, hematin, granüler halde parazit sitoplazmasında kalır ve pigmenti oluşturur. Eritrosit büyür, *P.vivax* ve *P.ovale*'de Schüffner tanecikleri oluşur. Parazit hareketlidir. Çekirdeği parçalanmaya başlayan trofozoit genç şizont adını alır, pigment artar ve daha iri bir yapı olur. Sitoplazma uzantıları kaybolur. Amibimsi hareket durur ve sitoplazma koyulaşır. Çekirdek; büyür ve bölünmeye başlar. Bölünme 2,4,8. şeklinde olmayıp düzensizdir. Türe uygun sayıya kadar bölünür. Pigment, merkezde kümelenir ve sarı-kahverengidir. Bu şekil, olgun şizonttur. Her çekirdek bir miktar sitoplazma alarak merozoiti oluşturur. *Plasmodium*'un türüne göre eritrositler 6-24 adet merozoit bulundurulur. Şizontun parçalanmasıyla merozoitler, pigment ve metabolizma artıkları dolaşıma karışırlar. Merozoitler, birkaç saniyede yeni bir eritrosite girer. Merozoitlerin hücre içine girip gelişmesi, olgunlaşması ve sonradan parçalanması olayına şizogoni adı verilir^{13,31,47}.

Şizogoni, *P.malaria* sıtmasında 72 saatte bir olur (Quartana sıtması), diğer üçünde 48 saatte gelişir ve tersiyana sıtması adını alır. *P.vivax* sıtmasına benign tersiyana sıtması da denilmektedir²⁹.

Cinsel evre, merozoitlerin bir kısmının gametositler şeklinde gelişmesiyle başlar. Şizogoni sırasında trofozoitlerden farklı olarak dişi ve erkek gametositler gelişir ve kendilerine özgü morfolojik görünüme sahiptirler. *P.falciparum*'da muz şeklinde iken, diğer türlerde yuvarlaktır. Gametositler, *P.vivax*, *P.ovale* ve *P.malaria*'da birbirlerine çok benzemekle birlikte, *P.malaria*'da daha küçük ve koyu renkte olup, diğer iki türe nazaran Schüffner tanecikleri içermezler²⁹. Hücre içi merozoitlerin bazıları şizont geliştirmez. Birkaç eritrositik şizogoniden sonra gametogenez başlar. Bunlardan dişi (makro) veya erkek (mikro) gametosit oluşur. Gametositlerin dalak ve kemikiliği kılcallarında oluştuğu düşünülmektedir. Gametositler, vakuolsüz, koyu, iri pigmentlere sahip olup genç gametositlerin çekirdekleri bir yanda ve sitoplazmaları yoğundur^{13,29,31,47}.

Olgun erkek gametosit, daha az koyu boyanır. Çekirdeğin yoğunluğu az ve gevşektir. Çekirdek ortaya yakındır. Pigment, sitoplazma içine serpiştirilmiş gibi olup ribozom yoğunluğu daha azdır.

Olgun dişi gametosit, eritrositin içini tamamen doldurur. Çekirdek, yoğun olup kenarda yerleşir ve kırmızı boyanır. Sitoplazma, yoğundur ve koyu mavi boyanır. Sitoplazmada mikrogametositin aksine ribozom yoğunluğu çoktur. Bu da protein sentezinin bol olduğunu gösterir^{29,31,53}.

2.4. Anofeldeki gelişme şekilleri

Gametositlerin gelişimi için uygun anofelin midesine gelmeleri gerekir. Gametogoni ve sporogoni olayları anofelde oluşmaktadır²⁹. Sivrisinekler, kan emince yalnız gametositleri değil, diğer eşeysiz şekilleri de birlikte yutarlar. Bunlar, kanın sindirimiyle birlikte ortadan kaybolurlarken gametositler eritrositten dışarı çıkarlar. Bu sırada mikrogametositlerdeki pigmentler hızlı hareket ederler. Çekirdek ise birçok küçük kromatin parçacıklarına bölünür. Mikrogametositten, kamçılar gibi ufak sitoplazma çıkıntıları uzanır ve bunların içine kromatin tanecikleri girer. Böylece, eski mikrogametositin çevresinde çok hareketli kamçı şeklinde, sayıları 4-9 arasında değişen mikrogametler oluşur. Mikrogametositten genellikle birkaç dakikada mikrogametler gelişir. Buna eksflajellasyon denir^{31,47}.

Makrogametosit; eritrositten serbest kaldıktan sonra canlı hareketler göstermez. En fazla 2 saat içinde makrogametositten makrogamet meydana gelmiş olur.

Olgun dişi gamete yavaşan mikrogametlerden biri makrogamete değince burada bir çıkıntı oluşur. Erkek gamet buradan girer ve kısa bir süre sonra döllenme sonucu zigot gelişir. Zigot hareketsizdir, hareketli hale geçince ookinet adını alır. Anofelin orta bağırsağının arka yarısındaki epitel hücreleriyle elastiki zar arasına girdikten sonra ookinet yuvarlak bir kitle haline geçer. Etrafı bir zarla sarılır ve böylece ookist oluşur. Ookistin oluşmasıyla sporogoninin gerçekleşmesi hazırdır. Ookist büyürken çekirdeği de bölünmeye başlar. Sitoplazma içinde birçok vakuoller oluşur ve bunlar birbirleriyle birleşerek sitoplazmanın yüzeyini artırır. Çekirdek parçaları, sitoplazmanın yüzey kısmına dizilirler, vakuollere doğru sitoplazmanın parmak tarzında çıkıntıları uzanır, kromatin tanecikleri bunların içerisine girerler ve bu tarzda ince uzun birçok sporozoit oluşur^{29,47,53}.

Ookistlerin sivrisineklerin mide çeperindeki sayıları genellikle 10-20 tanedir. Bu evrimin sonunda sporokist parçalanır, binlerce hareketli sporozoit serbest kalır. Sporozoitler vucut boşluğuna dökülür ve sivrisineklerin bütün organlarına dağılırlar. Ancak, çoğunluğu tükürük bezlerine yerleşir ve bunların kanallarına geçerler^{29,31,47}.

Dünyada 450 kadar anofel türü bulunur. Ancak, bunların 80 kadarı insana sıtmayı bulaştırır. Yurdumuzda sıtmayı bulaştıran anofel türleri *A.sacharovi* ve *A.superpictus*'dur⁴⁷. Sıtma, anofellerin aktif olduğu ilkbahar, yaz ve sonbaharda bulaşır^{29,31,47,53}.

İnsan vücudunda, *P.vivax* kökenleri 1-5, ortalama 3 yıl yaşarlar. *Plasmodium*'ların insan kanında çoğalabilmesi, konak direncinden başka parazitin türüyle de ilgilidir. *P.vivax* infeksiyonunda, 1mm³ kandaki parazit sayısı 50.000'i, *P.malaria*'da seyrek olarak 10.000'i geçtiği halde *P.falciparum*'da bu sayı 50.000'i aşabilir^{46,47}.

İnsan için parazit kaynağı, vucutlarında olgun gametositleri bulunduran insanlardır. Sıtmanın endemik olduğu bölgelerde belirtisiz parazitemili günlerin sayısı, ateşli parazitemili günlerin sayısından çoktur ve belirtisiz parazitemiler sivrisineklerde infeksiyona neden olabilir^{33,53}.

Sıtma, doğal olarak dişi anofelin kan emerken taşıdıkları sporozoitleri insan vücuduna aktarmasıyla bulaşır. Ayrıca, *Plasmodium*'ların eşeysiz şekilleri; 1- Kan, lökosit ve trombosit süspansiyonu verilirken, 2- Sifilizin tedavi edilmesi amacıyla, 3- Steril olmayan enjektörlerle de insana bulaşır^{5,37,47}.

Bir bölgede sıtmanın endemik olduğundan bahsedebilmek için orada sıtmanın ölçülebilecek derecede bulaşabilmesi ve yeni sıtmalıların ortaya çıkabilmesi gerekir. Sıtma, endemik olduğu bölgede yayılabildiği gibi buradan; turistler, askerler ve işçilerle başka yerlere de taşınabilir^{36,47}.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve UNICEF'le yapılan işbirliğiyle 1957 yılında Türkiye'de sıtmanın kökünü kurutma uygulamasına geçilmiş, yapılan savaşım sonucu 1970'e kadar sıtma gittikçe azalmış ve sıtmalı sayısı o yıl 1263'e kadar düşmüştür⁴⁷.

Sıtma, 1970'li yıllarda başta Çukurova olmak üzere artmış ve yayılmaya başlamıştır. Sulama kanallarının geniş alanlara dağılması ile birçok sivrisinek üreme yerleri oluşmuş, tarım alanlarında düzensiz ve gelişigüzel kullanılan insektisitlerin de etkisiyle sivrisinekler direnç kazanmış ve yoğun işçi hareketleri ve bunların sağlıksız ortamlarda yaşamaları sonucu sıtma hem artmış hem de buradan çevreye yayılmıştır^{21,47}.

Bölgemizde bulunan sıtmalı sayısı 1970 yılında sadece 67 iken 1977 yılında bu rakam 69691'e ulaşmıştır. Aynı yıl Türkiye genelindeki sıtmalı sayısı 115512'ye yükselmiştir. Bundan sonra yapılan savaşlarla 1989 yılında Türkiye genelinde sıtmalı sayısı 12112'ye kadar düşmüştür. Aynı yıl bölgemizdeki sıtmalı sayısı 1972, 1990'da 1991, 1991'de 2108, 1992'de 3126, 1993'de 3512 ve 1994 yılında 7092 olarak bulunmuştur^{1,21}.

2.5.Patogenez

Sporozoitler, ekzoeritrositik şekiller ve gametositler konağa doğrudan doğruya bir zarar vermezler. Sadece eritrosit içindeki aseksüel parazitler hastalığa yol açarlar.

Klinikte hastalığın patolojik mekanizması 4 ana başlıkta toplanabilir³¹.

1. Ateş ve komplikasyonları, 2. Anemi, 3. Anemi sonucu oluşan hipoksi ve mikro dolaşımdaki değişiklikler, 4. İmmunopatolojik olaylardır.

Ateş, tüm *Plasmodium* türleriyle oluşan sıtma infeksiyonlarının en belirgin özelliğidir. Ateş, 2000 yıldan fazla bir süredir, sıtmanın belirtisi olarak dikkati çekmiştir. Sıtmada ateşin nedeni tam olarak aydınlanamamıştır. Nöbetlerin, şizont'un parçalanması sırasında, parazitin salgıladığı pirojen maddelerden ileri geldiği görüşü hakimdir. Fakat, bu pirojen maddeler henüz gösterilememiştir^{29,31,47}. Şizont'un parçalanması sırasında açığa çıkan parazit parçaları ile sindirilmiş eritrosit kısımları, doku makrofajları tarafından fagosite edilmekte ve bu makrofajların salgıladığı endojen pirojen maddenin ateşe neden olduğu varsayımı da bulunmaktadır. Tümör nekroz faktörü/kaşektin bir endojen pirojen olarak sıtmalı hastaların serumlarında gösterilmiştir. Fakat, bunun da sıtma ateşinin patogenezindeki rolü kesin olarak belli değildir^{29,31}.

Anemi, sıtmanın en belirgin komplikasyonudur. Yüksek parazitemide yaygın hemoliz görülebilir. Hemoliz, şizogoni sonrasında infekte eritrositlerin, hatta infekte olmayan eritrositlerin de parçalanması ile oluşur²⁹. Hemolizin büyük bir kısmı yalnız bu yolla olmaktadır.

İnfekte eritrositlerin dalakta tutulması ve dalağın büyümesi, anemi patogeneğinde diğeri önemli bir olaydır.

Diğeri yandan, çok az da olsa bazı otoimmün olaylar da anemi oluşumuna yardım eder. Eritrosit yapımı engellenerek, periferdeki retikülosit miktarı azalarak anemi oluşur. Hatta, bu durum sıtmanın tedavisinden sonra da devam edebilmektedir^{29,31}.

Sıtmalılarda, dolaşan immünoglobülinlerin oranında belirgin bir artış görülür. Artmış olan bu poliklonal immünoglobülinlerin çok az bir kısmı *plasmodium* özgüllüğüne sahiptir. Fazla immünoglobulin, oto antijenlere özgül olarak yönelebilmektedir. Sıtma, otoimmün bir hastalık olarak tanımlanmamasına karşın, sifiliz için kullanılan VDRL ile biyolojik yalancı olumlu serolojik reaksiyonlar verebilmektedir³¹.

2.6.Klinik belirtiler

Sıtma nöbeti, akut sıtmada; titreme, yüksek ateş ve terlemedir. Nöbetler, birden bire başlayabildiği gibi nöbetlerin başlangıcından önce, halsizlik, başağrısı, miyalji ve yorgunluk gibi özgül olmayan belirtiler olabilir. Bir kaç günlük bu ilk belirtiler dönemi, viral bir hastalıkla kolayca karışabilmektedir. Ayrıca, hastalar: göğüs ağrısı, karın ağrısı gibi birçok lokal semptomlardan yakınabilirler. Sıtmanın bu dönemi diğeri hastalıklarla maskelendiğinden, özellikle endemik olmayan yerlerde çalışan hekimler: seyahat edenlerde, ilaç bağımlılarında ve kan nakli yaptıranlarda sıtmayı gözönünde bulundurmalıdırlar^{29,38,47,53}.

Titreme dönemine "soğuk dönem" denir ve birkaç dakika ile 1-2 saat içinde periferik vazokonstriksiyon oluşur. Bunu "sıcak dönem" izler. Ateş yükselir hastanın yüzü kırmızı, gözleri parlak, derisi sıcak ve kurudur. Ateş 40-41°C'ye kadar çıkabilir. Susama hissi çoktur. Bu sıcak dönem 3-6 saat sürdükten sonra, hastanın terlemeye başlamasıyla biter^{29,47}.

