

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA BÖLGESİNDE GÖRÜLEN  
SITMA OLGULARININ NESTED PCR  
YÖNTEMİ İLE TÜR TAYİNİ VE  
PCR-RFLP İLE *PLASMODIUM VIVAX*  
ALT TÜR TAYİNİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Nebiye YENTÜR DONİ**

**2012**

## ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

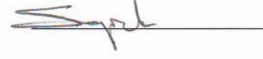


Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adnan SEYREK



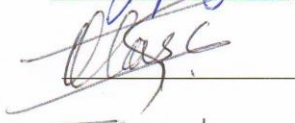
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ



Prof. Dr. Sami TAŞCI



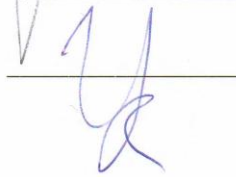
Prof. Dr. Adnan SEYREK



Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK



Doç. Dr. Yasemin BULUT



# *Canım Annem ve Babama*

## TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı doktora eğitimim boyunca, birinci sınıf öğrencisine kalem tutmayı öğreten bir ilkokul öğretmeni sabırla moleküler laboratuvar çalışmalarımın ilk aşamasından (pipet kullanımı) son aşamasına kadar her an yanımda olan, eğitimim süresince bilgi, tecrübe ve deneyimlerini esirgemeyen, bilime her yönüyle ışık tutan ve beni bu ışıklarıyla aydınlatan, değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Adnan SEYREK ve Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e teşekkür etmeyi borç bilirim.

Doktora eğitimim süresince yetişmemde büyük emeği geçen, tecrübe ve deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocalarım Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN, Doç. Dr. Yasemin BULUT ve Doç. Dr. Fulya İLHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince, tezimin her aşamasında bilgi, deneyimlerini benimle paylaşan, istatistik çalışmalarında ve ihtiyaç duyduğum her konuda ailemden bir birey gibi yanımda olan, önüme çıkan bütün engelleri ortadan kaldıran, değerli hocam Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeynep ŞİMŞEK'e teşekkür etmeyi borç bilirim.

Harran Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda doktora tezi laboratuvar çalışmamın yapılmasına olanak sağlaması nedeniyle değerli hocam Harran Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sami TAŞÇI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince yazışmalarımı yaz kış demeden takip eden ve yüksek sabır gösteren canım kardeşim Sibel YENTÜR'e teşekkür etmeyi borç bilirim.

TF.11.76 numaralı doktora tez çalışmamı desteklediği için Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez saha çalışmalarında yanımda olan sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Reşat DİKME'ye, Şanlıurfa Sıtma Savaş Birimi Sorumlusu Ömer Faruk KARAKEÇİLİ ve ekibine yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez hazırlama sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü değerli memuru Veysi ALTINAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim ve yaşamım boyunca her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen, yoğun çalışmamı hoşgörüyüyle karşılayan, sevgili eşim Muhittin DONİ, canım kardeşim Selda, canım oğullarım Kubilay ve Anıl'a teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

**Öğr. Gör. Nebiye YENTÜR DONİ**

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLO LİSTESİ .....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT .....	3
3. GİRİŞ .....	5
3. 1. Sıtma tarihi .....	5
3. 2. Epidemiyoloji.....	5
3. 2. 1. Dünyada sıtmanın dağılımı .....	7
3. 2. 2. Türkiye’de sıtma dağılımı .....	9
3. 2. 3. Güneydoğu Anadolu Projesi ve sıtma.....	11
3. 2. 4. Şanlıurfa’da sıtma epidemiyolojisi .....	14
3. 3. Evrim.....	15
3. 3. 1. İnsandaki evrim.....	15
3. 3. 2. Anofeldeki evrim .....	19
3. 4. Morfoloji .....	20
3. 4. 1. <i>Plasmodium vivax</i> .....	20
3. 4. 2. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
3. 4. 3. <i>Plasmodium malaria</i> .....	22
3. 4. 4. <i>Plasmodium ovale</i> .....	22
3. 4. 5. <i>Plasmodium knowlesi</i> .....	23
3. 5. İmmünoloji.....	25
3. 6. Klinik .....	25
3. 7. Tedavi.....	28
3. 7. 1. Destek tedavi.....	28
3. 7. 2. İlaç tedavisi .....	28
3. 7. 3. Gebelerde antimalaria ilaçları .....	29

3. 8. Laboratuvar tanı .....	29
3. 8. 1. Mikroskopi .....	29
3. 8. 1. 1. Örnek alınması .....	30
3. 8. 1. 2. Örnek tipi .....	30
3. 8. 1. 3. En uygun örnek alma zamanı .....	31
3. 8. 1. 4. Yöntem .....	31
3. 8. 1. 5. Kan yaymalarının hazırlanması .....	31
3. 8. 1. 6. Kalın damla .....	32
3. 8. 1. 7. İnce yayma .....	32
3. 8. 1. 8. Kan yaymalarının Giemsa ile boyanması .....	33
3. 8. 1. 9. Kalın damlanın incelenmesi .....	33
3. 8. 1. 10. İnce yaymanın incelenmesi .....	34
3. 8. 1. 11. Kan yaymalarında sıtma tanısı ve tür tayini .....	36
3. 8. 1. 12. Parazit sayısının hesaplanması .....	38
3. 8. 1. 13. Kalın damlada parazit sayısının hesaplanması .....	39
3. 8. 1. 14. İnce yaymada parazit sayısının hesaplanması .....	39
3. 8. 2. Nükleik asitleri boyayan floresan boyalar ile tanı .....	39
3. 8. 2. 1. Kawamoto tekniği .....	39
3. 8. 2. 2. Niceliksel sarımsı katman sistemi (Quantitative Buffy Coat) .....	40
3. 8. 3. Kültür yöntemleri .....	40
3. 8. 3. 1. Ekstraeritrositer evre .....	41
3. 8. 3. 2. Eritrositer evre .....	41
3. 8. 3. 3. Temel kültür ortamı .....	42
3. 8. 3. 4. Kültür sisteminde eritrositlerin yeri .....	42
3. 8. 3. 5. Kültür sistemi .....	43
3. 8. 4. Antikor saptayan yöntemler .....	43
3. 8. 4. 1. İndirek floresan antikor testi .....	44
3. 8. 4. 2. ELISA testi .....	45
3. 8. 5. Antijen saptayan yöntemler .....	45
3. 8. 6. Moleküler tanı yöntemleri .....	47
3. 8. 6. 1. Polimeraz zincir reaksiyonu .....	47
3. 8. 6. 2. Nested PCR .....	51

3. 8. 6. 3. PCR ve PCR-RFLP .....	52
3. 8. 6. 4. Restriksiyon endonükleazlar .....	54
3. 8. 6. 5. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı yerler .....	55
3. 8. 6. 6. PVCS gen bölgesinin kullanılmasıyla <i>Plasmodium vivax</i> genotiplenmesi .....	56
3. 9. Korunma.....	56
3. 10. Amaç .....	58
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>61</b>
4. 1. Çalışma izni ve proje fonu .....	61
4. 2. Örneklerin toplanması.....	61
4. 3. Kalın damla ve ince yayma kan preparasyonu.....	62
4. 3. 1. Gereçler .....	62
4. 3. 2. Reaktifler.....	62
4. 3. 3. Kalın damla kan preparasyonu.....	62
4. 3. 4. İnce yayma kan preparasyonu .....	63
4. 3. 5. Parazitolojik değerlendirme .....	64
4. 4. Kan emdirilmiş filtre kağıdından DNA ekstraksiyonu. ....	64
4. 5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hazırlık aşaması.....	67
4. 5. 1. Kullanılan araçlar .....	67
4. 5. 2. Kullanılan reaktifler ve kimyasallar.....	68
4. 5. 3. Kullanılan primerler .....	69
4. 5. 4. Tamponların hazırlanması.....	70
4. 5. 4. 1. Tris-Edta buffer .....	70
4. 5. 4. 2. Tris-boric acid-edta buffer .....	70
4. 6. PCR amplifikasyonu .....	70
4. 6. 1. Nested 1 PCR amplifikasyonu .....	72
4. 6. 2. Nested 2 PCR amplifikasyonu .....	73
4. 6. 3. <i>Plasmodium</i> genus spesifik nested PCR .....	74
4. 6. 4. <i>Plasmodium</i> türe spesifik nested PCR .....	75
4. 6. 5. PCR ürünlerinin analizi.....	75
4. 6. 5. 1. Elektroforez.....	75
4. 6. 5. 2. PCR ürünlerinin etidium bromürde boyanması .....	76



4. 6. 5. 3. PCR ürünlerinin ultraviyole görüntülenmesi .....	76
4. 7. PVCS gen bölgesinin kullanılmasıyla <i>Plasmodium vivax</i> genotiplenmesi.....	76
4. 7. 1. PVCS gen bölgesi nested 1 PCR amplifikasyonu.....	77
4. 7. 1. 1. Nested 1 amplifikasyonu reaksiyonları ve döngü sayısı .....	77
4. 7. 2. PVCS gen bölgesi nested 2 PCR amplifikasyon reaksiyonu .....	77
4. 7. 2. 1. Nested PCR 2 amplifikasyon reaksiyonu basamakları ve döngü sayısı.....	78
4. 7. 3. PVCS gen bölgesi amplifikasyon ürünü analizi .....	79
4. 7. 3. 1. Elektroforez.....	79
4. 7. 3. 2. PCR ürünlerinin etidium bromürde boyanması .....	79
4. 7. 3. 3. PCR ürünlerinin ultraviyole görüntülenmesi .....	79
4. 8. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) .....	79
4. 8. 1. PCR-RFLP sonucu elde edilen ürünlerin analizi .....	80
4. 9. İstatistiksel Analizler.....	80
<b>5. BULGULAR .....</b>	<b>81</b>
5. 1. Örnekler.....	81
5. 2. Epidemiyolojik veriler .....	81
5. 3. Mikroskopi bulguları.....	82
5. 4. Nested PCR analizi bulguları .....	85
5. 4. 1. <i>Plasmodium</i> genus spesifik primerlerle yapılan nested PCR analizi bulguları .....	85
5. 4. 2. <i>Plasmodium</i> türe spesifik nested PCR analizi bulguları .....	85
5. 4. 3. <i>P. vivax</i> Pvcs gen bölgesine spesifik nested PCR analizi bulguları.....	86
5. 5. İstatistiksel bulgular .....	89
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>90</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>109</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>117</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>118</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Türkiye’de sıtma olgularının yıllara dağılımı .....	12
<b>Tablo 2.</b> Boyalı kan yaymalarında <i>Plasmodium</i> türlerinin karşılaştırılması .....	24
<b>Tablo 3.</b> İnce yayma ve kalın damla preparatlarının sıtma açısından karşılaştırılması .....	35
<b>Tablo 4.</b> Her bir hasta için PCR karışımının hazırlanması .....	73
<b>Tablo 5.</b> Mikroskopik bakıya göre sıtma olgularının parazitemi düzeyleri .....	82
<b>Tablo 6.</b> Mikroskopik bakı ve PCR analiz sonuçları.....	85
<b>Tablo 7.</b> Sıtma tanısında ışık mikroskopisi ile PCR’nin karşılaştırılması .....	97
<b>Tablo 8.</b> Farklı hedef bölgelerinin karşılaştırılması .....	102

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Dünya sıtma haritası 2003 .....	8
Şekil 2.	Türkiye sıtma bölgeleri haritası.....	10
Şekil 3.	Türkiye’de sıtma olgularının yıllara dağılımı (1925 ve 2010) .....	11
Şekil 4.	Türkiye’ de sıtma endemik bölgeler .....	13
Şekil 5.	Şanlıurfa’da sıtma olgularının aylara ve yıllara göre dağılımı	15
Şekil 6.	Şanlıurfa sıtma olgularının mevsimlere ve yıllara dağılımı (2001-2010).....	16
Şekil 7.	Şanlıurfa’ da sıtma olgularının ilçelere göre dağılımı (2001-2011).....	16
Şekil 8.	Şanlıurfa ve Türkiye’de sıtma olgularının yıllara dağılımı (2001-2010).....	17
Şekil 9.	<i>Plasmodium</i> ’ların insan ve dişi anofel vücudundaki yaşam döngüsü.....	19
Şekil 10.	Eritrosit içinde sıtma parazitlerinin parçaları .....	36
Şekil 11.	Parazit morfolojisi üzerinde pH’ın etkisi.....	37
Şekil 12.	PCR ile amplifikasyon.....	49
Şekil 13.	PCR’nin tamamlanmış amplifikasyon siklusu .....	50
Şekil 14.	Sırasıyla nested PCR ve semi-nested PCR amplifikasyonu .....	52
Şekil 15.	A: Agaroz jel gel (2%) türe özgü <i>Plasmodium</i> DNA’sının PCR ile analiz edilmesi. ....	53
Şekil 16.	Tanısal algoritma .....	57
Şekil 17.	<i>Plasmodium</i> ssRNA genine ait farklı pligonükleotid çiftlerinin dizileri ve yaklaşık pozisyonlarının şematize edilmesi. ....	71
Şekil 18.	Pvcs gen bölgesinin şematize edilmesi.....	76
Şekil 19.	A-B. Kalın damla preparatlarda <i>P. vivax</i> formları.....	83
Şekil 20.	A-B. İnce yayma preparatlarda <i>P. vivax</i> formları.....	84
Şekil 21.	%2’lik agaroz jelde <i>Plasmodium</i> DNA’sının genus spesifik nested PCR analizi .....	86
Şekil 22.	A-B. %2’lik agaroz jelde <i>Plasmodium</i> DNA’sının türe spesifik primerlerle nested PCR analizi.....	87
Şekil 23.	A. Pvcs gen bölgesinin şematik olarak gösterilmesi B-C. %1.8’lik agaroz jelde Pvcs gen bölgesi bazlı <i>P. vivax</i> izolatlarının PCR-RFLP ile tiplendirilmesi .....	88

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>Ag</b>	Antijen
<b>Ak</b>	Antikor
<b>Ark.</b>	Arkadaşları
<b>bp</b>	Baz pair
<b>CSP</b>	Circumsporozoite protein
<b>DSÖ</b>	Dünya sağlık örgütü
<b>DDT</b>	Dikloro difenol trikloroethan
<b>DIC</b>	Yaygın damar içi pıhtılaşması)
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoxyribonucleotide triphosphate
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immuno sorbent assay
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>G6PDH</b>	Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
<b>GAP</b>	Güneydoğu Anadolu Projesi
<b>HRP-II</b>	Histidine Rich Protein-II ( Histidinden Zengin Protein-II)
<b>HTT</b>	Hızlı tanı testi
<b>İHA</b>	İndirekt hemaglutinasyon antikor testi
<b>İFA</b>	İndirek floresan antikor testleri
<b>KCl</b>	Potasyum klor
<b>MEM</b>	Minimal essential medium
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum klor
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MSP-1</b>	Merozoite surface protein-1

<b>MSP-2</b>	Merozoite surface protein-2
<b>MSP-3</b>	Merozoite surface protein-3
<b>N<sub>2</sub></b>	Azot
<b>NCCLS</b>	National committee for clinical laboratory standards
<b>Nested PCR</b>	İç içe polimeraz zincir reaksiyonu
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NPD</b>	Negatif prediktif değeri
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PEGE</b>	Pulsed field gel electrophoresis
<b>pH</b>	Asidite
<b>pLDH</b>	<i>Plasmodium</i> Laktat Dehidrogenaz
<b>PPD</b>	Pozitif prediktif değeri
<b>Pvcs</b>	<i>Plasmodium vivax</i> Circumsporozoite surface protein geni
<b>QBC</b>	Quantitative buffy coat
<b>RAPD</b>	Random amplified polymorphic DNA
<b>RDT</b>	Rapid diagnostic test
<b>RFLP</b>	Restriction fragment length polymorphism
<b>RNA</b>	Ribo Nükleik Asit
<b>rRNA</b>	Ribozomal RNA
<b>SNP</b>	Single nucleotid polymorphism
<b>TBE</b>	Tris-boric acid-edta buffer
<b>TE</b>	Tris edta buffer
<b>Tris-HCl</b>	Tris hidroklorik asit
<b>µL</b>	Mikrolitre

## 1.ÖZET

### **Şanlıurfa Bölgesinde Görülen Sıtma Olgularının Nested PCR Yöntemi ile**

### **Tür Tayini ve PCR-RFLP ile *Plasmodium vivax* Alt Tür Tayini**

Sıtma, tropikal ve subtropikal ülkelerde her yıl bir milyon kişinin ölümüne neden olan büyük bir halk sağlığı sorunudur. *Plasmodium vivax*, Türkiye’de ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde en sık görülen *Plasmodium* türüdür. Parazit suşlarının lokal ya da global epidemiyolojisini anlamak için parazit farklılıklarını ve alt türlerini tanımlamak bir zorunluluktur.

Bu çalışmada, sıtma tanısında, nested PCR’nin geçerliğinin ve yerinin belirlenmesi, nested PCR ile sıtma tespiti, *Plasmodium* türlerinin ve PCR-RFLP ile *P. vivax* alt türlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Metodolojik tipteki bu epidemiyolojik araştırma, Şanlıurfa’nın sıtmanın endemik olarak görüldüğü ilçelerinde gerçekleştirilmiştir. Tarım işçisi olarak çalışan sıtma şüpheli 153 bireyden parmak ucundan kan alınmıştır. İnce yayma ve kalın damla preparatlar , Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskopta incelenmiştir. Filtre kağıtlarına emdirilen kanlardan DNA ekstrakte edilmiştir. *Plasmodium* tespiti ve *Plasmodium* tür tayini için Snounou ve ark. nın geliştirdiği 18S rRNA gen bölgesi hedeflenen oligonükleotidler kullanılarak nested PCR yapılmıştır. *Plasmodium vivax*’ın genotiplemesinde Imwong ve arkadaşlarının tanımladığı circumsporozoit protein gen bölgesine ait oligonükleotidler kullanılarak nested PCR yapılmıştır. *P. vivax* circumsporozoit proteininin iki önemli varyantını (VK210 ve VK247) ayırt etmek için *AluI* ve *Bst NI* restriksiyon enzimleri kullanılarak PCR-RFLP yapılmıştır.

Amplifiye edilen PCR DNA ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezde yürütülmüş, etidyum bromürde 30 dakika boyandıktan sonra ultraviyole transluminatör ile görüntülenmiştir.

Mikroskopik tanıya göre, çalışmaya katılan 153 bireyin 11'inde (%7.2), genus spesifik primerlerin kullanıldığı nested PCR'ye göre ise 15'inde (%9.8) sıtma saptanmıştır. *Plasmodium* türe spesifik primerlerin kullanıldığı nested PCR'ye göre 15 *Plasmodium*'un 14'ü *P.vivax* olarak tanımlanmıştır. Pvcs gen bölgesini hedefleyen primerlerin kullanıldığı nested PCR sonrası yapılan PCR-RFLP'ye göre ise 14 *P. vivax*'ın 2'sinin (%14.3) VK210, 12'sinin ise (%85.7) VK247 olduğu görülmüştür.

Nested PCR'nin mikroskopik tanıya göre duyarlılığı %100, özgüllüğü %97.2, pozitif prediktif değeri %73.3 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmanın, sıtmanın doğru ve hızlı tanısında, düşük parazitemili *P. vivax* sıtma olgularının tanısında, miks ve asemptomatik enfeksiyonların saptanmasında, CSP bazlı *P. vivax* aşı çalışmalarında, ilaç direnci ve in vivo ilaç etkinliği çalışmalarında, gerekli epidemiyolojik verilerin sağlanmasında ışık tutacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Sıtma, *Plasmodium vivax*, circumsporozoit, VK210, VK247

## 2. ABSTRACT

### **Determination the Species of *Plasmodium* in malaria cases seen in Şanlıurfa region by Nested PCR and Determination the Sub-species of *Plasmodium vivax* by PCR-RFLP**

Malaria imposes a huge public health burden in tropical and subtropical countries with one million deaths each year. *Plasmodium vivax* is the most prevalent of the *Plasmodium* species in Southeastern Anatolia Region in Turkey. It is necessity to determine the varieties and subspecies of parasites in order to understand the global and local epidemiology of parasite strains.

In this study, it was aimed to determine the validity and location of the nested PCR for malaria diagnosis. It was also aimed to detect the *Plasmodium*, to determine the species of *Plasmodium* by nested PCR and to identify the variants of *P.vivax* by PCR-RFLP.

This methodological type of epidemiological study was carried out in malaria endemic towns of Şanlıurfa province. Fingerprick blood samples were collected from 153 malaria suspected participants working as farmworkers. Giemsa-stained thick and thin smears were examined by microscopic examination for malaria diagnosis. *Plasmodium* DNA samples were extracted from blood spotted filter-papers. The extracted DNA was used as template to amplify the 18S *ssrRNA* gene of *Plasmodium* with specific primers by nested PCR described by Snounou et al. The amplified PCR products were digested with restriction enzymes *Alu I* and *Bst NI* by PCR-RFLP to distinguish between two important variants of *P.vivax*, VK210 and VK247 (Imwong et al.). The DNA fragments obtained following nested PCR were analysed by electrophoresis in 2% agarose



gels and the DNA was visualised on an ultraviolet transilluminator following ethidium bromide staining for 30 minutes.

11 of 153 specimens (7.2%) were detected as *Plasmodium* by microscopy. 15 of 153 (9.8%) participants were detected as *Plasmodium* by using genus specific primers by nested PCR. 14 of 15 *Plasmodium* specimens were identified as *P. vivax* by using species-specific primers. The primers targeted circumsporozoite protein gene of *P.vivax* amplified by nested PCR. According to the PCR-RFLP analysis, 2 of 14 *P. vivax* specimens (14.3%) were VK210 and 12 of them (85.7%) were VK247.

Compared to microscopy, the sensitivity, specificity and positive predictive values of nested PCR were found 100%, 97.2%, 73.3%, respectively.

It is considered that, this study may be useful for rapid and accurate diagnosis of malaria, the diagnosis of *P. vivax* malaria cases with low parasitemia, the detection of the mixed and asymptomatic infections, the CSP-based vaccine trials of *P. vivax*, discriminating re-infection from relapse and recrudescence, the trials of drug resistance, in vivo drug efficacy and epidemiologic.