Terleme döneminde, ısı ve nabız normale döner. Dalak küçülür, hasta yorgun olmakla birlikte kendini iyi hisseder ve uykuya dalar. Terleme dönemi 2-4 saat kadar sürebilir.

Sıtmada, diğeri ateşli hastalıkların aksine nöbetler arasındaki dönemde hasta asemptomatiktir. Nöbetler arasındaki bu asemptomatik dönem: *P.vivax*'ta 36 saat, *P.falciparum*'da 12 saat, *P.malaria*'da 60 saat sürer. Bu sürelerin sonunda nöbetler yine başlar. Nöbetlerin başlangıcı merozoitlerin kana döküldüğü sıraya rastladığından, parazitin türüne göre

genelde düzenli seyreder ve *P.vivax* ve *ovale*'de 48 saat, *P.falciparum*'da 36-48 saat ve *P.malaria*'da 72 saat sürer. Fakat, ateş düzensiz olabilir ve tanı koymak güçleşir. Özellikle birden fazla *Plasmodium* türleriyle meydana gelen infeksiyonlarda günlük nöbetler olabilir, hatta bir günde birden fazla nöbet görülebilir^{29,47,53}.

Hasta, çoğunlukla orta derecede dalak büyümesine ve duyarlı büyük bir karaciğere sahiptir. Bu iki belirti, hastanın ilk muayenesinde farkedilmeyebilir. Dalak, kapsülünün fazla gerilmesine bağlı olarak palpasyonda çok duyarlıdır ve *P.vivax* sıtmasında yırtılmaya meyillidir. Yırtılma kendiliğinden de olabilir. Hatta, tedaviden sonra bile yırtılabilir. Dalağa uygulanan sert palpasyon tehlikeli olabileceğinden, dikkatli yapılmalıdır^{29,31,47}.

2.7.Sıtmada bağışıklık

İnsan vücuduna giren sıtma parazitlerine karşı ilk önce doğa direnci karşı koymaktadır. Bu sırada antijenlerin etkisi sürdüğünden daha sonra kazanılmış bağışıklık gelişir ve infeksiyon sona erebilir veya sessiz hale geçer. İnsan, bazı maymun sıtmaları hariç diğer hayvanların paraziti olan *Plasmodium* türlerine karşı doğuştan dirençlidir⁴⁷.

Sıtmalı bölgelerde hastalığa hiç yakalanmadan yaşayan insanlar görülmüştür⁴⁷. İnsanda *Plasmodium* türlerine karşı gelişen doğa direncinde çeşitli faktörler etkilidir. Kandaki şekillere karşı oluşan dirençte alyuvarların zarıyla, sitoplazmasıyla ve kan plazmasıyla ilgili faktörler bilinmektedir^{29,47}.

İnsanda hastalık yapan *Plasmodium* türlerine karşı homolog bir bağışıklık gelişir. Bu bağışıklık aynı türün diğer kökenlerini (suşlarını) etkileyebilir. Fakat, genellikle zayıftır. Türler birbirine karşı bağışıklık vermemektedirler^{29,49}.

Işınlanmış sporozoitlerle yapılan deneyler, serumda sporozoitlerin infeksiyon yapıcılığını kaldıran veya sporozoitler etrafında presipitasyon oluşturan antikorlarla birlikte sporozoitlere karşı koruyucu bağışıklığın geliştiğini ortaya koymuştur. Bu bağışıklıkta antikorlarla birlikte hücre aracılığıyla olan bağışıklığın da önemi vardır. Bu olayda sporozoitlerin yüzey proteini "Circumsporozoit (CS) protein" önemlidir. Koruma; sporozoitlerin karaciğer hücrelerine girmesi önlenerek sağlanır. Antikorlar, CS proteininin belirli bölgelerini tanımaktadırlar^{17,47}.

Sporozoitlere karşı oluşan bağışıklık türe özgüdür. Fakat, kökene karşı değildir. Bu bağışıklık alyuvarlardaki şekillere etkisizdir. *Plasmodium*'lara karşı bağışıklıkta sporozoitlerden başka; merozoit, şizont, ayrıca gametosit, zigot ve ookinetlerin antijenlerinin de etkisi vardır. Serbest merozoitlerin ve olgun şizontların yüzeyinde bir çok proteinler elde edilmiştir. Bunların bir kısmına karşı oluşan etkili antikolar parazitin üremesini durdurmaktadır⁴⁷.

Sıtma bağışıklığında koruyucu antikolar ağır sıtmaya tutulan çocuklarda hayat kurtarıcı olabilmektedir. Anneden fetüs kanına doğumdan önce geçen antikolar da ilk 3 aylık direncin nedenlerinden biridir. Parazitlerin yok edilmesinde, opsoninleyici antikoların yardımıyla güçlenen fagositlerin rolü olduğu kanısı yaygındır. Koruyucu antikolar merozoitlerle birleşerek bunların alyuvarlara yapışmalarını önlemekte, fagositler tarafından tutulmalarını kolaylaştırmakta ve evrimi durdurmaktadır^{29,47}.

Sıtma geçirenlerde bağışıklık azaldığı zaman depresme (nüks) meydana gelmektedir. Nüks, *P.falciparum* sıtmasında çok nadir olmasına karşın özellikle *P.vivax* sıtmasında çok sıktır. Sıtmada erken ve geç depresme tipleri vardır. İlk nöbetler döneminden sonra 2 aydan önce görülenlere erken depresme (recrudescence), 6.aydan sonrakilere geç depresme (recurrence) denir. Bunlardan birinciler, durmuş olan eritrosit içi şizogoninin yeniden başlaması ve böylece yeni alyuvarların tutulmasıyla, ikincilerin ise hipnozoitlerin aktifleşmesi ile başlayan doku şizogonisi sonucu ortaya çıkan merozoitlerin eritrositlere girip çoğalmasıyla belirdiği savunulmaktadır⁴⁷.

2.8.Sıtmada tanı

Sıtma nöbetleri sıtmanın endemik olarak bulunduğu ülkelerde klinik tanı bakımından önemlidir. Ancak, kesin tanı parazitin görülmesiyle konur. Zira sıtmayı ve nöbetlerini taklit eden bir çok hastalıklar vardır.

Sıtma; influenza, romatizma, tifo, tatarcık humması, siper humması, paratifo, tüberküloz ve brusellozla karışabilir. Ayrıca, bulaşıcı hepatite benzeyen sarılıklı şekilleri, kala-azar'ı, dizanteriyi, kolerayı akla getiren sindirim sistemi rahatsızlıklarına neden olabilir. Bu bakımdan sıtmanın endemik olarak görüldüğü bölgelerde ateşli her olguda sıtmayı düşünmek ve hasta kanında *Plasmodium* aramak gerekir^{13,47}.

Hastalığın semptomları, parazitlerin kanda görülmesinden birkaç gün öncesinde başlamaktadır³¹. Sıtmanın tanısı parazitlerin boyalı periferik kan preparatlarında gösterilmesi esasına dayanır. Parazit, şizontların parçalanması ve merozoitlerin dökülmesi ile oluşan nöbet sırasında dolaşan kanda yüksek yoğunlukta bulunur.

Tanıda, parmak ucundan alınan kanla; yayma ve kalın damla preparatları yapılır ve genellikle giemsa boyasıyla boyanırlar^{2,29}. Kalın damla, en iyi inceleme yöntemidir. Eğer kan muayenesinde *Plasmodium*'a rastlanmaz ise 6-12 saat sonra tekrar inceleme yapılmalıdır²⁹.

İnce yaymada, *Plasmodium*'ların tanımı, alyuvarlar içinde görülmelerinden dolayı daha kolaydır. *P. vivax*'ın genç halkaları alyuvarların 1/3-1/4'ü kadardır, tek kromatinlidirler. Halkalar büyüdükçe düzensiz biçimde amibimsi olurlar. Beliren boya taneleri sarı, esmer taneciklerdir, sonra çomağımsı olurlar. Şizontlar normal alyuvarlardan daha büyüktür. Merozoit sayısı 12-24, ortalama 16-18 tanedir. Parazitli alyuvarlar soluk ve normalden daha büyüktür, içinde Schüffner taneleri vardır^{13,31,47,53}. Her hangi bir yapıya *Plasmodium* diyebilmek için kromatinle beraber sitoplazmanın da görülmesi gerekir. Pigment de çok değerli bir tanı aracıdır⁴⁷.

Dikkatle incelenmiş preparatlarda parazit görülmediği zaman, monosit veya nötrofiller içinde kahverengi pigment granüllerinin bulunması sıtma olasılığını artırdığından dikkatli olmak gerekmektedir. Ayrıca, bir olguda, parazitli eritrosit oranı %5'den çoksa *P. falciparum* sıtmasından şüphelenilmelidir^{29,31,53}.

2.9.Sıtmanın serolojik tanısı

Serolojik yöntemler, parazitlerin iç organ ve dokulara yerleştiği, direk muayene materyelinde infeksiyonun sadece belirli bir döneminde veya az sayıda ve seyrek bulunabildiği, ya da tanı için bir dizi karışık işlemleri gerektirdiği durumlarda büyük önem taşır. Ayrıca, epidemiyolojik çalışmalarda da önemli bir uygulama alanı bulmaktadır. Günümüzde pek çok laboratuvar, serolojik testlerde kullanacakları antijenleri deney hayvanları veya kültürde geliştirdikleri parazitlerden hazırlarlar, ya da pahalı olmasına rağmen ticari yoldan sağlarlar. Sıtmanın İndirek floresan antikor tekniği (IFAT) ile ilgili ticari bir kiti piyasada bulunmamaktadır. Zaten buna da fazla ihtiyaç yoktur. Çünkü, her laboratuvar kendi koşullarında hazırladıkları antijenle tatmin edici sonuçlar alabilmektedirler. Ayrıca, son yıllarda rekombinant

DNA teknolojisi ile özgül ve saf antijenler elde edilmiştir. Ancak, oldukça pahalı ve elde edilmesi zor olan bu antijenlerin ülkemizde kullanılması şimdilik güçtür².

Sıtmanın serolojik tanısında kullanılan yöntemler; indirek floresan antikor (IFA), Radio immünoassay (RIA), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), indirek hemaglutinasyon (IHA), Kompleman birleşmesi deneyi (KBD), İmmünodiffüzyon (İD), immünoelektroforez (IE), şizont ile infekte hücrelerin aglutinasyonu (SICA) ve in-vitro büyümeyi önleyen testlerdir. Bu yöntemlerden çoğunluğu laboratuvar araştırmalarında kullanılırken IFA, ELİSA gibi yöntemler epidemiyolojik çalışmalarda değer taşır^{2,21,29,43,49}.

Doğal olarak, klasik sıtma tablosu görülen bölgelerde belirtisiz olguların ortaya çıkarılmasında, hastalığın kontrol altına alınmasında ve özellikle aşağıda belirtilen durumlarda sıtmanın immünolojik yöntemlerle tanısının yapılabilmesi bir çok sorunların çözülmesinde, aydınlatılmasında yardımcı olur^{33,49}.

1. Sıtma geçirmiş, sıtma tedavisi olmuş veya ateşli bir hastalık geçirmiş kişilerde halen sıtma olasılığının olup olmadığı hakkında bilgi verir.

2. Klinik muayenelerde dalak ve karaciğer büyümesi görülen kişilerde, sıtma olasılığı konusunda yardımcı olur.

3. Uzun süren ateşli hastalıklarda, sıtma olasılığının ekarte edilmesinde faydalı olur.

4. Kan veren kişilerin sıtma bulaştırmasını önlemek için, ön inceleme ile bunların kan verip veremeyecekleri konusunda fikir verir.

5. Özellikle hastalığın endemik olduğu bölgelerde yapılacak epidemiyolojik çalışmalarda, hastalığın ne ölçüde yaygın olduğu, yeni infeksiyonların olup olmadığı ve eradikasyon çalışmalarının değerlendirilmesi konularında sıtma immünolojisi ile geniş bilgi elde edilmesi olanakları vardır^{2,21,33,43,49}.

2.9.1.İşaretleme ilkesine dayanan yöntemler

Bu yöntemlerle kolaylıkla saptanıp ölçülebilen belirleyici bir madde ile işaretlenmiş düşük yoğunluktaki antikor ve antijenler kullanılmaktadır. İşaretli olarak kullanılan madde IFA için: floresan boyası, RIA için: genellikle I¹²⁵ gibi radyoaktif madde ve ELİSA için: bir enzimdir. Bu yöntemlerin özelliği, yüksek oranda duyarlı olmalarıdır. İşaretli anti-globulin kullanılarak antikor tayin edilen indirek yöntemler sıtma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır².

2.9.1.1. İndirek floresan antikor tekniği (IFAT)

Floresan antikor tekniği, ilk kez Coons ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, Goldman'ın parazitolojiye uygulamasıyla protozoon ve helmint hastalıklarında laboratuvar tanı yöntemi olarak uygulanabileceği ve güvenilir sonuçlar alınabileceği anlaşılmıştır^{32,43}.

Floresan antikor tekniği, paraziter hastalıkların tanısı yanında patojen olan ve olmayan parazitlerin ayırımı, parazitlerin patojenitesinin aydınlatılması, tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi ve klinik belirti göstermeyen olguların ortaya çıkartılmasında başarıyla uygulanmaktadır^{32,49}.

Günümüzde toksoplazmoz başta olmak üzere leyişmanyoz, giyardiyo, pnömosistoz, şistozomiyoz gibi bir çok paraziter hastalıkların tanısında IFAT kullanılmaktadır^{29,30}.

Ülkemizde, sıtma olgularının immünolojik yöntemlerle tanısı, 1979 yılında İ. Baydar ve 1981 yılında Özcel ve ark. tarafından IFAT ile yapılmıştır³⁴.