**Key words:** Malaria, *Plasmodium vivax*, circumsporozoite, VK210, VK247

### 3. GİRİŞ

#### 3. 1. Sıtma tarihi

Sıtma, insanlık tarihinin en eski zamanlarından beri bilinmektedir. Sıtmanın; Hitit, Mezopotamya ve Grek uygarlığını çökerten en önemli etmen olduğu kabul edilir. Hipokrat, ateş özelliklerini tarif ederek üç günde bir gelen hummanın öldürücü nitelikte olduğunu yazmıştır (1, 2). Sıtma etkeni olan *Plasmodium*'ları Laveran ilk olarak tarif etmiştir. İtalyan Marchiava ve Celli *Plasmodium* adını ilk kullanan şahıslardır. Dr. Romanowsky, kan boyama için kendi adıyla anılan yöntemi bulmuş ve *Plasmodium* türleri bu boya ile daha iyi ayırt edilmeye başlanmıştır. Sıtmanın sivrisineklerle bulaştığı Dikong tarafından ortaya atılmıştır. 1920'li yıllardan sonra kinin sıtma tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (1).

Ülkemizde ilk ele alınan büyük sağlık problemi sıtmadır. Şubat 1925'de Ankara'da, Mayıs'da Adana'da ve Temmuz'da da Aydın'da, İstanbul Bakteriyolojihanesinde yetiştirilen elemanlarla sıtma savaşı çalışmaları başlamıştır. 26 Mayıs 1926'da "Etibbanın sıtma enstitülerinde staj mecburiyeti hakkında kanun" ve 13 Mayıs 1926'da "Sıtma Mücadelesi Kanunu" yayınlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve UNICEF ile yapılan işbirliği ile 1957 yılından itibaren, ülkemizden sıtmanın eradikasyonu çalışmalarına başlanmıştır (1).

#### 3. 2. Epidemiyoloji

Sıtma, 64. kuzey ve 32. güney enlemleri arasında, anofellerin üreyebildiği her bölgede görülebilir. Herhangi bir bölgede sıtmanın yerleşebilmesi için, o bölgede sadece sıtmalı kişilerin ve anofelin bulunması yetmez, o bölgedeki sıcaklığın yılın en azından belli kısmında 15<sup>0</sup>C'nin üzerinde seyretmesi gerekir.

Çünkü, parazit, bu sıcaklığın altında anofelin vücudundaki evrimini tamamlayamaz (3). Deniz seviyesinden 2600–2800 metreden daha yüksek olan yerlerde bulaş görülmez. Tropikal bölgelerde sıtmanın aylara ve mevsimlere dağılımı eşit şekilde olur. Buna karşılık subtropikal bölgelerde bulaş sadece yaz aylarında gerçekleşir. Soğuk mevsimlerde hem parazit sporogoni evresini tamamlayamaz hem de sivrisinek kış uykusuna yatar. Bunun sonucu olarak olgu sayısı yaz aylarında artar, kış aylarında ise azalır (1).

Dünyada ve ülkemizde en sık görülen sıtma etkeni *P.vivax* iken *P. falciparum*, en sık mortalite ve morbiditeye sebep olan türdür. Her ne kadar Türkiye’de görülen sıtma türü, *P. vivax* türü olup, ölümcüllük ölçüleri açısından *P. falciparum* görülen ülkeler kadar ciddi değil ise de, sanıldığı gibi, hiç ölüme neden olmuyor demek de değildir. Diğer bir anlatımla, ölüm ölçüsü açısından da, önemsiz değildir. Sıtmaya bağlı ölü doğum, düşük ve anne ölümlerinin sayısının bilinmemesi, sanki sıtmadan ölüm olmuyor görüntüsü yaratmaktadır.

Çeşitli omurgalıları enfekte eden yaklaşık 156 *Plasmodium* türü tanımlanmıştır. İnsanlarda hastalık yapan beş *Plasmodium* türü mevcuttur: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malaria*, *Plasmodium knowlesi* (4). Beş sıtma türü için insan hem ara konak hem de rezervuar konaktır. Hem son konak hem de vektörü ise dişi *Anopheles* sivrisinekleridir.

*Plasmodium* türleri, insanlara dişi anofel kan emerken bulaştığı gibi kan ve doku nakli, konjenital ve kontamine enjektörlerin kullanılması ile de bulaşabilir. Gebelik esnasında sıtma nöbeti geçiren kadınların yaklaşık %1’nin bebeklerinde konjenital sıtma görülmektedir (3, 5). Bebeklerde sıtma daha ağır seyretmektedir.

Bebeklerde sıtma görülmesi, son bir yılda yerli bulaşın olduğuna kesin kanıt teşkil etmesi açısından önemlidir. Bireyler arasındaki farklılık açısından bakıldığında, immun sistemi zayıf olan kişiler, Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği ve Akdeniz anemisi olanlar sıtmayı daha ağır geçirmektedirler (1, 5).

### **3. 2. 1. Dünyada sıtmanın dağılımı**

Sıtmanın Dünya ülkelerinde yayılması bazı özelliklere göre değişmektedir.

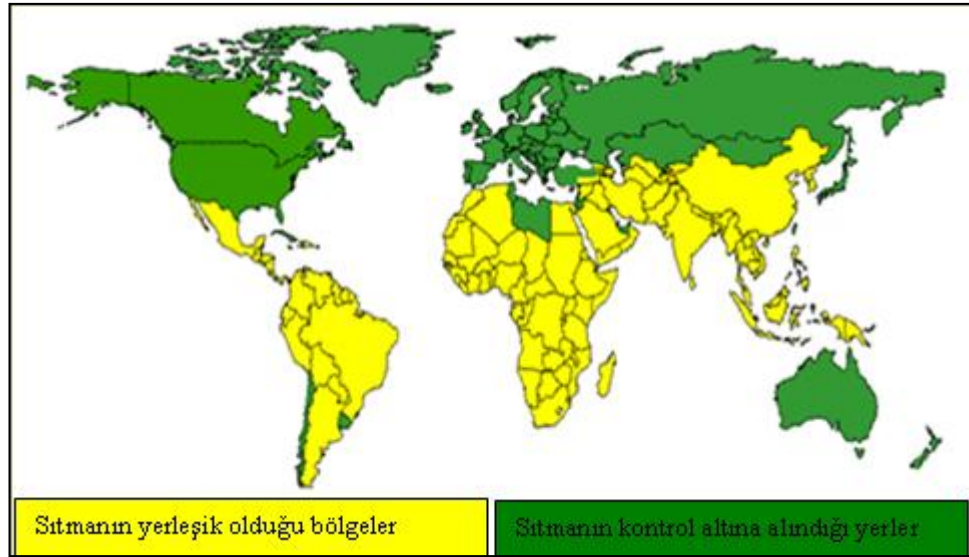
1. Sıtmalı insanların bir ülke veya bölgede taşıyıcı ve hastalığın kaynağı olarak bulunmaları,
2. İnsanların, o bölge veya ülkede sıtma çeşidine göre duyarlı olmaları,
3. İnsandan insana hastalığı bulaştıran Anofel cinsi sivrisineklerin bulunması
4. İklim koşullarının, sıtma parazitlerinin Anofel cinsi sivrisineklerde sporogonik evrimlerini tamamlamaya uygun olması
5. Kişilerin yaşam koşullarının ve eğitim düzeylerinin sıtmanın bulaşmasına uygun olması

Bu epidemiyolojik koşulların hepsi bir arada bulunduğu zaman o bölge veya ülkede sıtmanın yaygın olarak görülebileceği bildirilmektedir (6).

Dünyada, Türkiye'nin de içinde yer aldığı, 106 ülke sıtma açısından endemik bölge olarak bilinmektedir. 2010 yılında 3.3 milyar insanın dünyada sıtma riski altında kaldığı tahmin edilmektedir. Ayrıca, dünyada 216 milyon sıtma olgusunun olduğu ve sıtmanın neden olduğu 655000 ölümün %91'inin Afrika'da görüldüğü tespit edilmiştir. 2000-2010 yılları arasında sıtma insidansının %17 azaldığı tahmin edilmektedir. En fazla insidans düşüş oranları Avrupa'da %99.5, Amerika'da %60, Batı Pasifik Ülkeleri'nde %38 olarak görülmüştür. Dünya

çapında sıtma mortalite oranı 2000 yılından itibaren %25'ten daha fazla oranda düşüş gösterirken, bu oran DSÖ Afrika bölgesinde ise %33, Batı Pasifik bölgelerinde %42, Amerika'da %55 ve Avrupa'da %99 olarak saptanmıştır. Afrika Bölgesi'nde, sıtma nedeniyle dakikada bir çocuğun hayatını kaybettiği görülmektedir. Sıtma, çocuk ölümlerinin yaklaşık %22'sinden sorumludur. Dünyada sıtma ölümlerinin yaklaşık %86'sı 5 yaş altı çocuklarda görülmüştür (7). Dünyada sıtma endemik ülkeler Şekil 1'de görülmektedir.

**Şekil 1.** Dünya sıtma haritası 2003 (8)



- Sıtma, düşük gelirli ülkelerde, solunum enfeksiyonları, HIV/AIDS, diyareler ve tüberkülozdan sonra gelen beşinci ölüm nedenidir.
- Afrika'da ise HIV/AIDS'den sonra ikinci ölüm nedenidir (7).

Küresel Sıtma Eylem Planı hedefleri ile tutarlı olarak, 2009 itibariyle, üç ülke Ermenistan, Mısır ve Türkmenistan eliminasyon aşamasındadır. 3 yıldır vakanın olmadığı korunma programından tekrar yerleşme aşamasına geçilmiştir. Altı ülke, 2009 yılında ülke çapında pre-eliminasyon aşamasından

eliminasyon aşamasına geçmişlerdir (Azerbaycan, Gürcistan, Kırgızistan, Tacikistan, Türkiye ve Özbekistan; tümü Avrupa Bölgesi) (9).

### 3. 2. 2. Türkiye’de sıtma dağılımı

Türkiye’de sıtma etkeni *Plasmodium vivax*’dır. Yurdumuzda sıtma vektörlüğü yönünden 10 *Anopheles* tanımlanmıştır: *Anopheles algeriensis*, *Anopheles claviger*, *Anopheles hyrcanus*, *Anopheles macilupennis*, *Anopheles marteri*, *Anopheles plumbeus*, *Anopheles pulcherimmus*, *Anopheles sacharovi*, *Anopheles subalpino*, *Anopheles superpictus*. Bunlar arasında, en sık rastlanan *Anopheles sacharovi*’dir. *Anopheles sacharovi*’den sonra ise sık görülenler, *Anopheles superpictus*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles subalpinus*’dur (10, 11). Sıtma kontrol çalışmalarının daha etkili bir şekilde yapılmasına olanak sağlamak için, ülkemizin sıtma epidemiyolojik haritası çıkarılmış ve sıtma olgularının görüldüğü bölgeler dört bölgeye ayrılmıştır (Şekil 2).

**STRATA I:** Anamur Burnu’ndan Van Gölü’nün kuzeyine çekilen hattın güneyinde kalan bölgeden oluşur. Bu bölge kendi içinde Strata IA ve Strata IB olarak iki alt bölgeye ayrılır. Strata IA, Mersin, Adana ve Hatay illerini kapsar. Strata IB ise diğer Güneydoğu Anadolu illerinden oluşmakta olup yaklaşık 19 ili kapsamaktadır. Strata I, sürekli yerli bulaşın olduğu ve sıtmanın bölge boyutunda endemik olarak görüldüğü yer olarak tanımlanabilir. Bu bölgenin A ve B olarak ikiye ayrılmasının en önemli nedeni ise bu iki bölge arasında göçer işçi hareketine bağlı olarak, ritmik bir şekilde birbirini izleyen dönemler halinde, göreceli bir olgu yoğunluğu değişmesi görülür. Yani bir dönem Çukurova’daki olgu sayısı daha fazla iken ertesi dönem Güneydoğu Bölgesi’nde daha fazladır (12).

**STRATA II:** Genellikle, Akdeniz'in Anamur Burnu'nun batısında kalan Ege Bölgesi ile Marmara ve Trakya illerinden oluşur. Bu bölgede, yerleşim birimi bazında ve zaman zaman olgular görülmez hale gelir. Bu bölge sıtma açısından sık sık epidemiler görülen bir bölgedir (12).

**STRATA III:** Genellikle İç Anadolu illerinden oluşur. Bu bölgede, bölge ve il boyutunda epidemiler görülmez. Ancak insanların başka bölgelerde enfekte olması ve buraya paraziti getirmesi halinde yer yer yerli bulaş oluşur. Bölge ve il boyutunda olmasa bile yerleşim birimi boyutunda lokal epidemiler görülebilir (12).

**Şekil 2.** Türkiye sıtma bölgeleri haritası (11)

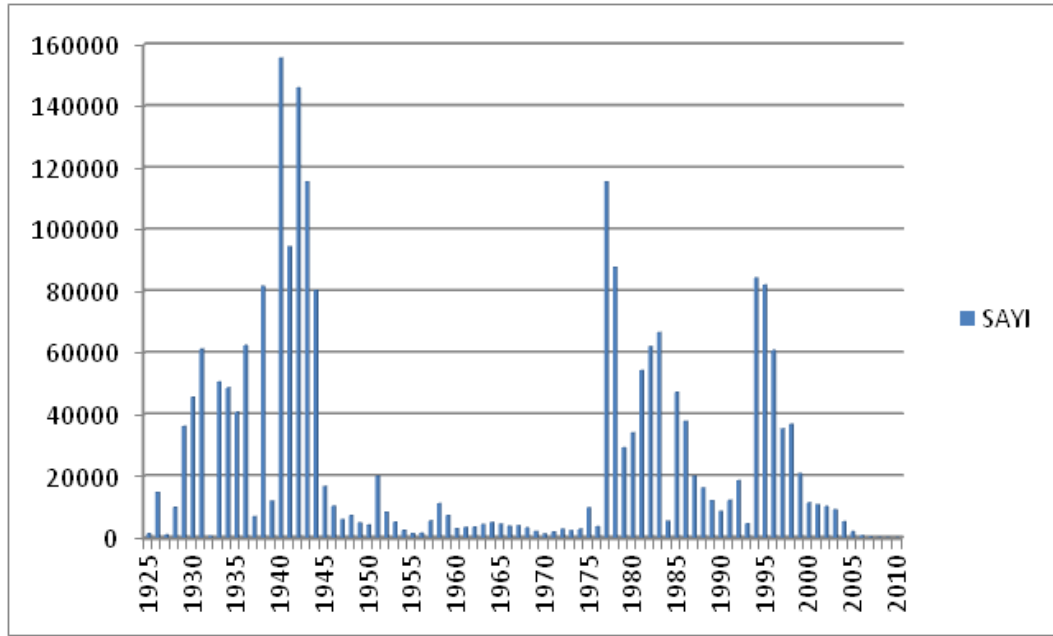


**STRATA IV:** Batı ve Doğu Karadeniz Bölgesi'yle ve Kuzeydoğu Anadolu illerini kapsar. Bu bölgede yerli bulaş görülmesi çok enderdir. Ancak hariçten gelen sporadik olgular görülebilir (12).

Dünya Sağlık Örgütü'nün tüm dünyada başlattığı sıtma eradikasyon programına ülkemiz 1957 yılında dahil olmuştur. DDT'nin kullanılmaya

başlaması ile önemli başarılar elde edilmiş ve 1940'larda 140.000 civarında olan sıtma olgusu 1970'te 1.263'e düşmüştür. Şekil 3'te görüldüğü üzere çeşitli sebeplerden dolayı 1971'den başlayarak sıtma olguları artmış, 1977'de ciddi bir epidemik olmuş ve olgu sayısı 115.512'ye yükselmiştir. 1994 yılında Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde görülen ikinci büyük epidemideki olgu sayısı 84.345'tir. 1995'de olgu sayısı 82.096'ya düşmüştür (Tablo 1). 1996 yılından itibaren sıtma insidansında düşüş izlenmeye başlanmış ve 2009 yılında 84 (sadece 38'i yerli) olgu bildirilmiştir (13).

**Şekil 3.** Türkiye'de sıtma olgularının yıllara dağılımı (1925 ve 2010)



### 3. 2. 3. Güneydoğu Anadolu Projesi ve sıtma

Türkiye'de sıtmanın endemik olduğu Güneydoğu Anadolu Bölgesi (Şekil 4) mevsimsel ve lokal transmisyonlar göstermektedir. Genellikle sıtma olguları haziran-ekim aylarında görülmektedir.

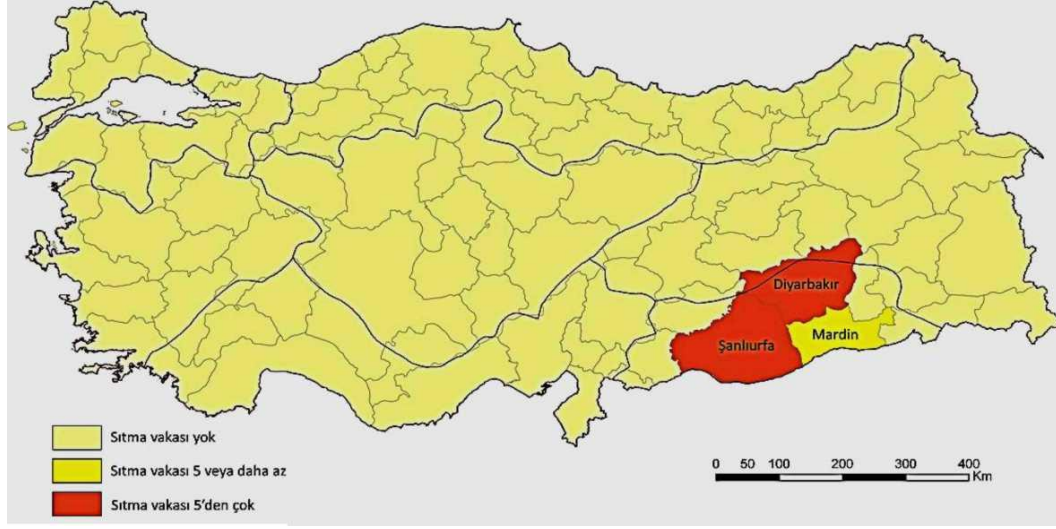


**Tablo 1.** Türkiye’de sıtma olgularının yıllara dağılımı (1925 ve 2010)

Yıl	Olgu Sayısı	Yıl	Olgu Sayısı	Yıl	Olgu Sayısı	Yıl	Olgu Sayısı	Yıl	Olgu Sayısı
1925	1431	1943	115,546	1961	3498	1979	29,324	1997	35,456
1926	14,791	1944	80,387	1962	3594	1980	34,154	1998	36,842
1927	10,190	1945	16,739	1963	4365	1981	54,415	1999	20,963
1928	9928	1946	10,373	1964	5081	1982	62,038	2000	11,432
1929	36,186	1947	5979	1965	4587	1983	66,681	2001	10,812
1930	45,653	1948	7298	1966	3793	1984	55,020	2002	10,224
1931	61,245	1949	4973	1967	3975	1985	47,311	2003	9222
1932	72,500	1950	4211	1968	3318	1986	37,899	2004	5302
1933	50,609	1951	20,132	1969	2173	1987	20,134	2005	2084
1934	48,744	1952	8400	1970	1263	1988	16,245	2006	796
1935	40,842	1953	5227	1971	2046	1989	12,112	2007	358
1936	62,466	1954	2489	1972	2892	1990	8680	2008	215
1937	69,850	1955	1494	1973	2438	1991	12,218	2009	84
1938	81,702	1956	1573	1974	2877	1992	18,676	2010	78
1939	120,060	1957	5536	1975	9828	1993	47,210		
1940	155,683	1958	11,213	1976	37,320	1994	84,345		
1941	94,534	1959	7305	1977	115,512	1995	82,096		
1942	146,077	1960	3092	1978	87,867	1996	60,884		

Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Türkiye’nin sıtma riskli birinci bölgesinde (Strata I) yer almaktadır (1, 12). Türkiye’de görülen iki büyük sıtma epidemisinin biri 1994 yılında 84.345 olguyla Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde görülmüştür (13). Tarih boyunca ülkemiz için bir halk sağlığı sorunu olan sıtma Güneydoğu Anadolu Bölgesi için hala sorun olmaya devam etmektedir.

Şekil 4. Türkiye’ de sıtma endemik bölgeler (10)



Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) bölgesinde, Adıyaman, Batman, Diyarbakır, Gaziantep, Kilis, Mardin, Siirt, Şanlıurfa ve Şırnak illeri yer almaktadır. Kalkınma programı, sulama, hidroelektrik, enerji, tarım, kırsal ve kentsel altyapı, ormancılık, eğitim ve sağlık gibi sektörleri kapsamaktadır. Su Kaynakları Programı 22 baraj, 19 hidroelektrik santrali ve 1.82 milyon hektar alanda sulama sistemleri yapımını öngörmektedir (14). GAP Bölgesi'nde 1.822.000 hektar alanın sulamaya açılması planlanmıştır. 2009 yılı sonu itibariyle Fırat ve Dicle Havzası'nda toplam 300.397 hektar alan sulamaya açılmıştır (15).

GAP bölgesinde insan nüfus artış hızı, Türkiye'nin diğer bölgelerine göre daha fazladır. Örneğin, 2000-2009 yılları arasında GAP Bölgesi'nde yıllık nüfus artış hızı yaklaşık binde 13,51; Türkiye genelinde ise binde 7,53 olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca 2009 yılı itibariyle bölge illerine bakıldığında şehirleşme oranının en düşük olduğu iller %57 ile Mardin ve Adıyaman ve %55,76 ile

Şanlıurfa olarak tespit edilmiştir (14). Şanlıurfa, Diyarbakır ve Mardin Türkiye’de sıtmanın endemik olarak görüldüğü illerdir (Şekil 4).

### **3. 2. 4. Şanlıurfa’da sıtma epidemiyolojisi**

Şanlıurfa ili, genel arazi bölünüşü içerisinde tarım alanları bakımından hem Türkiye’deki tarım alanlarından (%36), hem de GAP Bölgesi’ndeki tarım alanlarından (%43) daha yüksek orana (%64.1) sahiptir. Yine Şanlıurfa’da, GAP projesi tamamlandığında sulanacak alan miktarı 5.181.420 dekar olarak planlanmıştır (16).