IFAT yönteminde; işaretlenmemiş, bilinen veya bilinmeyen antikorlar antijen üzerine konur, daha sonra işaretlenmiş ikinci bir antikor veya anti-globulin, bu antijen antikor bileşimi üzerine uygulanır. Eğer, ilk uygulamada antijen-antikor bağlanması olmuş ise, sonra kullanılan ve birinci antikora karşı elde edilmiş olan işaretlenmiş antikor (anti-globulin) yardımı ile bilinmeyen şüpheli serumdaki antikor görülebilir hale gelir.

IFAT, sıtmanın serolojik tanısı ve sero epidemiyolojisi için referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin esas güçlüğü test antijeninin hazırlanmasıdır. Antijenlerin bulunması ve hazırlanması laboratuvarların olanaklarıyla birlikte çevrede rastlanabilecek sıtmalı kişilere bağlı olmaktadır. Çünkü, bu iş için homolog insan sıtma parazitleri tercih edilmektedir. Bugün IFAT'ın bir çok laboratuvarlarda kullanılması, antijen elde edilmesindeki ve bulunmasındaki kolaylıklarla ilgilidir².

IFAT'da, diğer serolojik yöntemlerde gerekli olan, antijenin eritrosit veya lateks partiküller gibi taşıyıcı ortamlara adsorbsiyonu veya kompleman bulunması gibi sorunlar yoktur. Ayrıca, floresan antikor tekniği, lamalar üzerinde hazırlanmış kuru antijenlerin uzun süre saklanmasıyla istenildiğinde kullanılabilme kolaylığıda sağlamaktadır³².

Antijen hazırlanmasında, önceleri sıtma paraziti bulunan kandan yayma kan preparatı yapılması önerilmiştir. Fakat, sıtmalı insanlardan alınan perifer kandan yapılan yayma kan preparatlarında her zaman sıtma parazitlerine rastlanması zor olduğu ve bulunan parazitlerin

de çok az olması nedeniyle bu şekilde antijen hazırlanması sakıncalı görülmüştür³⁹. Yayma preparat yerine, parazitli kandan kalın damla yapılması ve kalın damla preparatlarının antijen olarak kullanılmasının yayma preparatlardan daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir⁴⁰. Kalın damla preparatlarında parazite rastlama oranı daha fazla olmakta, daha fazla sayıda sıtma parazitinin incelenmesi olanağı bulunmaktadır. Ayrıca, sıtma parazitlerinin taşlı yüzük şekillerinin antijen olarak iyi çalışmadıkları amoboid ve şizont şekillerinin sıtma antikorlarıyla daha iyi reaksiyon verdikleri belirtilmiştir⁴⁰. Özellikle *P.falciparum*'da, şizont şekillerinin, taşlı yüzük şekillerine göre dört kez daha duyarlı olduğu, bütün sıtma parazitleri için şizont şekillerinin antijenik özelliklerinin, taşlı yüzük şekillerinden çok fazla olduğu bildirilmiştir^{28,48}.

Sıtma parazitlerinin antijen olarak kullanılmasında, hangi *Plasmodium* türünün daha iyi reaksiyon verebileceği üzerinde yapılan çalışmalar, *Plasmodium* türlerinin seçiminin gerçekten önemli bir sorun olduğunu göstermiştir. Antijen olarak insan infeksiyonlarından elde edilen *Plasmodium* türleri kullanılmaktadır. Ancak, bir çok laboratuvar, maymun *Plasmodium* türlerini (Simian malaria) antijen kaynağı olarak kullanmaktadırlar⁷. Bununla beraber, *P.falciparum*, *P.vivax* ve *P.malaria*'nın Güney Afrika küçük maymunlarına (*Aotus trivirgatus*) adapte edilmesinden sonra bu hayvanların kanı ile hazırlanan antijenlerin iyi sonuç verdiği bildirilmektedir. İnsan sıtma olgularında, *Plasmodium* türlerinin antijen olarak değişik şekilde reaksiyon verdikleri ve her türün farklı sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Pozitif serumların, elde edilebilen değişik *Plasmodium* türleri antijenleriyle veya *P.vivax*, *P.falciparum* ve *P.malaria* ile karışık olarak hazırlanmış antijenlerle reaksiyona sokulduğunda daha iyi sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir⁴¹.

Ayrıca, sıtmanın yoğun olarak bulunduğu bölgelerdeki kişilerden alınan kandan antijen hazırlandıktan sonra bunun şüpheli serum örnekleri ile reaksiyona sokulduğunda, daha duyarlı sonuçların alındığı bildirilmiştir⁴.

Plasmodium'ların antijenik özellikleri üzerindeki immünolojik çalışmalarda kullanılan *Plasmodium* türleri üç gruba ayrılmıştır^{32,33}.

a) Kemirici türleri: *P.berghei*, *P.vinckei*

b) Kuş türleri: *P.gallinaceum*.

c) Maymun ve insan türleri: *P.cynomolgi*, *P.falciparum*, *P.gonderi*, *P.ovale*, *P.vivax*, *P.malaria*, *P.fieldi*.

İnsanlarda hastalık yapan *Plasmodium* türlerinin her zaman bol olarak elde edilememesi, bu türlerin çok pahalı laboratuvar hayvanı olan maymunlarda devam ettirilmesinin parasal güçlüğüne dikkate alan araştırmacılar, eskiden beri kolay elde edilebilen ve bilinen laboratuvar hayvanlarında kolayca üreyerek devam ettirilebilen *Plasmodium* türlerini antijen olarak kullanmayı denemişlerdir³².

P.falciparum ve *P.vivax* ile infekte insanlardan alınan serumlara karşı *P.berghei*, *P.gallinaceum*, *P.cynomolgi* ve *P.falciparum*'dan hazırlanan antijenlerle IFAT uygulandığında, en fazla duyarlılık *P.falciparum* antijeni ile elde edilmektedir. Heterolog bir antijen olarak *P.berghei* kullanılması durumunda ise homolog antijenlere göre duyarlılığın daha az olduğu ancak, bunun *P.berghei*'nin tanı antijeni olarak kullanılmayacağı anlamına gelmeyeceği, sadece serum dilüsyonlarının daha düşük yapılmasının gerektiği açıklanmıştır³².

Çeşitli *Plasmodium* türlerini antijen olarak kullanan araştırmacılar^{7,14}, simian sıtmasının etkeni olan *P.fieldi*'nin insan serumlarıyla yapılan IFAT çalışmalarında çok duyarlı ve olumlu sonuçlar verdiğini, ayrıca *P.brasilianum*'un da iyi bir antijen olduğunu ve tanıda kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Collins ve ark.¹², Jeffery ve ark.¹⁹, Kawamoto²⁰, Lari ve ark.²⁴, Manawadu ve Voller²⁸, Srivastava ve ark.³⁸ da sıtma tanısında IFAT'ı homolog antijenler kullanarak uygulamışlardır.

2.9.1.2. Radio-immunoassay (RIA) yöntemi

Sıtma serolojisinde işaretli antijen veya anti-globulin kullanılan indirek izotopik yöntemler az sayıda kullanılmıştır. *Plasmodium* antijenlerinin solid faz olarak koyun eritrositlerine bağlandığı indirek bir yöntem tarif edilmekle beraber bu antijenin polistren mikroplyetler de taşındığı RIA yöntemi de geliştirilmiştir. Her iki durumda da I¹²⁵ kullanılarak tatmin edici sonuçlar alınmıştır. Yöntem, ELİSA ile paralel gitmektedir. ELİSA'nın avantajı bağlanan

enzimlerin uzun süre dayanmasıdır².

RIA, sero-epidemiolojik ve tanı amacıyla kullanılmıştır. *P.berghei* ile yapılan araştırmalarda da bu yönteme başvurulmuştur. Homolog antijen kullanılarak testin duyarlılığı önemli ölçüde arttırılmıştır. Bu nedenle, yöntem parazitin çok az bulunduğu kronik olgularda yararlı olmaktadır^{2,33,49}.

2.9.1.3.Enzyme-linked immunosorbent assay (ELİSA) yöntemi:

ELİSA, Enzyme-immunoassay yönteminin geliştirilmiş şeklidir. Antikor tayininde parazitle infekte kandan elde edilen solübl sıtma antijeni mikropleyt kuyucuklarına konur veya polistren duvarına kaplanır. Test edilecek serum ilave edilerek inkübe edilir, yıkamadan sonra sisteme enzim işaretli (Peroksidaz veya alkalen fosfataz) anti-human immünoglobulin eklenir ve tekrar inkübe edilir. Yıkandıktan sonra substrat ilave edilir. Bu substrat enzime göre farklıdır. Pozitif bulgularda: peroksidaz enzimiyle açık kahve, alkalen fosfataz enzimiyle sarı-yeşil renk elde edilir^{2,16,37,38}.

Bu yöntem de antijenin solübl yapıda olması gerekir. Sıtma tanısında ELISA yönteminin kullanılmasıyla IFA kadar duyarlı sonuçlar alınabilmektedir^{2,16,37,38}. Önceleri *P.knowlesi*'den, daha sonraları da maymunlardan elde edilen *P.falciparum*'dan antijen hazırlanmış ve kullanılmıştır. Kültürden elde edilen parazitler de antijen kaynağı olarak kullanılmaktadır³⁷.

2.9.2.İndirek hemaglütinasyon (IHA) yöntemi:

İndirek hemaglütinasyon (IHA) yöntemi, erken infeksiyon döneminde antikor tayin etmede IFA yönteminden daha az duyarlıdır. Bu yöntem, sıtma antijenleriyle duyarlı hale getirilmiş veya kaplanmış eritrositlerin sıtma antikorları bulunan ortamda aglütine olmaları esasına dayanır. IHA'da solübl yapıdaki *Plasmodium* antijenleri kullanılır^{2,12,48,52}.

Sıtma tanısında uygulanabilen bu yöntemin sıtma türlerinin ayrılmasında kullanılmasının mümkün olmadığı, bunun standart antijen hazırlanmasındaki zorluktan kaynaklandığı bildirilmektedir. Bununla beraber, bir bölgede endemik olan sıtma etkeniyle hazırlanan homolog antijenlerin kullanılmasıyla daha fazla ve yüksek titrede olumlu sonuçların alınabildiği bildirilmiştir^{2,33}.

Bu yöntemde, bazı araştırmacılar koyun eritrositlerini, bazıları ise sıfır grubu insan eritrositlerini tercih etmektedir^{12,52}. Kanın alınış şekli, zamanı ve saklama ısısı, parazitin türü,

evresi, bulunduğu eritrositlerin kaynağı, antijenlerin seçimi ve hazırlama yönteminin hepsi sonucu etkiler².

İndirek hemagglütinasyon yöntemi için de esas sorun antijenin hazırlanmasıdır. Antijen hazırlanmasında protozoonun kendisiyle birlikte bulunan eritrositler ve kanın diğer kısımlarının, protozoonlardan ayrılabilmesi ve saf *Plasmodium* elde edilmesi gerekir. Infekte eritrositlerle hazırlanan antijenler IHA yönteminde yeterli sonuç vermemektedir. Daha saf antijen hazırlanması için yapılan çalışmalarla güvenli sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir^{12,33}.

2.9.3. Kompleman birleşmesi deneyi (KBD):

Sıtma tanısı için uygulanan en eski serolojik tanı yöntemlerinden biri olarak bilinen KBD'de ilk kullanılan antijen kaynağı maymunların sıtma etkeni olan *P.knowlesi*'dir. Önce, antijen olarak infekte maymun dalağı ekstratı kullanılmış, ancak, yeterli sonuç alınamamıştır. Daha sonra, infekte kan hücreleri kullanılmıştır. Infekte kan hücrelerinden antijen hazırlamak için, eritrositlerin en az %20 oranında infekte olması gerekmektedir. Genel olarak, *Plasmodium*'u olan veya çok yakın zamanda kanında parazit bulunmuş kişilerde bu deney olumlu sonuç vermekte, *Plasmodium*'ların kandan kaybolmasıyla süratle olumsuz olabilmektedir. Bu nedenle, kronik sıtma olgularının bu yöntemle saptanması doğru sonuç vermemektedir. Akut olgular için ise etiyolojik tanı yöntemlerinin daha geçerli olması gerekçesiyle bu yöntem gereksinme duyulmaz^{2,33,43,49}.

2.9.4. İmmünodiffüzyon (İD):

İD, sıtmada daha çok epidemiyolojik uygulamalarda kullanılan bir yöntemdir. Agar-jel içinde çift yönlü diffüzyon ile presipitasyon oluşturma ilkesine dayanır. Bu yöntemle antijen kompleksinin birden fazla antijenik özellikleri de ortaya çıkarılabilmektedir. Sıtma antijenlerinin bir kompleks olduğu noktasından hareketle, antijen solüsyonunu değişik derecelerde ısıtarak ısıya göre farklı antijenik özellikler ayrılmıştır. Isıyla olan durumlarına göre; labil (L), rezistan (R), ve stabil (S) olarak üç gruba ayrılırlar. Bu antijenlerden S antijenleri, çoğunlukla paraziteminin yoğun olarak bulunduğu kişilerin serumlarında serbest olarak bulunur, antikorlarla bağlanır ve çözünür immün-kompleksleri oluşturur. Değişik türde *Plasmodium*'larla infekte edilen

hayvanlarla yapılan deneysel çalışmalar, çözüner antijen veya presipitan antikorların serumda bu yöntemle tayin edilebileceğini göstermiştir. Agar-jel diffüzyon tekniğinin, sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde uygulanmasının faydalı olabileceği, fakat, şüpheli olgularda duyarlılığın az olması nedeniyle fazla değeri olmadığı bildirilmektedir². Ancak, antijenik yapı farklılıklarının araştırılmasında veya değişik sıtma suşlarının ayrımında kullanılmaktadır^{33,49}.

2.9.5.İmmünoelektroforez (IE)

2.9.5.1.Counter current immunoelektroforez (CCIE)

Çift yönlü diffüzyon benzeri olan bu yöntemde reaksiyonu hızlandırmak için elektrik akımı kullanılır. Avantajı sürenin kısa olmasıdır. Sonuç, 30-40 dakikada alınır. IFA, IHA ve ELİSA yöntemlerinden daha düşük bir duyarlılığa sahiptir².

2.9.5.2.Crossed immunoelektroforez (Laurell Tekniği)

Bu yöntem, son zamanlarda *Plasmodium* antijenlerinin analizi için kullanılmıştır².

2.9.6.Şizont ile infekte hücrelerin aglütinasyonu (SICA):

P.knowlesi'nin şizont şekillerini içeren rhesus maymun eritrositleri özgül olarak immün serum ile aglütine olurlar. Bu reaksiyona SICA testi denilmiştir.

Bu test için şizont ile infekte bol sayıda eritrosit bulunması ve bu infekte hücrelerin oldukça saf preparatlarına ihtiyaç vardır. *P.knowlesi*, maymun eritrositlerinde yüksek oranda şizont oluşturmakta ve bu nedenle şizont içeren eritrosit solüsyonu elde edilebilmektedir. Şizont içeren eritrositler birkaç kez yıkandıktan sonra, hemaglütinasyon plakları üzerindeki çukurlar içine konup, çeşitli sulandırma derecelerindeki immün serum ilave edildiğinde bir süre sonra eğer immün serumda antikor varsa, şizontlu eritrositler aglütine olur ve pozitif sonuç alınır. Bu yöntem, bir takım teknik nedenlerden dolayı serolojik tanıda uygulama alanı bulamamıştır^{2,49}.

2.9.7.İn-vitro büyüme önleyici test:

Parazitle infekte kan, uygun koşullarda in-vitro olarak bekletilirse, infekte olmayan eritrositler de infekte olurlar. Ortamda immün serum bulunursa bu durum önlenir. Burada antijenik varyasyon yanıltıcı olabilir. Bu nedenle sero-diagnostik ve epidemiyolojik değeri yoktur².

Sıtmanın immünolojik yöntemlerle tanısında esas sorunun antijen kaynağında olduğu görülmektedir. Hasta olan küçük çocuklarda parazitli eritrosit sayısının fazla olabileceği gözönünde tutularak, çocuklardan alınacak kandaki eritrositlerin içindeki parazitlerin, immünolojik yöntemler için antijen olarak kullanılması daha iyi sonuç vermektedir^{32,33}.

Ayrıca, sıtmalılardan alınan kandan dereceli santrifüj etme yöntemi ile daha çok parazitli kan hücreleri elde edilebilmektedir. Plazmajel adı verilen değişik kimyasal yapıdaki filtrasyon maddeleri ile yüksek oranda (% 75-80) infekte eritrosit elde edilebildiği bildirilmektedir³³. Fizyolojik tuzlu su içinde % 4 jelatin solüsyonu da yoğunlaştırmada kullanılmaktadır. Bu madde ile içlerinde trofozoit ve şizont bulunan infekte eritrositlerin ayrılabilirdiği gösterilmiştir. İzotonik percollde merozoitleri, şizontları ve gametositleri ayırmada kullanılmaktadır. Böylece, %1-2'lerde olan infekte hücre sayısı %95 lere çıkarılabilmektedir^{33,49}.

Yapılan başarılı çalışmalar sayesinde *Plasmodium*'ların üretilmesi mümkün olmuştur. Kuş *Plasmodium* türlerinin doku kültürü ve tavuk embriyonunda ve özel besiyerlerinde alyuvar ve doku şekilleri, sporogoni şekilleri, memelilerin ve bunlardan maymunların bazı *Plasmodium*'ları ve özellikle *P.falciparum* üretilenmiştir⁴⁷.

Sıtma parazitlerinin üretilmesi ile ilgili ilk araştırmalar, 1912'de Bass ve Johns tarafından başlatılmıştır. Bununla beraber, insan parazitlerinin sürekli üretimi ancak 1976'da başarılmıştır. Trager ve Jensen'ın RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 besiyeri *P.falciparum*'un alyuvar içindeki şekillerini üretmek için uygun bir besiyeridir. Trager ve Jensen RPMI 1640 besiyerine insan serumu katarak ve %7 CO₂'li ve %1-5 oksijenli ortamda, 38°C de insan eritrositlerinde *P.falciparum*'u sürekli olarak üretebilmişlerdir⁴⁵.

Sıtma parazitlerinin deney hayvanlarından, yoğun parazitemili insandan ya da kültürden elde edilen eritrositlerdeki şekilleri %7,5 dimetilsülfoksit gibi soğuga karşı koruyucu bir maddeli ortamda önce alkollü kuru buzda -79°C'de dondurulduktan sonra sıvı nitrojende -196°C'de tutularak saklanabilmektedir⁴⁶.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, 1993 Nisan ile 1994 Kasım ayları arasında *P.vivax* sıtmasının endemik olarak görüldüğü Çukurovada yapıldı. Adana il merkezine bağlı Sıtma Savaş Dairesine sıtma şüphesiyle başvuranlardan kan alındı. Kalın damla ve yayma preparatları hazırlandı, giemsa ile boyandı. *P.vivax*'lı 441, *P.vivax*'sız 91 kişiden ve Ç.Ü.Tıp Fakültesi Kan Merkezine kan vermek amacıyla başvuran 120 donörden kan alındı. Her örnek için bir kayıt formu düzenlendi. 441 sıtmalı ve 211 sıtmasız, toplam 652 kanın serumları ayrılarak -20°C'de saklandı.

Çalışmada, kaynaklara^{11,24,34,40,49} uygun olarak *P.vivax* homolog antijeni ve *P.berghei* heterolog antijeni kullanıldı.

Homolog antijen için olgun trofozoitler ve şizontların yoğun olduğu hastalardan EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)'lı tüpe 5 cc kan alındı. Antijen hazırlanırken her mikroskop alanında en az 5-10 sıtma parazitinin olmasına özen gösterildi. Bundan az olanlar antijen olarak kullanılmadı. Heterolog antijen için de parazit sayısının yoğun olmasına dikkat edildi.

Homolog ve heterolog antijenler, her biri 0.5 mm çapında 10 adet çemberi bulunan özel lamlara alındı ve IFAT için Sulzer⁴⁰'in yöntemi uygulandı.

3.1.Antijenin hazırlanması

3.1.1.Homolog antijenin hazırlanması:

* EDTA'lı tüpe alınan kan, santrifüj edilerek plazması ayrıldı.

* Eritrosit kitlesinin 10 katı pH:7.2 PBS (phosphate buffer saline) ile karıştırılıp santrifüj edildi. Üst kısım atıldı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı. Başlangıçtaki hacime ulaşana dek PBS ilave edildi. Parazit sayısı az olduğunda PBS oranı azaltıldı, çok olduğunda PBS ilave edildi.

* Bu şekilde hazırlanan kandan, lam üzerindeki her çembere 10 µl damlatıldı. Her damla, kalın damla preparasyonunda olduğu gibi yayıldı.

* Oda ısısında kurutulan lamlar 5'erli gruplar halinde ince pelur kağıdına sarılarak nem çekici madde (silika-jel) ile birlikte plastik torbalara kondu ve ağızları kapatılarak -70°C'de deney yapılıncaya kadar saklandı.

3.1.2.Heterolog antijenin hazırlanması:

* Daha önceden elimizde bulunan ve -196°C 'de saklanan, farelerde sıtma etkeni olan *P.berghei*'nin eritrositer dönem parazitleri çözülerek, 2 defa serum fizyolojik ile yıkandı. Sonra 1/5 oranında serum fizyolojik ile seyreltildi.

* Hazırlanan bu süspansiyondan 0.3 ml beyaz (albino) fare peritonuna inoküle edildi.

* Belirli aralıklarla paraziteminin yoğunluğu kalın damla preparatı yapılarak incelendi ve her alanda 15-20 parazitin bulunduğu fareden kan alınarak homolog antijenin hazırlanmasında kullanılan yöntem heterolog antijen için de uygulandı ve elde edilen heterolog antijen preparatları deney yapılıncaya kadar -70°C 'de saklandı.

3.2.Testin uygulanması:

* Antijen bulunan lamalar -70°C 'den çıkarıldıktan sonra oda ısısında bekletildi.

* Lamlar, şale içerisinde 10 dakika distile suda hafifçe çalkalandı ve eritrositlerin parçalanması sağlandı.

* Serum örnekleri pH:7.2 olan PBS ile 1/4 sulandırımından başlayarak sulandırıldı ve dört kat sulandırım (1/16, 1/64, 1/256, 1/1024) şeklinde deneye alındı.

* Dilüsyonu yapılmış örneklerden her çembere 10 μl damlatıldı. Homolog ve heterolog antijenler ile ayrı ayrı her hasta için IgG ve IgM değerlerini belirlemek için iki seri çalışıldı.

* Lamlar, içerisi nemli olan plastik kutu içinde 37°C 'de 30 dakika inkübasyona tabi tutuldu. Sonra 3 kez PBS ile yıkandı.

* Kuruduktan sonra lamaların üzerine 1/40 oranında sulandırılan ve %0.2 Evans-Blue ilave edilen Fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretli anti-human immunoglobulin IgG (τ -chain) ve IgM (μ -chain) (Behring)'den 10 μl damlatıldı.

* Lamlar, yine nemli ortamda 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. Sonra 3 kez PBS ile yıkandı.

* Kuruduktan sonra lamaların üzerine tamponlu gliserol (9 birim gliserin, 1 birim PBS karışımı pH:8.0) damlatılıp üzerine lamel kapatıldı. Bu şekilde hazırlanmış preparatlar aynı gün incelendi.

Çalışmada, kontrol olarak olumlu ve olumsuz serumlar aşağıdaki gibi hazırlandı.

1- Lam üzerinde, ilk çemberdeki antijen preparatı üzerine sadece PBS damlatıldı ve FITC işaretli anti-humanglobulin solusyonu ile boyandı (Buffer kontrol preparatı). Bu çemberde floresan görülmedi.

2- İkinci çemberdeki antijen preparatı üzerine normal serum kondu (olumsuz kontrol preparatı). Bu çemberin floresan vermediği görüldü.

3- Üçüncü çemberdeki antijen preparatı üzerine bu antijene karşı önceden titresi saptanmış özgül antikorun bulunduğu serum kondu. Preparat, FITC işaretli anti-humanglobulinle boyandı (olumlu kontrol preparatı). Sonuçta bütün sulandırma derecelerinde parlak floresan görüldü.

Kontrol olarak, 2 olumlu kontrol serum, 1 olumsuz kontrol serum, 1 boş çember, 1 sadece PBS damlatılmış çember her çalışmada kullanıldı.

Çalışmada, olumsuz kontrol serumu, daha önce sıtma geçirmeyen ve sıtmanın endemik olmadığı bölgede yaşayan annenin 6 aylık bebeğinden alındı. Olumlu kontrollerden birisi 6 ay önce, diğeri ise 2 ay önce ikinci defa sıtma geçirmiş ve yüksek düzeyde antikor (1/1024) saptanan kişilerden sağlandı.

Tüm testler, Leitz Laborlux D Floresan mikroskobu ile değerlendirildi. Işık kaynağı olarak basınçlı cıva buharı ihtiva eden Osram HBO-50 lambası ve Leitz G blok filtresi kullanılarak inceleme 10x40 büyütme ile değerlendirildi.

Sıtma parazitlerinin trofozoitleri, çeşitli amoboid ve şizont şekillerinin, çekirdek ve sitoplazmalarının %50'den fazlasının sarı-yeşil renkte floresan verdiği son sulandırım titresi olumlu olarak kabul edildi.

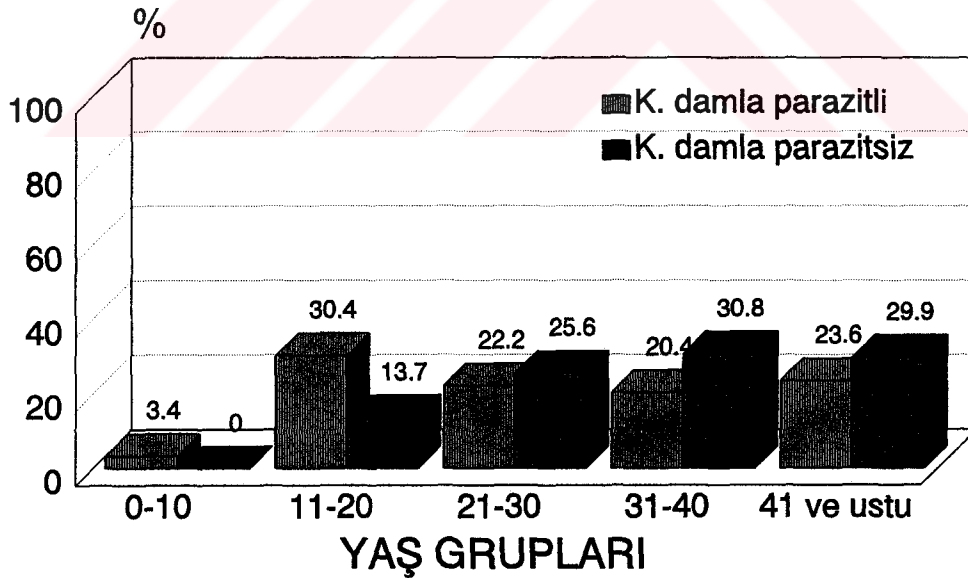
4.BULGULAR

Kalın damla incelenmesinde parazit bulunan 441 ve parazit bulunmayan 211 olmak üzere toplam 652 serum örneği bu çalışmada değerlendirildi. Çalışma, yaşları 4 ile 85 arasında değişen kişilerde yapıldı ve yaş grupları 5 bölümde toplandı.

Tablo-I. 652 kişinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.