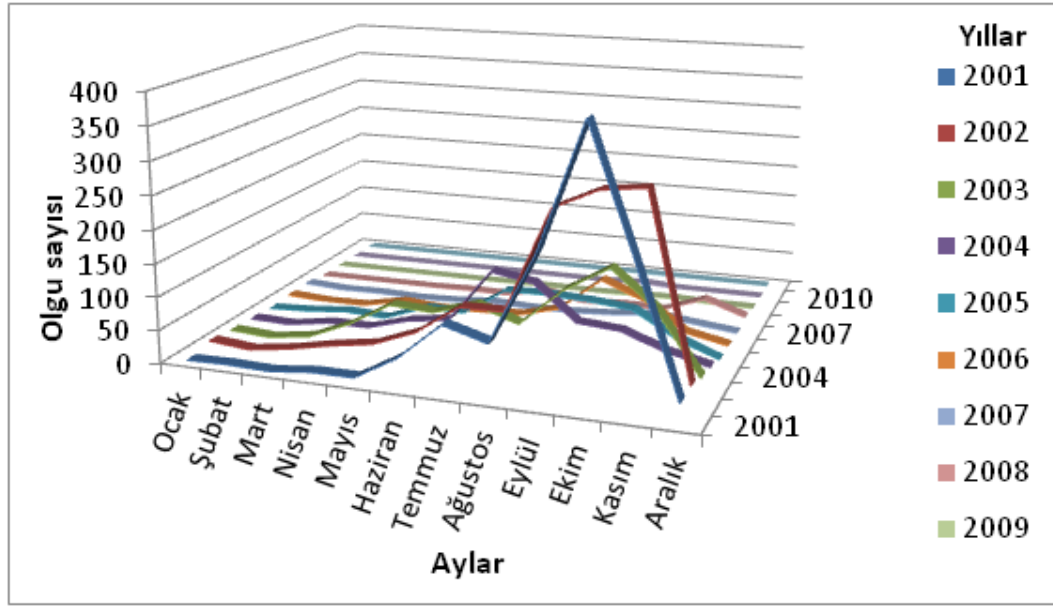
Şanlıurfa’da yılın her ayı sıtma olgusu görülmekle beraber en çok Eylül ve Ekim aylarında saptanmıştır (Şekil 5). Mevsim olarak en çok sonbahar, yaz; en az ise ilkbahar, kış mevsimlerinde görülmektedir (Şekil 6).

Şanlıurfa’da, müsbet çıkan olguların görüldüğü ilçeler incelendiğinde en fazla olgu Siverek’te görülmektedir (Şekil 7). Siverekte sıtmanın sık görülmesinin nedenleri; sulu tarım, pamuk ve çeltik ekiminin yapılması, göçer çeltik ve pamuk tarım işçilerinin sayısının fazla olması ve halkın eğitim düzeyinin düşük olması ile ilişkili olabilir.

2005’te onaylanan Taşkent Deklarasyonu’nda verdiği taahhüt sonucu Devlet, ülke çapında güçlü ve kararlı bir sıtma yok etme politikası izlemiş, sıtma kontrol çalışmalarını Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yoğunlaştırmıştır (17). Bu çalışmalar, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Şanlıurfa’da sıtma sayısının azalmasına yol açmıştır. Şanlıurfa’da 2001-2011 yılları arasında sıtma olgu sayılarında düzenli bir azalmanın olması Türkiye genelindeki sonuçlarla paralellik göstermektedir (Şekil 8) (10, 17, 18). Bu durum Sağlık Bakanlığı Sıtma Birimlerince sürdürülen aktif ve pasif sürveyans hizmetleri, kalıcı insektisit ve

larvasit uygulanması, sisleme çalışmaları, sürfe (sivrisinek larvası) savaşı hizmetleri ve bilimsel çalışmalar ile sağlanmıştır.

**Şekil 5.** Şanlıurfa’ da sıtma olgularının aylara ve yıllara göre dağılımı (2001-2011)

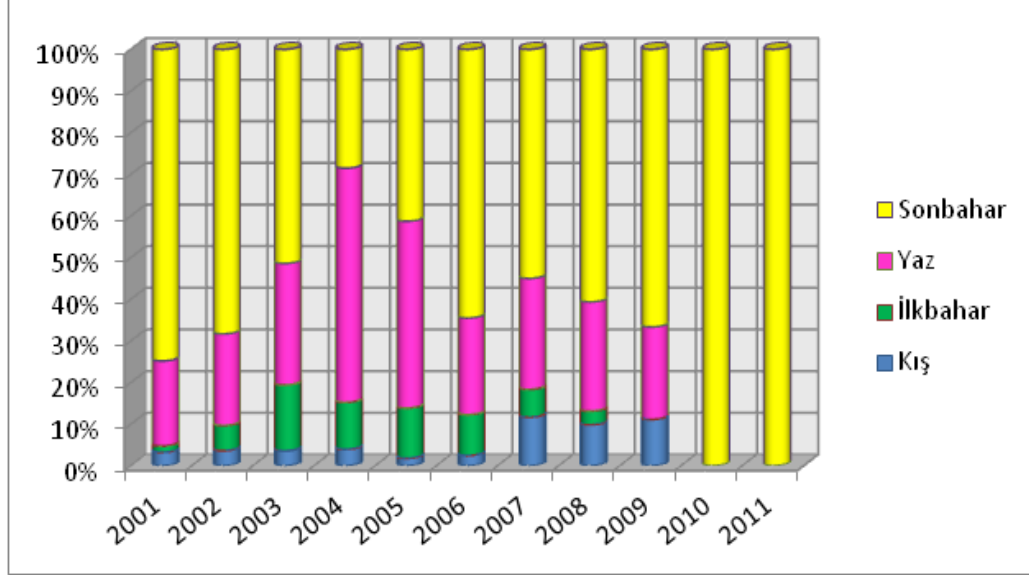


### 3.3. Evrim

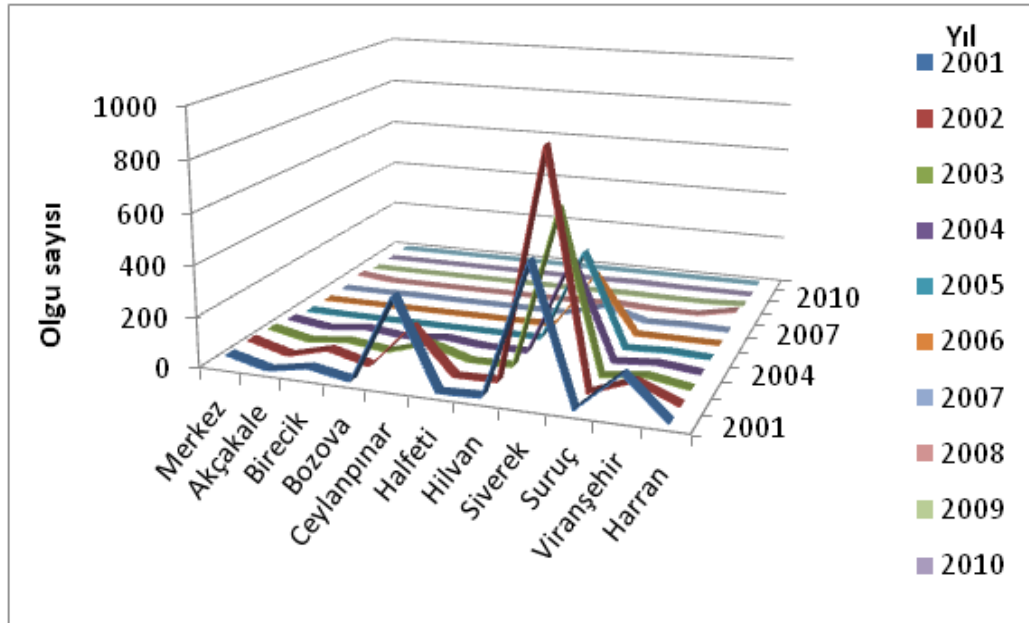
#### 3. 3. 1. İnsandaki evrim

Sıtmanın vektörü olan dişi anofeller, insandan kan emerken tükrük bezlerinde bulunan sporozitler kana geçer. Kana geçen sporozitler yaklaşık yarım saat içinde karaciğer parankim hücrelerine (hepatosit) gider ve burada pre-eritrositik dönem (*primer ekzo-eritrositik dönem*) başlar (3, 5,19)

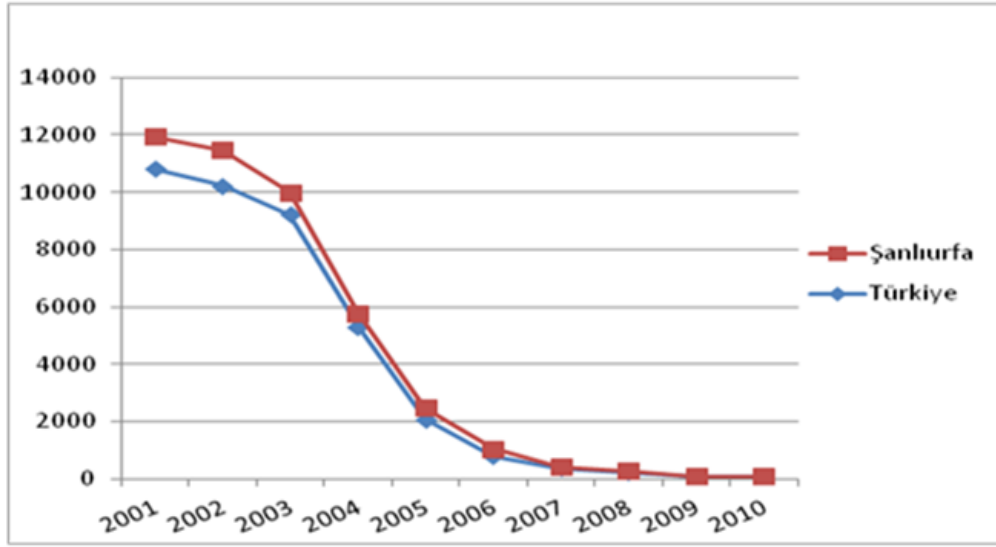
Şekil 6. Şanlıurfa’da sıtma olgularının mevsimlere ve yıllara göre dağılımı (2001-2011)



Şekil 7. Şanlıurfa’da sıtma olgularının ilçelere göre dağılımı (2001-2011)



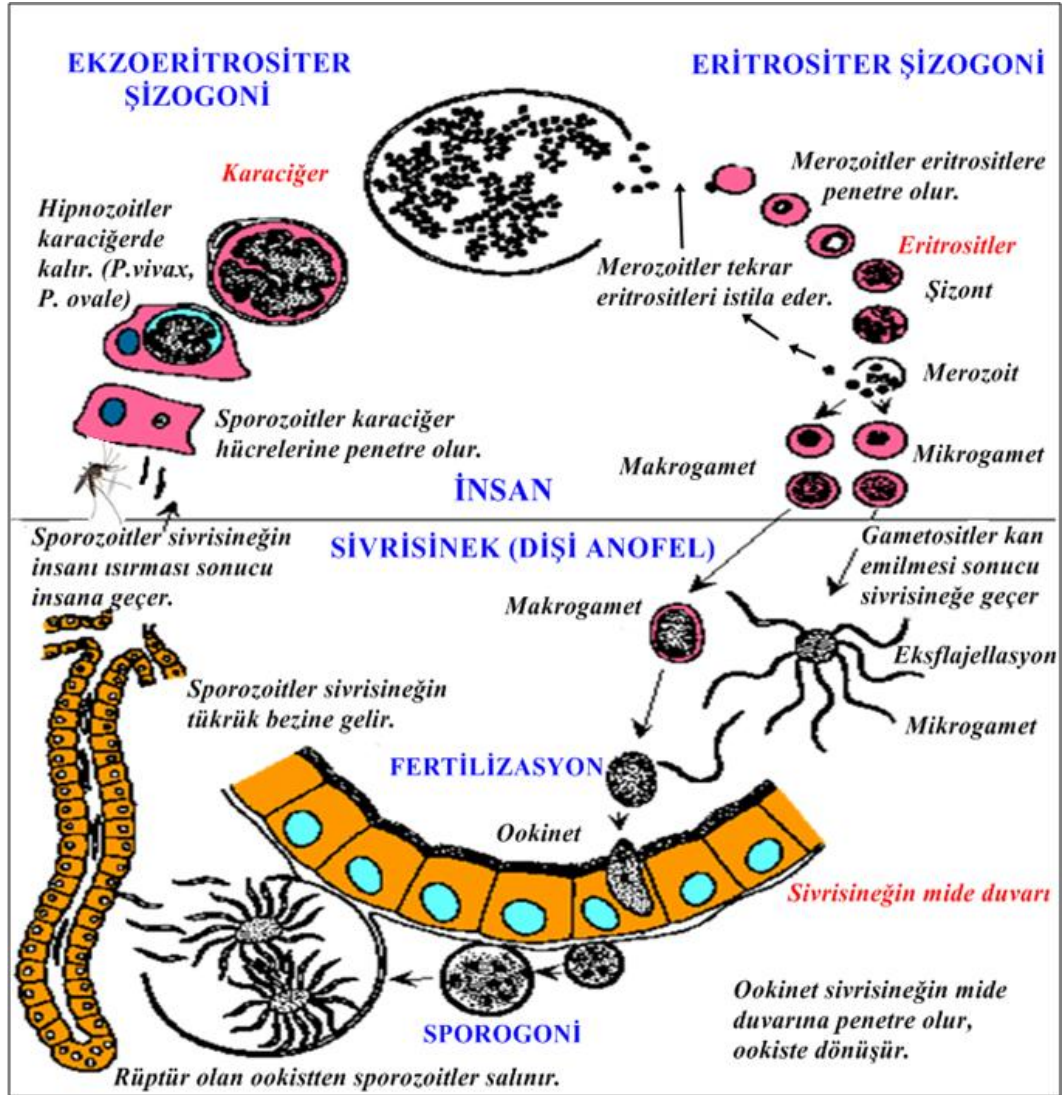
**Şekil 8.** Şanlıurfa ve Türkiye’de sıtma olgularının yıllara dağılımı (2001-2010)



Sporozoitlerin karaciğer parankim hücrelerine girmesinde, sporozoit yüzeyinde bulunan circumsporozoite proteinin (CSP) önemli bir rolü vardır. Sporozoitlerin yüzeylerinde bulunan CSP, immundominant bir antijen olup, bütün *Plasmodium* türleri tarafından pre-hepatik sporozoit döneminde oluşturulur ve yapısı hepsinde birbirine benzer. Karaciğer parankim hücreleri, CSP’yi tanıyarak sporozoitleri içlerine alırlar (20). Hepatosit içine giren sporozoit, yuvarlak veya oval bir şekil alır ve peş peşe bölünmeye başlar. Bu şizogoni sonucunda ekzoeritrositer şizontlar oluşur. Daha sonra bunlardan da ekzo-eritrositer merozoitler oluşur. Bu merozoitler, kana dökülerek eritrositleri infekte ederler ve böylece primer ekzo-eritrositer şizogoni dönemi biter. Sporozoitlerin bir kısmı ise karaciğer parankim hücrelerinde latent bir şekilde yaşamaya devam ederler (sekonder ekzo-eritrositer şizogoni). Bu latent haldeki sporozoitlere hipnozoit adı verilir ki hipnozoitler sıtmada relapsların oluşmasından sorumludurlar. Sekonder ekzo-eritrositer şizogoni, sadece *P. vivax* ve *P. ovale*’de görülür; *P. falciparum* ve

*P. malaria*'da görülmez (1, 5, 19, 21, 22, 23). Kana dökülen merozoitler eritrositleri enfekte ederler. Merozoitlerin eritrositlere girişlerinde merozoit yüzey protein-1'in (Merozoite Surface Protein-1, MSP-1) önemli bir rolü vardır. Yine yapılan çalışmalarda eritrosit membranının bir glikoprotein komponenti olan glycophorinin, *P. falciparum* merozoit reseptörü olarak görev yaptığı öne sürülmüştür (1). Eritrosit içine giren merozoitin şekli değişir ve halka-yüzük şeklini alır. Buna genç trofozoit denir. Bu evrim döneminde parazitin halka şeklinde görülmesi, parazitin boyanma özeliğine dayanır. Bu dönemde, parazitin yapısının da boyalarla boyanmayan büyük bir vakuol, bu vakuolü çevreleyen az miktarda sitoplazma ve halka şeklindeki ince sitoplazmanın inceldiği tarafta ise çekirdek bulunur. Bu görünüm taşlı bir yüzüğe benzer. Boyalı preparatlarda sitoplazma mavi, çekirdek ise parlak kırmızı renkte boyanır (3, 5, 19). Genç trofozoitlerden daha sonra sırasıyla ameboid yapıdaki olgun trofozoit, bunun nükleusunun parçalanmaya başlamasıyla genç şizont ve bundan da olgun şizont gelişir. Olgun şizont içinde merozoitlerin sayısı türe göre değişir. Daha sonra eritrositler parçalanır ve merozoitler eritrositlerden kana dökülürler. Eritrositlerde geçen bu döneme ***eritrositer şizogoni*** adı verilir (1, 19). Eritrositik merozoitler kana dökülür, birçoğu immün yanıtın etkisiyle ölür, fakat diğerleri eritrositlere girerek yeni eritrositik şizogoniyi başlatırlar. Eritrosit içinde bulunan parazitler, hemoglobin ile beslenirler. Bu beslenme sırasında ortaya çıkan demir porfirin ve hematin sindirilemez, sitoplazmada birikir, buna "sıtma pigmenti" adı verilir. Birkaç nesil eritrositer şizogoniden sonra gametogenesis başlar. Eritrosit içine giren merozoitlerin bazısında şizont gelişmez, bunun yerine mikrogametosit veya makrogametosit gelişir (1, 19).

Şekil 9. *Plasmodium*'ların insan ve dişi anofel vücudundaki yaşam döngüsü



### 3. 3. 2. Anofeldeki evrim

*Anopheles* cinsi dişi sivrisinekler, sıtmalı hastalardan kan emerken bunların kanlarından makrogametosit (dişi) ve mikrogametositleri (erkek) alırlar. Bunlar sivrisineğin midesinde makrogamet ve mikrogamete dönüşür. Mikrogametositlerden mikrogamet oluşumu eksflajellasyon ile olur. Daha sonra makrogamet içindeki nükleus, yüzeye yaklaşır ve burada bir çıkıntı oluşturur. Bu çıkıntıya mikrogamet penetre olur ve böylece döllenme başlar. Döllenmiş bu makrogamete zigot adı verilir. Zigottan 20-30 dakika sonra protoplazmanın bir



yöne akmasıyla yalancı bir ayak çıkar, zigot fuziform şekle dönüşür, bu hareketli yapıya ookinet denir. Daha sonra ookinette ince bir duvar oluşur ve yuvarlak bir şekil alır. Buna ookist denir. Ookistler sivrisineğin hemosöline doğru hareket ederler. Ookistler olgunlaştıkça, içlerinde çekirdeğin bölünmesi ve etrafının sitoplazma ile çevrilmesi ile sporozoitler oluşmaya başlar. İçlerinde sporozoit içeren ookistlere olgun ookist denir. Daha sonra olgun ookistin patlaması ile binlerce sporozoit hemosöle ve buradan da sivrisineğin vücudunun diğer bölgelerine dağılır. Daha sonra, tükürük bezlerine yerleşir. Dişi anofel, beslenmek için insanlardan kan emerken bu sporozoitleri de insanlara enjekte ederler (1, 19, 22, 24). Şekil 9'da *Plasmodium*'ların insanda ve dişi anofeldeki yaşam döngüsü görülmektedir.

### **3. 4. Morfoloji**

*Plasmodium* türleri Giemsa ile boyandıklarında, genel olarak eritrositlerin içinde sitoplazmaları mavi, çekirdekleri ise parlak koyu kırmızı renkte görülürler (25).

#### **3. 4. 1. *Plasmodium vivax***

*Plasmodium vivax*, genç eritrositleri enfekte eder. Enfekte eritrositler, normalin 1,5-2 katı büyüklüğe ulaşır. Genç trofozoit formu hariç bütün formlarda eozinofilik Schüffner granülleri görülür. Bazen bir eritrositte birden fazla *P.vivax* bulunabilir.

**Genç trofozoit formu (halka, yüzük formu)**, eritrositin 1/3'ünü kaplar. Halka biçimindedir. Vakuol sitoplazma ile sarıdır, kenarda koyu parlak kırmızı tanecik şeklinde kromatini ve sitoplazması açık mavi, bazen amibimsidir.

**Olgun trofozoit formu:** Eritrosit içinde düzensiz, vakuollü ve sitoplazması amibimsidir.

**Genç şizont formu:** Kromatin tanecikleri bölünmüştür. Sitoplazma kahverengi pigment kümeleri içerir. Olgun şizont içinde 12–24 tane merozoit, sarımsı-kahverengi, iri yapıda pigmentler vardır. Eritrositleri tamamen doldurmuştur.

**Gametositler:** Yuvarlak veya oval şekilde olup geniş bir kromatin içerir. Kahverengi pigmentler dağılmış durumdadır ve hemen hemen eritrositi doldurmuştur. Schüffner granülleri *P. ovale*'ye göre daha ince görülürler (1, 5, 19, 24, 28).

### **3. 4. 2. Plasmodium falciparum**

*Plasmodium falciparum*, her yaşta eritrositleri enfekte eder. Enfekte eritrositler normal büyüklüktedir. Eritrosit içinde Maurer lekeleri görülür. Periferik kanda sadece halka ve gametosit formu görülür.

**Genç trofozoit formu:** Eritrositlerin ancak 1/6'sını kaplar, kırılabilir bir sitoplazması ve bir ya da iki küçük kromatin taneciği vardır. Diğer türlere göre eritrositlerin birden fazla parazitle enfekte olmaları sıktır. Bir eritrosit içinde 2-8 adet genç trofozoit görülebilir. Nadiren yüzük formlar eritrositin periferinde (aplike form) görülebilirler.

**Gametositler:** Eritrositten 1.5 kat daha uzun, elipse benzer ve sosismuz ya da hilal şeklinde görünürler. Kromatin tek bir kitle şeklinde (makrogamet) ya da dağılmış şekildedir (mikrogamet). Mikrogametositler, makrogametositlere oranla daha açık mavi renktedir.

**Trofozoitler:** *P. falciparum* trofozoitleri nadiren periferik kanda görülür. Olgun trofozoitlerin sitoplazmaları genç trofozoitlere göre daha yoğundur. Hafif

amibimsi ve yüzük şeklinde olmaya meyilli sitoplazma içinde, eser miktarlarda sarı pigment görülebilir.

**Şizont:** *P. falciparum* şizontları periferik kanda çok nadir görülür. Olgun şizontların içinde 8-24 küçük merozoit, bir araya toplanmış küme halinde ve koyu renk pigment bulunur.