YAŞ	K.damla parazitli		TOPLAM	K.damla parazitsiz		TOPLAM
	K	E		K	E	
0-10	4	11	15 (%3.4)	-	-	- (%0)
11-20	54	80	134 (%30.4)	18	11	29 (%13.7)
21-30	30	68	98 (%22.2)	24	30	54 (%25.6)
31-40	32	58	90 (%20.4)	25	40	65 (%30.8)
41 ve yukarısı	30	74	104 (%23.6)	11	52	63 (%29.9)
Toplam	150	291	441(%100.00)	78	133	211(%100.00)
Genel Toplam	441			211		

Çalışma, 150'si sıtmalı ve 78'i sıtmasız toplam 222 kadın, 291'i sıtmalı ve 133'ü sıtmasız toplam 424 erkekte yapıldı. Kalın damlada parazit bulunanların çoğunluğu 11-20 yaş grubunda, kalın damlada parazit bulunmayanların çoğunluğu 31-40 yaş grubunda toplanmaktaydı (Tablo-I) (Şekil-1).



Şekil-1: Sıtmalı ve sıtmasız 652 kişinin yaş gruplarına göre dağılımı.

Sıtma paraziti bulunanlardan 340'ı (%77.10) Adana'nın çeşitli kasaba ya da köylerinde, 101'i (%22.90) Adana merkezinde yaşamaktaydılar. Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde en fazla sıtmalı; Mürseloğlu, Koyuncu, Yunusoğlu, Yalmanlı ve Yenidam kasaba ya da köylerinden başvuranlarda bulundu. Çalışmada IgG için 1/64'lik sulandırım, IgM için 1/16'lık sulandırım olumluluğun alt sınırı kabul edildi.

Kalın damlada 441 parazit bulunan ve 211 parazit bulunmayan serumlarda, IFAT ile *P.vivax* sıtmasına karşı elde edilen antikorların dağılımı Tablo-II ve Şekil-2'de gösterildi. 441 serumun %69.16'sında homolog antijen ile, %4.30'unda ise heterolog antijen ile olumlu sonuç alındı.

Kalın damlada parazit bulunmayan 211 kişinin serumlarında, IFAT ile *P.vivax* sıtmasına karşı elde edilen antikorların dağılımında; %6.16'sında homolog antijen ile olumlu sonuç alınırken, heterolog antijen ile olumlu titrede antikor elde edilmedi (Tablo-II, Şekil-2).

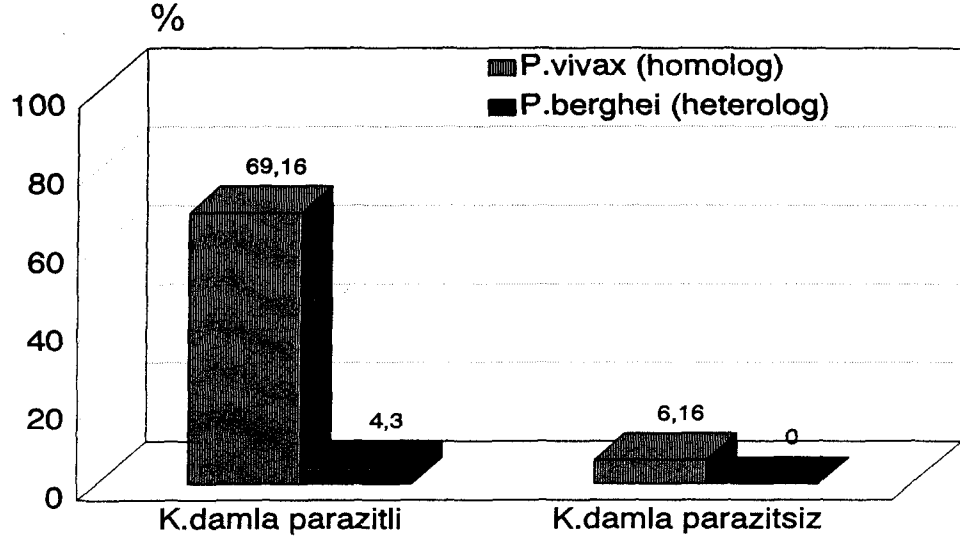
Tablo-II. Kalın damla incelemesi yapılan 441 parazitli ve 211 parazitsiz olgunun IgG ve IgM antikorları yönünden karşılaştırılması (IgG ve IgM değerleri aynı kişiden elde edilen değerlerdir)

İmmüoglobulinler*	K.damla parazitli n=441		K.damla parazitsiz n=211	
	<i>P.vivax</i> homolog antijeni ile	<i>P.berghei</i> heterolog antijeni ile	<i>P.vivax</i> homolog antijeni ile	<i>P.berghei</i> heterolog antijeni ile
IgG (+) IgM (+)	142 (%32.20)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
IgG (+) IgM (-)	130 (%29.48)	19 (%4.30)	13 (%6.16)	0 (%0)
IgG (-) IgM (+)	33 (%7.48)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
IgG (-) IgM (-)	136 (%30.84)	422 (%95.70)	198 (%93.84)	211 (%100.00)
TOPLAM	441 (%100.00)	441 (%100.00)	211 (%100.00)	211 (%100.00)

* Çalışmada, IgG için 1/64, IgM için 1/16 ve üzeri olumlu titre kabul edildi.

Sıtmalılardan %32.20'sinden homolog antijen ile hem IgG ve hemde IgM tipi antikor elde edilirken, bu grupta sıtmalılardan heterolog antijen ile ayrıca sıtmasızlardan homolog ve heterolog antijenlerle antikor elde edilmedi (Tablo-II).

Sadece IgG, sıtmalılarda homolog antijen ile %29.48, heterolog antijen ile %4.30 oranında elde edildi. Bu gruptan sıtmasızlarda ise homolog antijen ile %6.16 oranında antikor elde edilirken, heterolog antijen ile antikor elde edilmedi (Tablo-II).



Şekil-2.Kalın damlada parazit bulunan ve bulunmayan gruplarda, homolog ve heterolog antijenlerle *P.vivax* sıtmasına karşı elde edilen antikorların karşılaştırılması.

IgM ise, sıtmalı ve sıtmasız gruplar içerisinde homolog antijen ile sadece sıtmalılarda %7.48 oranında elde edildi (Tablo-II).

IgG ve IgM tipi antikor elde edilmeyenlerin oranı, homolog antijen ile sıtmalılarda %30.84, heterolog antijen ile %95.70, sıtmasızlarda homolog antijen ile %93.84, heterolog antijen ile %100 olarak bulundu (Tablo-II).

441 sıtmalı ve 211 sıtmasız serum örneğinde IFAT'ın geçerliliğini ortaya çıkarmak için yaptığımız metodolojik değerlendirmede, *P.vivax* homolog antijeninin duyarlılığı %69.16, özgüllüğü %93.84 olarak belirlendi. *P.berghei* heterolog antijeninin duyarlılığı %4.30, özgüllüğü %1.00 olarak belirlendi.

Kalın damla incelemesi sonucunda, parazitli ve parazitsiz gruplarda IgG ve IgM tipi antikorların homolog ve heterolog antijenlerle elde edilen sonuçları Tablo-III,IV,V,VI'da gösterildi.

Tablo-III. Kalın damla incelemesi sonucu *Plasmodium vivax* saptanan olgularda homolog antijen ile elde edilen IFAT IgG değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.

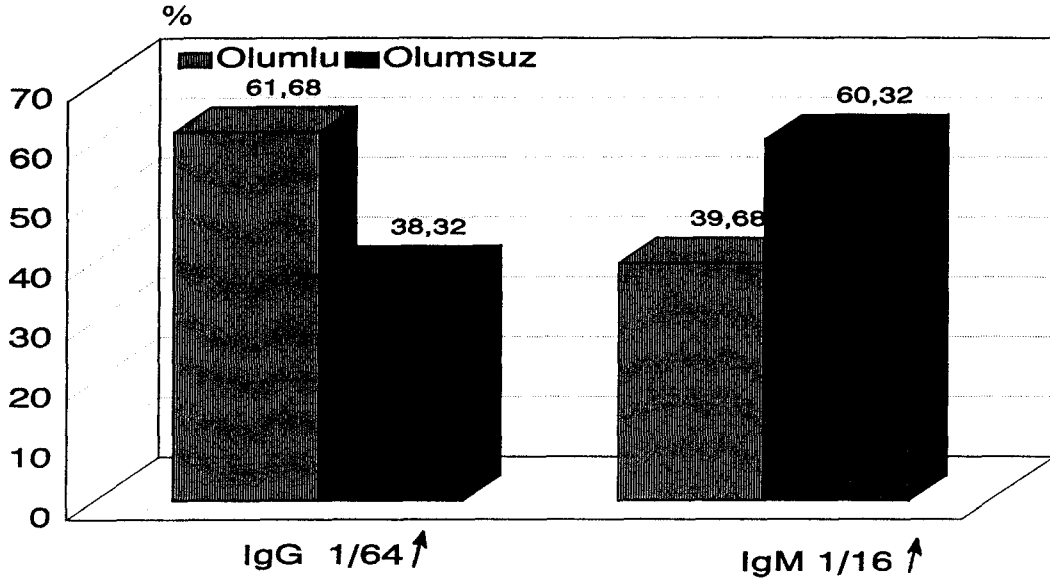
YAŞ	(-)		1/16		1/64		1/256		1/1024		Olumlu Serum sayısı		Toplam Serum Sayısı	
	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E
0-10		2		5		2	4	1		1	4	4	4	11
11-20	10	10	10	19	21	33	12	16	1	2	34	51	54	80
21-30	5	8	5	17	10	23	8	18	2	2	20	43	30	68
31-40	3	9	12	16	5	29	10	4	2		17	33	32	58
41 ve yukarısı	4	9	7	18	14	31	5	15		1	19	47	30	74
Toplam	22	38	34	75	50	118	39	54	5	6	94	178	150	291
Genel Toplam	60		109		168		93		11		272		441	

Kalın damlada parazit bulunanlarda, homolog antijen ile olumlu titrede IgG tipi antikor, en çok 1/64 ve 1/256 titrelerinde yoğunlaşırken, en yüksek antikor titresi 11 kişide 1/1024 olarak bulundu. Bu grupta 272 kişide (%61.68) olumlu titrede antikor elde edildi (Tablo-III, Şekil-3).

Tablo-IV. Kalın damla incelemesi sonucu *Plasmodium vivax* saptanan olgularda homolog antijen ile elde edilen IFAT IgM değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı

YAŞ	(-)		1/16		1/64		1/256		1/1024		Olumlu Serum sayısı		Toplam Serum Sayısı	
	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E
0-10		6	3	3	1	1		1			4	5	4	11
11-20	29	43	21	25	4	12					25	37	54	80
21-30	20	39	4	19	4	9	2	1			10	29	30	68
31-40	18	42	6	13	7	1	1	2			14	16	32	58
41 ve yukarısı	21	48	7	14	2	10		2			9	26	30	74
Toplam	88	178	41	74	18	33	3	6			62	113	150	291
Genel Toplam	266		115		51		9				175		441	

Kalın damlada parazit bulunanlarda, homolog antijen ile olumlu titrede IgM tipi antikor, en çok 1/16 titrede yoğunlaşırken, en yüksek antikor titresi 9 kişide 1/256 olarak bulundu. Bu grupta 175 kişide (%39.68) olumlu titrede antikor elde edildi (Tablo-IV, Şekil-3).

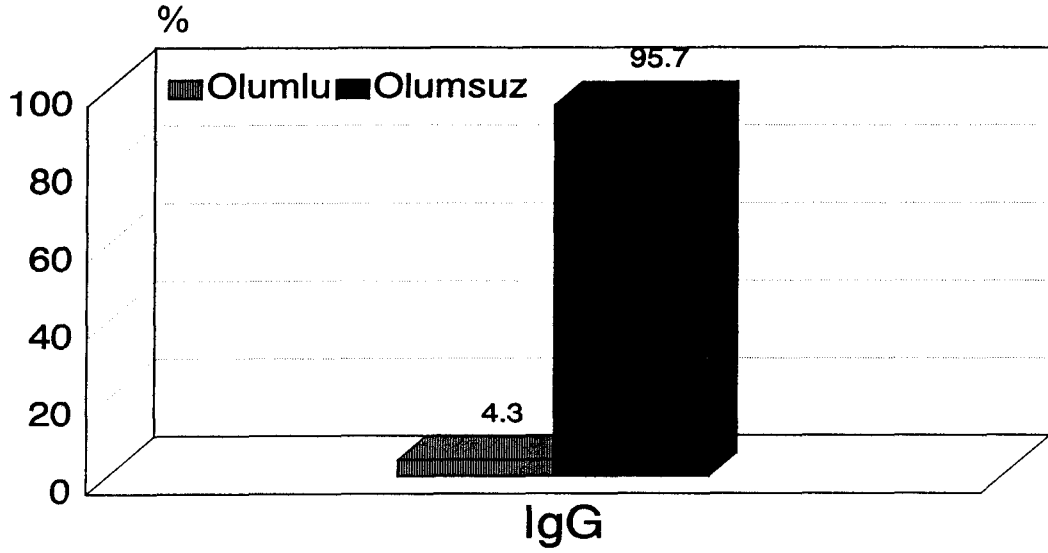


Şekil-3. Sıtma saptanan olgularda homolog antijen ile elde edilen IgG ve IgM tipi antikorların karşılaştırılması.

Tablo-V. Kalın damla incelemesi sonucu *Plasmodium vivax* saptanan olgularda heterolog antijen ile elde edilen IFAT IgG değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı

YAŞ	(-)		1/16		1/64		1/256		1/1024		Olumlu Serum sayısı		Toplam Serum Sayısı	
	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E
0-10	4	9		2									4	11
11-20	45	75	8	4	1	1					1	1	54	80
21-30	26	52	2	7	2	9					2	9	30	68
31-40	27	52	5	5		1						1	32	58
41 ve yukarısı	26	58	3	12	1	4					1	4	30	74
Toplam	128	246	18	30	4	15					4	15	150	291
Genel Toplam	374		48		19						19		441	

Kalın damlada parazit bulunanlarda, heterolog antijen ile olumlu titrede IgG tipi antikor, sadece 19 kişide (%4.30) elde edildi (Tablo-V, Şekil-4).