### **3. 4. 3. *Plasmodium malaria***

*Plasmodium malaria*, olgun eritrositleri enfekte eder. Diğerlerinden farklı olarak enfekte eritrositler normal büyüklükte veya normalden daha küçüktür.

**Genç trofozoit (Ring-Yüzük-Halka)** *Plasmodium malaria* genç trofozoitleri eritrositin ¼'ünü kaplar. Dayanıklı, koyu mavi bir sitoplazması ve kırmızı renkte büyük bir kromatine sahiptir.

**Trofozoitler** *Plasmodium malaria* trofozoitlerinin yoğun, koyu mavi bir sitoplazması ve kırmızı renkte büyük bir kromatini vardır. Sitoplazma, şerit şeklinde eritrositi bir baştan diğer başa kaplamıştır. Bazen kaba iri taneli koyu-kahverengi pigmentler ile birlikte bant ve/veya “sepet” şeklinde görülebilir.

**Şizont:** *Plasmodium malaria* şizontları koyu-kahverengi, kaba iri taneli pigmentlerin etrafında demet yaptığı büyük nukleuslu 6-12 merozoit içerirler. Merozoitler zaman zaman rozet biçiminde dizilirler. Papatya görünümü tipiktir.

### **3. 4. 4. *Plasmodium ovale***

*Plasmodium ovale* de genç eritrositleri enfekte eder. Enfekte eritrositler normal veya çok az büyümüş halde görünürler. Yuvarlak veya oval olabilirler. Normal şartlarda Schüffner granülleri görülebilir.

**Genç trofozoit (Ring-Yüzük-Halka)** *P. ovale* genç trofozoitleri sağlam bir sitoplazmaya ve büyük kromatin tanacıklarına sahiptir. *P. vivax*' a benzerler.

**Trofozoitler** *P. ovale* trofozoitlerinin dayanıklı bir sitoplazması, iri koyu kahverengi, yoğun hafif düzensiz kromatin tanacikleri olabilir.

**Gametositler** *P. ovale* gametositleri yuvarlak oval ve hemen hemen eritrositi doldurmuştur. Pigmentleri kahverengi ve *P. vivax*'a göre daha iri tanelidir.

**Şizont** *P. ovale* şizontları iri nukleuslu 6-14 merozoit bulundururlar, etrafında koyu- kahverengi kaba iri taneli pigmentler demet yapmış halde bulunurlar.

### **3. 4. 5. Plasmodium knowlesi**

*P. knowlesi*, insanları enfekte eden 5. *Plasmodium* türü olarak tanımlanmıştır. Ana konağı macaque maymunlar olup, özellikle bu maymunların yaşadığı Malezya ve Güneydoğu Asya ülkelerinde insan olguları görülmektedir. İnsanda tipik sıtma nöbetleri yaklaşık 24 saatte bir 40,5<sup>0</sup>C'lere çıkan ateş ve yüksek parazitemi düzeyleri ile seyretmektedir. *P. knowlesi*, şiddetli ve hatta ölüme neden olabilen ağır klinik tablolar oluşturmasıyla *P. falciparum*'la benzerlik gösterirken diğer türlerden ayrılmaktadır.

*P. knowlesi* morfolojik olarak daha çok *P. malaria*'ya benzemektedir. *P. malaria* ile karşılaştırıldığında, çok yüksek parazitemi seviyeleri ile birlikte, klinik tablo ve hastalığın seyri çok daha şiddetli ve ölüme sonuçlanabilmektedir. Tanı, mikroskopi ve PCR ile yapılabilir. Mikroskopi, *P. knowlesi* ile *P. falciparum*'un genç trofozoitlerini ve olgun eritrositer evrelerini *P. malaria* ile ayıramaz. Bu nedenle PCR ile tanı koymak daha anlamlıdır (25). Tablo 2'de boyalı kan yaymalarında *Plasmodium* türlerinin karşılaştırılması görülmektedir.

**Tablo 2.** Boyalı kan yaymalarında *Plasmodium* türlerinin karşılaştırılması

Plasmodium Türleri		Eritrositer Evre	Eritrosit	Parazit
<b><i>P. falciparum</i></b>	Genellikle genç, olgun trofozoitler ve/veya olgun gametositler görülür	Genç trofozoit	Normal; birden fazla parazit ile enfeksiyon sıklığı	Kıvrımlı sitoplazma; 1-2 küçük kromatin taneciği; nadiren aplik form
		Trofozoit	Normal; nadiren Maurer cisimcikleri (boyanın kalitesine bağlı)	Periferik kanda nadiren görülür; yoğun sitoplazma; koyu renk pigment
		Şizont	Normal; nadiren Maurer cisimcikleri (boyanın kalitesine bağlı)	Periferik kanda nadiren görülür; 8-24 küçük merozoit, koyu renk kümelenmiş pigment
		Gametosit	Şekli parazit tarafından bozulmuş	Muz ya da hilal şeklinde; kromatin tek bir kitle (makrogametosit) ya da dağınık halde (mikrogametosit); koyu pigment kütlesi
<b><i>P. vivax</i></b>	Tüm evrelerde görülür; eritrosit silüeti içinde Schuffner granülleri, özellikle preparatın kenarlarında	Genç trofozoit	Normal 1-1/4 X, yuvarlak; Schuffner granülleri; çoklu enfeksiyon sık değil	Bazen amibimsi, iri kromatin tanecikli büyük sitoplazma
		Trofozoit	Büyümüş 1-1/2-2 X şekli bozulmuş olabilir; Schuffner granülleri	Amibimsi büyük sitoplazma; iri kromatin taneciği; kahverengi ince pigment
		Şizont	Büyümüş 1-1/2-2 X şekli bozulmuş olabilir; Schuffner granülleri	Büyük eritrositi tamamen doldurmuş; 12-24 merozoit; kahverengi iri pigment
		Gametosit	Büyümüş 1-1/2-2 X şekli bozulmuş olabilir; Schuffner granülleri	Yuvarlak-oval; kesif; eritrosit tamamen doldurmuş; kompakt, dış yerleşimli (makrogametosit) ya da dağınık (mikrogametosit) kromatin; dağınık kahverengi pigment
<b><i>P. ovale</i></b>	Tüm evrelerde görülür; Schuffner granülleri eritrosit silüeti içinde belirgindir. Özellikle preparatın kenarlarında	Genç trofozoit	Normal 1-1/4 X, yuvarlak-oval; bazen Schuffner granülleri, çoklu enfeksiyon sık	Dayanıklı, kesif sitoplazma; büyük kromatin taneciği
		Trofozoit	Normal 1-1/4 X, yuvarlak-oval; bazen bant şeklinde; Schuffner granülleri	Kesif, iri kromatin tanecikleri; koyu kahverengi pigment
		Şizont	Normal 1-1/4 X, yuvarlak-oval; bazen bant şeklinde; Schuffner granülleri	Büyük nükleuslu 6-14 merozoit, iri koyu pigment kümeleri
		Gametosit	Normal 1-1/4 X, yuvarlak-oval; bazen bant şeklinde; Schuffner granülleri	Yuvarlak-oval; kompakt; dış yerleşimli (makrogametosit) ya da daha yaygın (mikrogametosit); dağınık kahverengi pigment
<b><i>P. malariae</i></b>	Tüm evrelerde görülür	Genç trofozoit	Normal -3-4 X	Dayanıklı sitoplazma; iri kromatin
		Trofozoit	Normal - 3/4 X; nadiren Ziemann tanecikleri (boya kalitesine bağlı)	Yoğun sitoplazma; iri kromatin; bazen bant şeklinde; iri taneli koyu kahverengi pigment
		Şizont	Normal - 3/4 X; nadiren Ziemann tanecikleri (boya kalitesine bağlı)	Büyük nükleuslu 6-12 merozoit, koyu kahverengi iri taneli pigmentler demet yapmış, nadiren rozet oluşturur
		Gametosit	Normal - 3/4 X; nadiren Ziemann tanecikleri (boya kalitesine bağlı)	Yuvarlak-oval; kesif eritrositi tamamen doldurmuş; kromatin dış yerleşimli (makrogametosit) ya da daha yaygın (mikrogametosit); dağınık kahverengi pigment

### 3. 5. İmmünoloji

*Plasmodium* türlerine karşı insanlarda ırk ve yaş direnci mevcuttur. Zenciler Duffy kan grubuna sahip olmadığı için sıtmaya dirençlidirler. Orak hücre anemili zencilerde de parazitin HbS'yi kullanamaması nedeniyle yine bir direnç mevcuttur. Sıtma türlerine karşı kişide türe özgül bir antikor yapımı mevcuttur. Bu, IgG ve IgM tipindedir. Bu antikorlar; IHA gibi serolojik yöntem ile gösterilebilir. Sıtmada görülen koruyucu bağışıklık preminüsyon bağışıklığı yani süperenfeksiyona direnç şeklindedir. Vücutta az sayıda parazit bulunurken aynı parazitte tekrar enfekte olmama durumuna preminüsyon bağışıklığı denir. (3).

### 3. 6. Klinik

Hastalar; enfekte dişi anofelin sokmasından sonra, bir hafta veya biraz daha fazla süreyle asemptomatiktirler. Bu süre içinde parazit, karaciğerde pre-eritrositik siklusunu tamamlamaktadır. Sıtma nöbetleri, parazit karaciğeri terk edip eritrositleri enfekte ettikten sonra, eritrositlerin rüptürü ve metabolik atıklarının kana geçmesi ile ortaya çıkmaktadır (19). Şizogoni sonucunda kana dökülen merozoitler, pigment ve eritrosit artıkları, aktive makrofajlardan tümör nekroz faktör salgılanmasına neden olmaktadır (3, 5). Sıtmanın klinik semptomları arasında anemi, splenomegali, üşüme-titrete, ateş ve terlemeden oluşan klasik nöbetler bulunmaktadır. Her ne kadar ateşli nöbetler, enfeksiyonu güçlü bir şekilde düşündürse de, bazen hastalığın erken evrelerinde tipik ateş bulgusu ortaya çıkmayabilir. Tipik nöbetler 1–2 saat süren üşüme-titrete ile başlar. Bunu takiben hastada yüksek bir ateş ortaya çıkar, deri sıcak ve kurudur (19). Ateş 39–41°C'ye kadar yükselir, beraberinde baş ağrısı vardır (3). Birkaç saat sonra hastada şiddetli bir terleme olur ve terlemeyle beraber vücut sıcaklığı

normale veya normalin biraz altına düşer (19). Terleme dönemi 2-3 saat kadar sürer. Bu süre sonunda hasta yorgun düşüp uykuya dalar (5). Sıtma sırasında ortaya çıkan aneminin birkaç mekanizması vardır. Bunlar arasında; parazitin yaşam siklusu sırasında ortaya çıkan eritrosit lizisi, enfekte ve enfekte olmayan fakat immun kompleks içeren eritrositlerin dalak tarafından çevre kanından uzaklaştırılması, eritrositlerin otoimmun lizisi, eritrosit fragilitelerinin artması ve eritrosit üretiminin kemik iliği tarafından baskılanması bulunmaktadır (19).