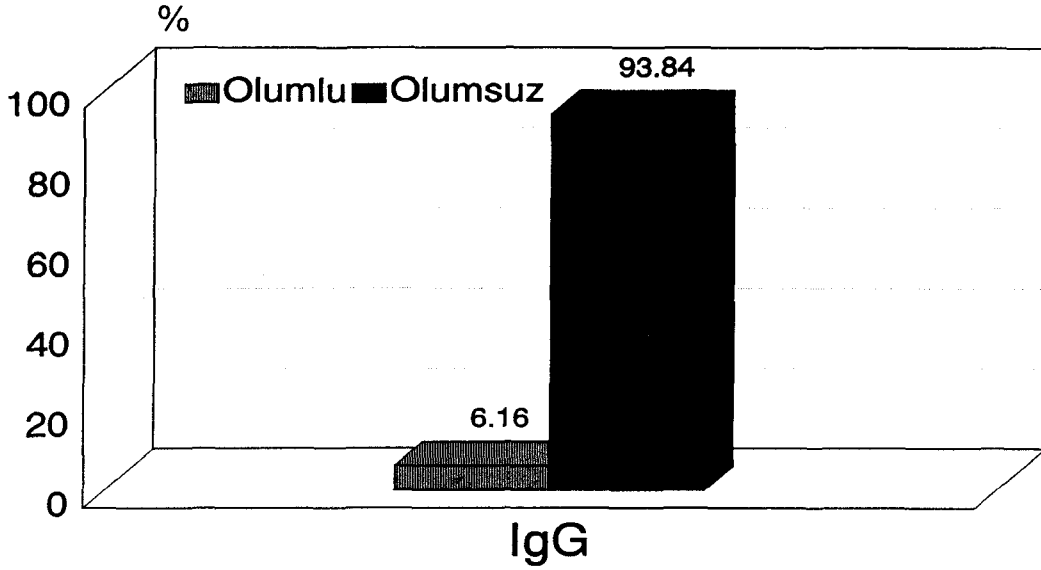


Şekil-4. Sıtma saptanan olgularda heterolog antijen ile elde edilen IgG antikorları.

Tablo-VI. Kalın damla incelemesi sonucu *Plasmodium vivax* saptanamayan olgularda homolog antijen ile elde edilen IFAT IgG değerlerinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.

YAŞ	(-)		1/16		1/64		1/256		1/1024		Olumlu Serum sayısı		Toplam Serum Sayısı	
	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E
0-10														
11-20	11	10	3	1	3		1				4		18	11
21-30	22	28		2			2				2		24	30
31-40	24	34	1	4			2				2		25	40
41 ve yukarı	11	43		4			3				5		11	52
Toplam	68	115	4	11	3	5	3	2			6	7	78	133
Genel Toplam	183		15		8		5				13		211	

Kalın damlada parazit bulunmayanlarda, homolog antijen ile olumlu titrede IgG tipi antikor, en çok 1/64 titrede yoğunlaşırken, en yüksek antikor titresi 5 kişide 1/256 olarak bulundu. Bu grupta 13 kişide (%6.16) olumlu titrede antikor elde edildi (Tablo-VI, Şekil-5).



Şekil-5. Sıtmasız grupta homolog antijen ile elde edilen IgG antikorları.

Tablo-VII. Kalın damla incelemesinde parazit bulunan ve bulunmayan gruplarda daha önceki yıllarda sıtma geçiren ve geçirmeyenlerin, ayrıca elde edilen antikorların oranları.

K.damla parazitli n=441				K.damla parazitsiz n=211			
Daha önce sıtma geçirenler 158 (%35.82)		Daha önce sıtma geçirmeyenler 283 (%64.18)		Daha önce sıtma geçirenler 66 (%31.28)		Daha önce sıtma geçirmeyenler 145 (%68.72)	
IFAT(+)	IFAT (-)	IFAT(+)	IFAT (-)	IFAT(+)	IFAT (-)	IFAT(+)	IFAT(-)
105 (%66.46)	53 (%33.54)	167 (%59.01)	116 (%40.99)	9 (%13.64)	57 (%86.36)	4 (%2.76)	141 (%97.24)

Kalın damla incelemesi sonucunda sıtma saptananlardan %35.82'sinin daha önce sıtma geçirdikleri, %64.18'inin ise sıtma geçirmedikleri, sıtmasızlardan ise %31.28'inin daha önce sıtma geçirdikleri, %68.72'sinin daha önce sıtma geçirmedikleri belirlendi (Tablo-VII).

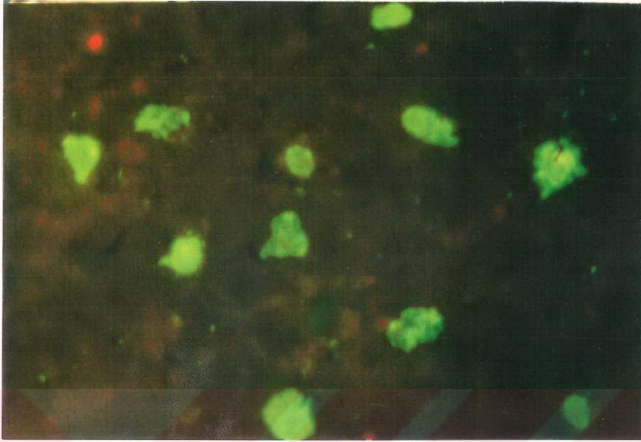
441 sıtmalıdan, daha önce sıtma geçirenlerin içerisinde %66.46'sından, daha önce sıtma geçirmeyenlerin %59.01'inden antikor elde edildi. 211 sıtmasızdan, daha önce sıtma geçirenlerin içerisinde %13.64'ünden, daha önce sıtma geçirmeyenlerin %2.76'sından antikor elde edildi (Tablo-VII).

Tablo-VIII. Sıtma tanısı konduğunda ve 60 gün sonrasında alınan serum örneklerinde homolog antijen ile elde edilen antikorlar.

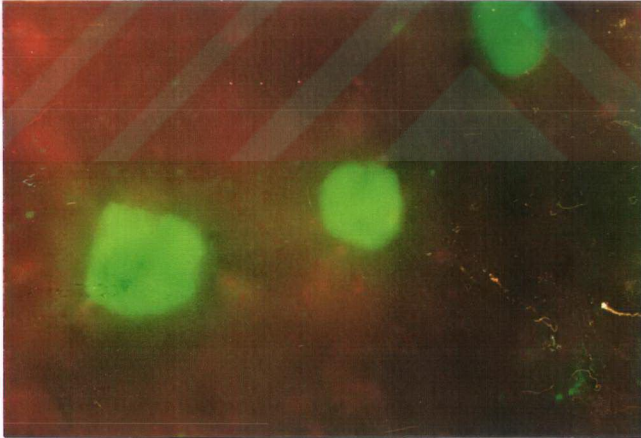
	Cinsiyet	YAŞ	Daha önceki Sıtma Durumu	1.Geliş		2.Geliş	
				IgG	IgM	IgG	IgM
1	E	25	-	1/64	1/4	1/64	1/16
2	K	24	10 yıl önce	1/64	1/16	1/256	1/64
3	E	40	6 yıl önce	1/256	-	1/1024	1/64
4	K	13	1 yıl önce	1/64	1/4	1/256	1/64
5	E	11	2 yıl önce	1/256	1/4	1/256	1/16
6	K	16	-	1/64	-	1/256	1/16
7	K	30	-	1/64	1/64	1/256	1/64
8	K	12	2 ay önce	1/256	1/16	1/64	1/4
9	K	35	10 yıl önce	1/16	1/16	1/256	1/64
10	E	46	2 yıl önce	1/256	1/64	1/256	1/4
11	E	30	-	1/256	1/16	1/1024	1/64
12	E	32	-	1/16	-	1/256	1/16
13	K	41	-	1/16	-	1/256	1/64

Tablo-VIII'de 6 erkek ve 7 kadından oluşan grupta akut dönemde ve iki ay sonrasında elde edilen antikor titreleri arasındaki fark görülmektedir.

IgG değerinin 9 kişide 2 ay sonra 1/64 ve üzerindeki titrelerde arttığı, 3 kişide değişmeden kaldığı ve 1 kişide düştüğü, IgM değerinin ise 10 kişide 2 ay sonra 1/16 ve üzerindeki titrelerde arttığı 1 kişide değişmeden kaldığı, 2 kişide düştüğü gözlemlendi.



Şekil-6.Homolog antijen ile antikor elde edilen bir örneğin floresan mikroskobundaki görünüşü (x400).



Şekil-7.Homolog antijen ile antikor elde edilen bir örneğin floresan mikroskobundaki görünüşü (x1000).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, bölgemizde sıtmanın yeniden artmaya başladığı dikkati çekmektedir. Özellikle 1990 yılından sonra sıtma olgularının daha önceki yıllara kıyasla artması bu sorunun önemini yeniden gündeme getirmiştir. Sıtmalıların bölgemizdeki durumunun sadece kalın damla yöntemiyle gösterilmesinin yetersiz olmasını gözönüne alarak ve belirtisiz sıtma infeksiyonlarının oranının saptanması amacıyla normal kişilerden ve sıtmalılardan kan alınarak serolojik tanı yöntemlerinden IFA tekniği çalışmamızda uygulandı. Bu test için antijen kaynağı olarak insandan elde edilen *P.vivax* homolog antijeni ve fareden elde edilen *P.berghei* heterolog antijeni kullanıldı.

Çalışmada, en çok sıtmalı 11-20 yaş grubunda, sıtmasız 31-40 yaş grubunda toplanmıştır (Tablo-I, Şekil-1).

İncelenen 652 serum örneğinde, homolog antijenin heterolog antijene kıyasla duyarlı ve özgül sonuçlar verdiği gözlemlendi. Çalışmada, *P.vivax* homolog antijenin duyarlılığı %69.16, özgüllüğü %93.84, *P.berghei* heterolog antijenin duyarlılığı %4.30, özgüllüğü %1.00 olarak belirlendi.

Sıtmalı serumların, %69.16'sında homolog antijen ile olumlu sonuç elde edilirken, %30.84'ünde antikor elde edilmemesi bu olgulardan akut dönemde kan alınmış olmasından ileri gelebilir (Tablo-II, Şekil-2).

Sıtmalı serumlardan heterolog antijen ile, %4.30 oranında olumlu titrede antikor elde edilmesi ve %95.70 oranında antikor elde edilmemiş olması heterolog antijenin güvenilirliğinin oldukça düşük olduğunu gösterdi (Tablo-II, Şekil-2).

Sıtmasızların serumlarından, 13'ünde (%6.16) homolog antijen ile olumlu titrede antikor elde edilmesi bu 211 kişinin içerisinde de sıtmalıların olabileceği ya da geçmişte sıtma geçirenlerin bu grupta olabileceği fikrini verdi (Tablo-II, VI, Şekil-5). Yapılan incelemede bu 13 kişiden 9'unun daha önce sıtma geçirdiği fakat, 4'ünün daha önce sıtma geçirmediği saptandı (Tablo-VII).

Kuvin ve ark.²², *P.vivax* ile infekte gönüllülerde yaptıkları çalışmalarında, parazitlerin kanda görülmesinden kısa bir süre sonra antikorun saptanabildiğini, bir iki hafta içinde bu

antikor miktarının artarak, sonraki aylarda yavaş yavaş azaldığını, antikorun saptanmasında parazitin türünün ve yoğunluğunun önemli olduğunu bildirmişlerdir. Kuvin ve ark.²³, hastalık belirtisinin ortaya çıkışından 6 gün sonra antikor saptanmaya başladığını, IFA tekniğinin iyi uygulandığında yalancı olumluluk oranının az olduğunu vurgulamışlardır.

Yapılan çalışmalarda, sıtma antikorlarının, hastalığın iyileşmesinden veya tamamen tedavi edilmesinden 1 ay sonra⁴⁴, 2 veya 3 ay sonra⁵¹, 252 gün sonra²⁶ görülmeyecek kadar azaldığı bildirilmiştir. Collins ve ark.⁶, *P.vivax* sıtmasında tedaviden 20 ay sonra, hatta 3 yıl sonra⁹ antikor saptanabildiğini, özellikle *P.malaria*'da 24 yıl sonra dahi antikor elde edildiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ise kalın damlada parazit bulunmayanlar içerisinde daha önce sıtma geçirenlerin %13.64'ünde olumlu sonuç elde edildi (Tablo-VII). Bu grup içerisinde de 2,5 hatta 10 yıl önce sıtma geçirenler bulunmaktaydı.

Wilson ve ark.⁵¹, sıtmalı hastalarda antikor titresinin 1/4096'ya kadar çıktığını, tedaviden 6 ay sonra ise 1/16'ya düştüğünü bildirmişlerdir. Homolog antijen ile yapılan bu çalışmada belirtilerin ortaya çıkmasından 60 gün sonra alınan serum örneklerinin %98.7'sinde 1/16 ve üzerinde antikor elde edildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise 60 gün sonra alınan serum örneklerinin %100'ünde IgG tipi ve %84.6'sında IgM tipi antikor elde edildi (Tablo-VIII).

Collins ve Skinner'e göre, daha önce sıtma geçiren hastalar, tekrar bu hastalığa yakalandıklarında kandaki antikor düzeyi, ilk hasta oldukları zamana göre çok daha yüksek olmaktadır¹¹. Ayrıca, bağışıklık kazanmış kişiler yeniden infekte olduklarında bağışıklığı olmayanlara kıyasla daha kısa zamanda ve yüksek titrede antikor vermektedirler⁴⁸. IFA tekniği kullanılarak sıtma antikorlarının hangi çeşit immunoglobulinlerden oluştuğu hakkında Collins'in yaptığı çalışmalarda IgG ve IgM yapısında olan antikorların sıtma için özel olduğu, IgA yapısında olan antikorların ise, sıtma antijenine karşı çok az aktif olduğu açıklanmıştır¹⁰.

Collins ve ark.¹⁰, *P.falciparum* ve *P.vivax* ile infekte 90 kişide IFAT ile IgG, IgM ve IgA tipi antikorları aramışlar, özellikle IgG tipi antikorun uzun süre elde edilebildiğini bildirmişlerdir. Lege ve ark.²⁵ ise, 17 sıtmalı hastada yaptıkları IFA çalışmalarında tedaviyi izleyen 2 ay sonrasında IgG ve IgM tipi antikor düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir.

Tobie⁴³, *P.vivax* sıtmasında kan evresi parazitlerinin antijenik uyarımı sağladığını ve antikorların meydana gelmesine neden olduğunu, fakat eritrosit şekillerinin ortaya çıkmasından

önce antikorların elde edilemediğini bildirmiştir.

Tanıda elde edilen olumlu sonuç bilindiği gibi şahsın o anda aktif infeksiyonlu olduğunu göstermez. Bunun saptanmasında titre artışlarının veya IgM varlığının gösterilmesinin büyük önemi vardır^{2,6,26,35}. Çalışmamızda 13 sıtmalının 9'unda IgG ve 10'unda IgM düzeyinin 60 gün öncesine göre arttığı görüldü (Tablo-VIII).

Rawlins ve ark.³⁵, Guyana'da ateş etiyolojisi ile hastaneye başvuran 297 kişiden kalın damla ve yayma preparat incelemeleri sonucunda %47.8 oranında sıtma saptamışlardır. Bu kişilerin, %81.3'ünde IgG ve %60.1'inde IgM'i olumlu bulmuşlardır. Araştırmacılar, akut sıtma olgularının ortaya çıkartılmasında IgM antikorlarının elde edilmesinin daha anlamlı olduğunu bildirmişler ve IgG için olumlu titreyi 1/256 olarak almışlardır.

Çalışmamızda, sıtmalılardan 272'sinde (%61.68) IgG (Tablo-III, Şekil-3) ve 175'inde (%39.68) IgM antikorunu elde edildi (Tablo-IV, Şekil-3).

CDC (Centers for Disease Control), IFAT ile kronik olgular ve özellikle kalın damla sonucu parazit bulunmayanlar için 1/64 ve üstündeki titreleri olumlu kabul edilmektedir²⁹.

Sulzer ve ark.⁴⁰, IFAT için en düşük olumlu titreyi 1/16 olarak almışlardır. Bununla beraber bazı araştırmacılar 1/20 ve üzerini^{4,15,19,37} bazıları ise 1/80 ve üzerini²⁸ olumlu titre kabul etmişlerdir. MacLeod ve ark.²⁷ ise, olumlu titreyi IgG için 1/64, IgM için 1/16 olarak kabul etmişlerdir. Çalışmamızda da IgG için 1/64, IgM için 1/16 olumlu titre kabul edilmiştir.

Kullandığımız antijen hazırlama yönteminde^{39,40}, eritrositler PBS ile yıkanarak gama globulinler uzaklaştırılmış ve özel olmayan boyanmaların ortaya çıkması önlenmiştir. Sulzer ve ark.⁴⁰, kalın damlada parazit görülen kişilerin serumlarının homolog antijen ile bağışık yanıt verdiğini fakat, heterolog antijen ile bu yanıtı vermediğini görmüşlerdir.

Bölgemizde görülen sıtmalılardan, özellikle akut olgularda sıtma antikorlarının varlığı gösterilmiş olup, *P.berghei* antijeni ile kalın damlada parazit görülen olgularda olumsuz sonuç alınmıştır. Çalışmamızda, 19 kişide (%4.30) olumlu sonuç alınması heterolog antijenin kullanılabilirliğinin az olduğunu gösterdi (Tablo-V, Şekil-4). Dolayısıyla bu antijen yeterli duyarlılıkta çalışmamaktadır. Özcel ve ark.³⁴'da, *P.vivax* homolog antijeninin, *P.berghei* heterolog antijeninden daha iyi ve duyarlı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. *P.berghei* ile test ettikleri ve olumsuz sonuç aldıkları 17 olgunun 11'inin *P.vivax* antijeni ile 1/80 sulandırma derecelerine kadar olumlu sonuç verdiğini görmüşlerdir.

Kalın damla incelemesinde parazit görülmeyen 211 kişinin içinde sıtma geçirmemiş 145 kişiden 4'ünde antikor saptanırken 141'inde antikor saptanamadı (Tablo-VII). Bu 4 (%2.76) kişinin kalın damla incelemesinde; muhtemelen paraziteminin az olması nedeniyle tanının konulmadığı, sıtmaya uyan klinik belirtilerinin olması ve IFA yöntemiyle de antikorun saptanması nedeniyle bunların sıtma olabileceği düşünüldü.

Hornstein ve ark.¹⁸, Kaliforniya'da sıtmalı ve sıtmasız 488 örneğe IFA tekniğini uygulamışlar ve parazitemisi olmayan 94 (%19.3) kişide sıtma antikoru göstermişlerdir.

El Salvador'da yapılan bir çalışmada, sıtmanın düşük oranlarda görüldüğü bölgede, 235 çocukta kalın damla yöntemiyle parazit görülmezken, IFA tekniği ile %3.4 oranında olumlu sonuç elde edilmiştir. Sıtmanın yoğun olarak bulunduğu bölgede ise 618 kişide %3.5 oranında kalın damlada parazit görülürken, IFA tekniği ile bu oran %24,7'yi bulmuştur¹⁵.

Jeffery ve ark.¹⁹, Brezilya'da filtre kağıdına aldıkları 4000'den fazla kan örneğine IFA tekniği uygulayarak sıtma antikorları aramışlardır. Kalın damla ile parazitemi oranının %2.3 olduğunu, 1/20 olarak kabul ettikleri olumlu titrenin üzerinde %13.6 oranında antikor elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, sıtma saptananların %77.10'u kırsal kesimde ve %22.90'ı Adana merkezinde yaşamaktadır. Bu farkın şehir merkezinde sivrisinekle mücadelenin etkili olarak uygulanmasından ve kırsal kesimde anofellerin kolay üreme alanları bulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Collins ve ark.⁸, 498 kişinin serumlarında IFAT çalışmışlar ve erkeklerde kadınlara oranla daha fazla antikor saptadıklarını bildirmişlerdir.

Thomas ve Dissanaïke⁴², Malezya'da IFAT ile yaptıkları çalışmalarında; erkeklerde daha yüksek oranda antikor saptarken, olumlu antikor titresi olarak 1/64 ve üzerini kabul etmişlerdir. İncelemeyi yaptıkları 288 kişiden %89 oranında olumlu titrede antikor saptamışlardır.

Çalışmamızda, erkeklerden 178/291 (%61.2) ve kadınlardan 94/150 (%62.7) oranında olumlu titrede IgG antikoru elde edildi (Tablo-III).

Bazı araştırmacılar^{5,6,43}, yalancı olumlu reaksiyonların, lamların aseton içerisinde bekletilmesi ile önleneceğini bildirirken, bazı araştırmacılar ise buna gerek olmadığını belirtmişlerdir⁴⁸. Çalışmamızda da aseton kullanılmamıştır.

Sulzer ve ark.⁴⁰, antijen bulunan lamaların %0.1 HCl ile muamele edilmesinin, parazitin aside duyarlı olmasından dolayı etkilendiğini, dolayısıyla yüksek titrede olumlu sonuç alınmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Fakat, sadece PBS ile antijen hazırlama yönteminde antikor titrelerinin olduğu gibi elde edildiğini ve yalancı olumluluk oranının %1'in altına indiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, antijenin yıkanmasının ve hazırlanmasının iyi yapılması gerektiği anlaşıldı. Yani antijenin iki kez yıkanmasıyla oto antikorlar tam giderilememekte dolayısıyla yalancı olumlu sonuçlar alınmaktadır. Bunu gidermek için PBS ile 5 defa yıkama işlemi uygulandı ve yalancı olumlu sonucun alınmadığı olumsuz kontrol preparatlarda gözlemlendi.

Sulzer ve ark.⁴¹, tek tip antijen yerine *P. vivax*, *P. falciparum* ve *P. brasilianum*'dan oluşan karışık bir antijen hazırlayıp IFA tekniğini uygulamışlardır. Araştırmacılar, tek tip antijen türüne kıyasla bu antijenin daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu yöntemin birden fazla sıtma türünün yoğun olarak bulunduğu bölgelerde yapılması uygundur. Tek türün bulunduğu bölgemizde tek tip antijenin kullanılması yeterlidir.

Archibald ve ark.³, Malezya'da sıtmanın endemik olduğu bölgede IFA ve ELİSA yöntemlerini karşılaştırmışlar ve parazitemi yoğunluğu ile elde edilen antikorların orantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Youssef ve Rich⁵⁴, küçük çocuklarda görülen ateş ile sıtma arasında ilişkinin olup olmadığını incelemek amacıyla 129 çocuktan aldıkları kan örneklerinden IFAT ile 8'inde antikor varlığını göstermişlerdir.

Wilson ve ark.⁵², IFA ve IHA yöntemlerini karşılaştırmak için 226 serum örneğini değerlendirmeye almışlar ve her iki yöntem arasında elde edilen antikor yönünden önemli bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir.

Collins ve ark.¹², *P. vivax* ile infekte 55 kişide IFA ile yaptıkları çalışmada, enfeksiyonu geçirenlerin tamamında antikor gösterilirken, IHA ile %50 oranında olumlu sonuç elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Spencer ve ark.³⁷, 351 örnekte ELİSA ve IFA'yı karşılaştırmışlar ve her iki serolojik yöntemle de benzer sonuçlar almışlardır.

Yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi uygulanması kolay ve ucuz olan IFA yöntemi serolojik tanı için tek başına kullanılabilir.

Choudhury ve ark.⁵, Hindistan'da sıtmanın endemik olduğu bölgede 242 donörden alınan kan örneklerinde IFA, ELİSA ve monoklonal antikor tekniklerini karşılaştırmışlar; ELİSA ile %19.3, IFA ile %12.3, monoklonal antikor tekniğiyle %0.35 oranında antikor saptamışlardır.

Sirivastava ve ark.³⁸, sıtmanın endemik olarak bulunduğu bölgeden akut sıtmalı hastalarda ve aynı bölgeden kan veren donörlerde IFA ve ELİSA yöntemleriyle antikor aramışlar, her iki yöntemle de %86 oranında antikor bulmuşlardır.

Çalışmamızda, kan veren 120 donörün hiç birinde olumlu titrede antikor elde edilmedi.

Sıtmanın endemik olduğu bölge halkından hasta olsun olmasın kan örnekleri alınarak özellikle homolog antijen kullanarak IFAT ile taramalar yapılmalıdır. Bu taramalarda özellikle yüksek titrelerde, örneğin 1/64 ve yukarısında olumlu sonuç alınan olguların tedaviye alınmasıyla sıtma eradikasyonuna katkı sağlanmış olur⁵¹.

Ayrıca, kan verme ile sıtma bulaşmasını önlemek için geçmişinde sıtma nöbeti olanlardan, kanında parazit bulunanlardan veya 1/256 ve daha yüksek titrede IFAT ile antikor saptananlardan kan alınmamalıdır⁴⁷.

Sonuç olarak;

1- Daha önce sıtma geçirmeyip, ilk defa sıtmaya yakalananlardan alınan serum örneklerinde IFA tekniğiyle yapılan incelemede %59.01 oranında antikor elde edilmesi, sıtmada akut dönemde de antikor geliştiğini gösterdi.

2- Daha önce sıtma geçirmeyen ve kalın damla incelemesi sonucu parazit bulunmayanlardan, yani sıtmasızlardan %2.76 oranında antikor elde edilmesi, bölgemizde bu oranda belirtisiz sıtma infeksiyonu taşıyıcısı olabileceğini gösterdi. Ancak, daha geniş hasta ve kontrol gruplarının değerlendirilmesi farklı sonuçlar verebilir. Bu nedenle, Çukurova gibi sıtmanın endemik olduğu yerlerde kalın damla ile negatif sonuç alınan olgularda IFA yönteminin de kullanılması yararlı olacaktır.

6.ÖZET

Yaşları 4 ile 85 arasında değişen 441 sıtmalı ve 211 sıtmasız toplam 652 serum örneğinde indirek floresan antikor tekniği (IFAT) ile homolog ve heterolog antijenler kullanılarak sıtmaya karşı oluşan IgG ve IgM antikorları arandı.

P.vivax antikorları yönünden IgG için 1/64, IgM için 1/16 ve üstündeki sulandırılmalar olumlu olarak değerlendirildi.

Kalın damla incelemesinde parazit bulunan 441 örneğin *P.vivax* homolog antijeni ile 305'inde (%69.16), *P.berghei* heterolog antijeni ile 19'unda (%4.30) olumlu sonuç alındı.

Kalın damla incelemesinde parazit bulunmayan 211 örneğin *P.vivax* homolog antijeni ile 13'ünde (%6.16) olumlu sonuç elde edildi. Bu grupta, *P.berghei* heterolog antijeni ile olumlu sonuç elde edilemedi.

Çalışmada, *P.vivax* homolog antijenin duyarlılığı %69.16, özgüllüğü %93.84, *P.berghei* heterolog antijenin duyarlılığı %4.30, özgüllüğü %1.00 olarak belirlendi. Bu nedenle, bölgemizdeki çalışmalarda *P.vivax* homolog antijeninin sıtma tanısı için kullanılması uygundur.

İlk defa sıtmaya yakalananlardan, akut dönemde kan alınanların %59.01'inde IFAT ile olumlu sonuç alındı. Bu durum, akut sıtma tanısında da yöntemin kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Kalın damla incelemesinde parazit bulunmayanlar içerisinde, daha önce sıtma geçirmeyenlerin %2.76'sında antikor elde edilmesi ise bölgemizdeki belirtisiz sıtmalıların varlığını gösterdi. Bu durumdakileri ortaya çıkarmak için daha geniş grupta incelemelerin yapılması faydalı olacaktır.

Sonuçta, bölgemizde sıtma tanısında kalın damla ile negatif sonuç alınan olgularda IFA tekniğinin de kullanılmasının yararlı olacağı kanısına varıldı.

**DEMONSTRATION OF ANTIBODIES AGAINST *PLASMODIUM VIVAX*
USING THE INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE (IFAT)
IN PATIENTS WITH MALARIA AND THOSE UNDER RISK
IN THE REGION OF ÇUKUROVA**

7.SUMMARY

The presence of IgG and IgM antibodies formed against malaria was investigated in a total of 652 serum samples from 441 malaria patients and 211 normal individuals using the indirect fluorescent antibody technique with both homologous and heterologous antigens.

P.vivax antibodies were evaluated as positive at a dilution of 1/64 for IgG, 1/16 for IgM and above both dilutions.

Out of 441 samples found to be positive in the thick smear, 305 (69.16%) were found to be positive with the homologous antigen. Only 19 (4.30%) were found to be positive with the *P.berghei* heterologous antigen.

Out of 211 samples found to be negative in the thick smear, significant antibody titers were detected in 13 (6.16%) using the *P.vivax* homologous antigen. In this group no significant titers were found with the *P.berghei* heterologous antigen.

The sensitivity of the homologous *P.vivax* antigen was found to be 69.16% and the specificity, 93.84%. The sensitivity of the heterologous *P.berghei* antigen was found to be 4.30% and the specificity, 1.00%.

A significant antibody titer was detected in blood taken during the acute phase in 59.01% of persons infected with *P.vivax* for the first time.

The fact, that out of persons who had not had clinical malaria and were found to be negative with the thick smear 2.76% gave an antibody response, indicates that there are inapparent cases of malaria in this area.

In conclusion, it may be suggested that for the diagnosis of malaria, the IFA technique should be used along with the thick smear.

8.KAYNAKLAR

- 1-Adana İl Sağlık Müdürlüğü, Sıtma Savaş Başkanlığı. İstatistik verileri. 1994.
- 2-Altıntaş K. Parazitozların Serolojik Tanısı. **T Parazitol Derg** 13(2):33-38, 1989.
- 3-Archibald CP, Mak JV, Mathias RG, Selvajothi S. Antibodies to *Plasmodium falciparum* in an indigenous population from a malaria endemic area of Malaysia. **Acta Trop Basel** 48(2):149-157, 1990.
- 4-Benzerroug EH, Demedts P, Wery M. Detection of antibodies to *Plasmodium vivax* by indirect immunofluorescence; influence of the geographic origin of antigens and serum samples. **Am J Trop Med Hyg** 35(2):255-258, 1986.
- 5-Choudhury N, Jolly JG, Mahajan RC, Dubey ML, Ganguly NK, Agnihotri SK. Donor Screening for malaria by antibody and antigen detection in endemic area. **Indian J Malariol** 28(3):179-182, 1991.
- 6-Collins WE, Jeffery GM, Skinner JC. Fluorescent antibody studies in human malaria, II. Development and persistence of antibodies to *Plasmodium falciparum*. **Am J Trop Med Hyg** 13:256-260, 1964.
- 7-Collins WE, Jeffery GM, Guinn E, Skinner JC. Fluorescent antibody studies in human malaria. IV. Cross-reactions between human and simian malaria. **Am J Trop Med Hyg** 15(1):11-15, 1966.
- 8-Collins WE, Skinner JC, Coifman RE. Fluorescent antibody studies in human malaria. V. Response of sera from Nigerians to five *Plasmodium* antigens. **Am J Trop Med Hyg** 16(5):568-571, 1967.
- 9-Collins WE, Skinner JC, Jeffery GM. Studies on the persistence of malarial antibody response. **Am J Epidemiol** 87(3):592-598, 1968.
- 10-Collins WE, Contacos PG, Skinner JC, Harrison AJ, Gell LS. Patterns of antibody and serum proteins in experimentally induced human malaria. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 65(1):43-58, 1971.
- 11-Collins WE, Skinner JC. The Indirect fluorescent antibody test for malaria. **Am J Trop Med Hyg** 21(5):690-695, 1972.

- 12-Collins WE, Lunde MN, Skinner JC. Development of antibodies to *Plasmodium vivax* as measured by two different serologic techniques. **Am J Trop Med Hyg** 24(3):412-416, 1975.
- 13-Çetin ET, Anđ Ö, Töreci K. **Tıbbi Parazitoloji**. İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Yayın no:3073, 3.Baskı, Sanal Matbaacılık. İstanbul, 1983, Syf:146-176.
- 14-Draper CC, Sırr SS. Serological investigations in retrospective diagnosis of malaria. **Brit Med J** 28:1575-1576, 1980.
- 15-Faich GA, Mason J. The prevalence and relationships of malaria, anemia and malnutrition in a Coastal area of El Salvador. **Am J Trop Med Hyg** 24(2):161-167, 1975.
- 16-Gonzales CL. An Enzyme-linked immünosorbent assay using detergent-soluble *Plasmodium vivax* antigen for seroepidemiologic surveys, **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 85(3):358-361, 1991.
- 17-Hoffman SL, Nussenzweig V, Sadoff JC, Nussenzweig RS. Progres toward malaria pre-erythrocytic vaccines. **Science** 252:520-521, 1991.
- 18-Hornstein JH, Miller MJ, Thiara S. The indirect immunofluorescence (IIF) test in detection of imported *Plasmodium vivax* malaria in the Sutter-Yuba Country area of California, USA, 1975-79. **Am J Trop Med Hyg** 32(6):1195-1202, 1983.
- 19-Jeffery GM, Warren MW, Collins WE, Lobel H. Application of the indirect fluorescent antibody method in a study of malaria endemicity in Matogrosso, Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 24(3):402-411, 1975.
- 20-Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter, **Lancet** 337(26):200-202, 1991.
- 21-Kuman HA. Sıtma-Malaria. Özcel MA (ed). **GAP ve Parazit Hastalıkları**. T.Parazitol. Derneği Yayını, No:11, E.Ü.Basımevi, İzmir, 1993, Syf:29-52.
- 22-Kuvin SF, Tobie JE, Evans CB, Coatney GR, Contacos PG. Fluorescent antibody studies on the course of antibody production and serum gamma globulin levels in normal volunteers infected with human and simian malaria. **Am J Trop Med Hyg** 11:429-436, 1962.
- 23-Kuvin SF, Tobie JE, Evans CB, Coatney GR, Contacos PG. Antibody production in human malaria as determined by the fluorescent antibody technique. **Science** 135:1130-1131, 1962.

24-Lari FA, Burney MI, Rab MA. Sero-epidemiological survey of malaria by immunofluorescence in Pakistan (District Gujranwala-Punjab). **J Pak Med Assoc** 41(9):216-219, 1991.

25-Lege OL, Onyemelukwe GC, Maiha BB, Udezue EO, Eckerbom S. The effect of short-term malaria chemoprophylaxis on the immune response of semi-immune adult volunteers. **East Afr Med J** 67(11):770-778, 1990.

26-Lunn JS, Chin W, Contacos PG, Coatney GR. Changes in antibody titers and serum protein fractions during the course of prolonged infections with *vivax* or with *falciparum* malaria. **Am J Trop Med Hyg** 15(1):3-10, 1966.

27-MacLeod CL, West R, Saloman WL, Heyneman D, Goldsmith RS. Double malaria infection in a six-week old infant. **Am J Trop Med Hyg** 31(5):893-896, 1982.

28-Manawadu BR, Voller A. Standardization of the indirect fluorescent antibody test for malaria. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 72(5):456-462, 1978.

29-Markell EK, Voge M, John DT. **Medical Parasitology**, 6 th edition. W.B.Saunders Company. Philadelphia, 1986, p:360-363.

30-Özcan K. Ankara'da sağlıklı kişilerde *Toxoplasma gondii* antikorlarının dolaylı floresan antikor tekniği ile gösterilmesi. Uzmanlık tezi, Hacettepe Üniversitesi. Ankara, 1979.

31-Özcan K. Tıbbi Parazitoloji Ders Notları, Adana, 1994.

32-Özcel MA. **İmmunofloresans ve Parazitolojide Uygulanması**. Ege Ü.Tıp Fak. Yayınları. No:108, E.Ü.Matbaası, İzmir, 1978, syf:119-123.

33-Özcel MA, Östan İ, Çakır N. Sıtmanın Laboratuvar Tanısı. **Sıtma Bilimi**. 1. Ulusal Parazitoloji Kongresi Kitabı. T.Parazitol.Derneği Yayını. No:1, E.Ü.Matbaası, İzmir, 1979, syf:91-115.

34-Özcel MA, Kuman HA, Bahar İH, Koyutürk A, Çakır N. Türkiye'de sıtma vak'alarının immünolojik yöntemlerle incelenmesi. **T Parazitol Derg** 2:49-65, 1981.

35-Rawlins SC, Chaillet P, Validum L, Ragoonansingh RN, Mangru S, Prabhakar P, Baboolal S, Gayle C. Evaluation of methods for the laboratory diagnosis of malaria in Guyana. **West Indian Med J** 42(3):111-114, 1993.

- 36-Roche J, Diego JA, Penin P, Santos M, Rey J. An epidemiological study of malaria in Bioha and Annabon Island. **Ann Trop Med Parasitol** 85(5):477-487, 1991.
- 37-Spencer HC, Colins WE, Skinner JC. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. II. Comparison with the malaria indirect fluorescent antibody test (IFA). **Am J Trop Med Hyg** 28(6):933-936, 1979.
- 38-Srivastava IK, Schmidt M, Grall M, Yerly S, Garcia AM, Bouvier M, Takacs B, Dobeli H, Perrin LH. Comparative evaluation of an ELISA based on recombinant polypeptides and IFA for serology of malaria. **J Trop Med Hyg** 94(3):189-194, 1991.
- 39-Sulzer AJ, Wilson M. The use of thick-smear antigen slides in the malaria indirect fluorescent antibody test. **J Parasitol** 53(5):1110-1111, 1967.
- 40-Sulzer AJ, Wilson M, Hall EC. Indirect fluorescent antibody tests for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. **Am J Trop Med Hyg** 18(2):199-205, 1969.
- 41-Sulzer A, Wilson M, Turner A, Kagan IG. A multi-species malaria antigen for use in the indirect fluorescent antibody test. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 67(1):55-58, 1973.
- 42-Thomas V, Dissanaiké AS. Malaria endemicity among Orang Asli (Malaysian aborigines) as determined by indirect fluorescent antibody tests. **Am J Trop Med Hyg** 26(4):602-606, 1977.
- 43-Tobie JE. Detection of malaria antibodies- Immunodiagnosis. **Am J Trop Med Hyg** 13:195-203, 1964.
- 44-Tobie JE, Abele DC, Hill GJ, Contacos PG, Evans CB. Fluorescent antibody studies on the immune response in sporozoite induced and blood induced *vivax* malaria and the relationship of antibody production to parasitemia. **Am J Trop Med Hyg** 15(5):676-683, 1966.
- 45-Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. **Science** 193:673-675, 1976.
- 46-Unat EK. Sıtma Parazitolojisinde Yenilikler. **T Parazitol Derg** 1:9-19, 1979.
- 47-Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. **Unat'ın Tıp Parazitolojisi**. 4. Baskı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, No:3641, İ.Ü. Basımevi, İstanbul, 1991, syf:623-664.

48-Voller A. The detection and measurement of malarial antibodies. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 65(1):111-125, 1971.

49-Voller A. Serodiagnosis of malaria. In Cohen S, Sadun E, (eds). **Immunology of parasitic infections**. Blackwell Scientific Publications, London, 1976, p:107-119.

50-Watts TE. Malaria in an urban and a rural area of Zambia. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 84(2):196-200, 1990.

51-Wilson M, Sulzer AJ, Runcik K. Malaria antibody patterns as determined by the IFA test in U.S. servicemen after chemotherapy. **Am J Trop Med Hyg** 19(3):401-404, 1970.


52-Wilson M, Sulzer AJ, Rogers WA, Fried JA, Mathews HM. Comparison of the indirect fluorescent antibody and indirect hemagglutination tests for malaria antibody. **Am J Trop Med Hyg** 20(1):6-9, 1971.

53-WHO, Technical Report Series. **The Biology of malaria parasites**. 743, Geneva, 1987, p:190-204.

54-Youssef ME, Rizk H. Malaria as a cause of prolonged fever among children in Mansoura fever hospital. **J Egypt Soc Parasitol** 23(2):417-421, 1993.

9.ÖZGEÇMİŞİM

1964 yılında Ceyhan'da doğdum. İlkokul, Ortaokul ve Liseyi Ceyhan'da bitirdim. 1983 yılında Ç.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne başlayıp 1988 yılında mezun oldum. Aynı yıl, Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı Parazitoloji Bilim Dalının açtığı Yüksek lisans sınavını kazandım ve Parazitoloji eğitimine başladım. 1991 yılında Parazitoloji Bilim Uzmanı oldum ve aynı yıl Parazitoloji Bilim Dalında Doktora başladım. 1990 yılından beri Ç.Ü.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalında Uzman kadrosunda çalışmaktayım.



Bilim Uzm. İsmail Soner KOLTAŞ
Ç.Ü.SBE Parazitoloji ABD.