*Plasmodium vivax* sıtmasında klinik nöbetler, enfeksiyondan 7–10 gün sonra ortaya çıkar. Bazı hastalarda, parazit kanda saptanmadan önce baş ağrısı, fotofobi, kas ağrıları, iştahsızlık, bulantı ve bazen kusma gibi semptomlar ortaya çıkabilir. Bazı hastalarda ise parazit, semptomlar daha ortaya çıkmadan önce kanda saptanabilmektedir. Başlangıçta sıtma nöbetleri düzensiz gelirken, daha sonra 48 saatte bir gelen düzenli nöbetlere dönüşür. Tedavi edilmeyen hastalarda bu nöbetler, 3 hafta ile 2 ay arasında veya daha uzun süre görülür. Bu hastaların %50'sinde haftalar, aylar sonra relapslar ortaya çıkmaktadır. Hastalarda dalak rüptürü geç bir komplikasyon olarak ortaya çıkar (19).

*Plasmodium falciparum* sıtması tropikal bölgelerde görülür ve klorokin direncine sık rastlanılır (26). İlk nöbetler, enfeksiyondan 8–12 gün sonra ortaya çıkar. Nöbetlerden 3-4 gün önce hastalarda vücut ağrıları, baş ağrısı, yorgunluk, bitkinlik, iştahsızlık ve mide bulantısı gibi özgül olmayan belirtiler ortaya çıkabilir. Nöbetler 36–48 saatte bir gelir, erken evrelerde periyodik değilken, zamanla periyodikleşir ve senkronize olur. Bu primer atak, 2–3 haftada son bulur. *P. falciparum* sıtması sırasında karaciğer kökenli gerçek relapslara rastlanılmaz. Fakat, bu sıtma türünün prognozu diğerlerine oranla daha kötüdür. Ortaya çıkan komplikasyonlar genelde

iç organlarda bulunan damarların tıkanmasına bağlı olarak gelişmektedir (19). *P. falciparum*, mikrovasküler hastalık oluşturur. Bunda eritrositlerin yüzeyinde çıkıntılar oluşur ve bu yüzden eritrositler beyin, böbrek ve diğer organlarda kapiller endotele yapışırlar ve mikrosirkülasyonu tıkarlar (1, 3). *P. falciparum* sıtması sırasında ortaya çıkan başlıca komplikasyonlar arasında, akut akciğer ödemi, yaygın damar içi pıhtılaşması (DIC), serebral sıtma, şiddetli anemi, tropikal splenomegali, renal fonksiyon bozukluğu ve karasu humması bulunmaktadır (1, 19, 27).

Serebral sıtma, *P. falciparum* enfeksiyonunda serebral mikrosirkülasyonun engellenmesine bağlı olarak gelişir; en ciddi komplikasyonudur. Çok yüksek ateşle seyreder (42°C veya daha fazla), baş ağrısı, konvülsiyon ve deliryum gelişir. Hasta kısa sürede şuurunu kaybeder, komaya girer ve birkaç saat içinde ölür. Karasu ateşi ise, *P. falciparum* enfeksiyonunda paraziteminin çok fazla olduğu olgularda ortaya çıkar. Ayrıca kinine karşı aşırı duyarlılık veya G6PDH eksikliği olanlarda oksidan antimalaryal ilaçların kullanılmasına bağlı olarak ta gelişebilir. Hastalarda ağır hemoliz, hemoglobinemi ve hemoglobinüri vardır. Akut böbrek yetmezliği ortaya çıkar, ateş, derin anemi, sarılık ve kas-eklem ağrıları vardır, periferik yaymada enfekte eritrositler görülmezler (1, 5, 19, 29). *P. ovale*, tertiana sıtması etkenidir. *P. ovale* sıtması, *P. vivax* sıtmasına klinik olarak çok benzemektedir, fakat daha hafif seyreder, relapslar sık görülmez ve 6–10 nöbetten sonra kendiliğinden düzelir. Nöbetler 48 saatte bir gelir, daha ani başlarsa da daha kısa sürer (1, 19). *P. malaria*'da nöbetler 72 saatte bir gelir, inkübasyon süresi bir ay veya daha fazla olacak kadar uzundur. Titremeler diğer sıtma şekillerine oranla daha şiddetlidir. Ateşin 40°C'yi geçmesi nadirdir, nöbetler



4-8 hafta kadar sürer. Bu tip sıtmada, böbrek bozuklukları (nefrotik sendrom ve kronik glomerülonefropati) diğer sıtma enfeksiyonlarından daha sık görülür. Afrika'nın doğu ve batı bölümlerinde *P. malaria*'ya bağlı nefrotik sendrom oldukça önemlidir. Olguların yarısı 15 yaşın altındadır ve prognozu kötüdür (1).

### **3. 7. Tedavi**

1. Yardımcı olmak amacı ile destek tedavisi,
2. Etkene özgün ilaç tedavisi yapılır.

**3. 7. 1. Destek tedavi:** Her ateşli sıtma hastası yatırılmalı, bol limonata ve sulu içecekler verilmeli, klinik belirtilerine göre semptomatik tedavi (Kan transfüzyonu, vitaminler, demirli preparatlar, beslenme v.s.) uygulanmalıdır.

**3. 7. 2. İlaç tedavisi:** 4-aminoquinoline (Chloroquine), 8-aminoquinoline (primaquine), Dihidrofolat redüktazı inhibe edenler (Proguanil, Chlorproguanil, Pyrimethamine, Trimethoprim), Sulfonamidler (Sulfadoxine sulfalene), Sulfon'lar (Dapson), Quinolinemetanoller (Quinine, Quinidine, Mefloquine), Acridin'ler (Mepaerine, Floxacrine), Antibiyotikler (Tetracycline, Doxycycline, Mincycline, Clindamycin, Eritromycine) sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Klorokin, kinin, kinidin, meflokin, proguanil, pirimetamin, sülfadoksin kandaki şizontlara, primakin ekzoeritrositer şizontlara ve hipnozoitlere karşı etkindir. Ayrıca primakin gametositlerin anofellerdeki gelişimlerini engeller. Proguanil ve pyrimethamine de doku şizontlarına etkilidir. Sıtma tedavisinde önemli bir nokta, etkenin ilaca dirençli olup olmamasıdır. Klorokine direnç yurdumuzda henüz görülmemektedir. Sıtma nöbetleri sırasında tedavi için (nöbet tedavisi için) klorokin seçilecek ilaçtır. Dozu, 150 mg'lık (baz) tabletleri ve 50 mg (baz) 15 ml şurupları vardır. Hastalara başlangıçta 600 mg baz, 6 saat sonra 300 mg, 12 saat

sonra 300 mg, 24 saat sonra 300 mg veya takip eden 2-5. günde 300 mg verilir. Çocuklara başlangıçta 10 mg/kg, 6 saat sonra 5 mg/kg, 24 saat sonra 5 mg/kg hesabı ile ilaç verilir. Enfeksiyonun kökten (radikal) tedavisi için primakin 15 mg (baz) 14 gün verilir. (Primakin verilmeden önce G6PD enzim düzeyine mutlak bakılmalıdır. Bu ilaç G6PD enzim eksikliği olanlarda hemolitik krize neden olur). Klorokine 24 saatte yanıt alınmazsa günde 3 kez 650 mg kinin sülfat verilir ve 14 gün devam edilir. Hastalarda çok yüksek parazitemi varsa (% 5'in üzerinde) veya *P. falciparum* sıtmasının önemli komplikasyonları (şiddetli anemi, akciğer ödemi, koma, böbrek yetmezliği gibi) ortaya çıkmış ise kinin hidroklorit IV yolla yavaş bir şekilde 8 saat içinde uygulanır.

**3. 7. 3. Gebelerde anti-malaria ilaçları:** Enfeksiyon hastalıkları riski nedeni ile gebelerin sıtmalı bölgelere yolculuk yapmaları önerilmez. ihtiyaç duyulduğunda klorokin tedavisi veya profilaksisi hamilelerde genellikle emniyetlidir. Folik asit antagonistleri deneysel olarak teratojenik olduğundan hamilelerde profilaktik amaçla dahi kullanılmamalıdır. Hamilelerde tekrarlayan sıtmalarda primakinden kaçınılmalı, her defasında klorokin verilmelidir. Doğum sonrası primakin verilebilir (30, 31).

### **3. 8. Laboratuvar tanı**

#### **3. 8. 1. Mikroskopi**

Sıtma şüphesi, acil bir durumdur ve kişi en kısa sürede bir sağlık merkezine başvurmalı ve hızlı bir şekilde tanısı konulmalıdır. Sıtma tanısı ve tedavisinin ilk adımı ayırıcı tanıda sıtmanın düşünülmesidir. Erken, hızlı tanı ve etkili tedavi sıtma morbiditesi ve mortalitesini azaltmak için anahtar rol

oyunar. Sıtma tedavisi öncesinde sıtma parazitlerinin gösterilmesi esastır. Klinik tanı kesin değildir ve yanlış tanıya yol açabilir. Hastanın tanı merkezine başvurmadan önce sıtma tedavisinin başlanmış olması, parazit sayısını belirgin olarak düşüreceğinden, mikroskopik tanıyı güçleştirir. Bu yüzden mutlaka herhangi bir ilaç alıp almadığı sorgulanmalıdır (32).

Sıtma parazitleri, hastadan alınan bir damla kanın lam üzerine yayılması ile elde edilen kan yaymalarının mikroskop altında incelenmesi ile ayırt edilebilir (33). Çoğunlukla parmak ucundan alınan kan örneği ile kalın damla ve ince yayma kan yaymaları hazırlanır, Giemsa ile boyanarak mikroskop altında x100 immersiyon objektifi ile incelenir. Bu teknik sıtmanın laboratuvar doğrulaması için kabul edilmiş bir yöntemdir. İyi hazırlanmış, iyi boyanmış bir kan preparatının iyi eğitilmiş deneyimli bir mikroskopist tarafından, dikkatli incelenmesi sıtma parazitin tanınması ve tiplendirilmesinde hala referans laboratuvarlar için "altın standart" olarak kabul edilmektedir.

### **3. 8. 1. 1. Örnek alınması**

### **3. 8. 1. 2. Örnek tipi**

Periferik kan yaymaları (ince yayma ve kalın damla) parmak ucu, damar yoluyla alınan venöz kan, kulak memesi ve bebeklerde topuk ya da başparmaktan alınan tam kan ile hazırlanabilir. Ayrıca yeni doğan enfeksiyonlarında kordon kanı, plasenta sürüntüsü kullanılabilir. Sıtma şüpheli ölümlerde, postmortem ince iğne ile alınan beyin gri cevherinden yapılan yaymalar ve tedavi başlanmış olan ya da ağır hastalarda periferik kanda parazit

görülmemesi durumunda kemik iliği aspirasyonu ile yapılan yaymalar da tanı amaçlı kullanılabilir.

Venöz kan örnekleri çeşitli tanı testleri için yeterli miktarda materyal sağlar. Ancak venöz kan örneğinde bulunan antikoagülanlar, parazit morfolojisi ve boyanma özelliklerini etkileyebilir. Bu sorun kanın alımından yaymaların hazırlanmasına kadar geçen sürenin aşırı uzamasıyla paraleldir. Böyle durumlarda kapiller kan örnekleri tercih edilir.

### **3. 8. 1. 3. En uygun örnek alma zamanı**

Örnek mümkünse, tedaviye başlamadan önce ve nöbetler arasında alınmalıdır. Sıtma şüphesi var ise hızlı bir şekilde kan yaymaları yapılmalı ve gecikmeden incelenmelidir. Parazitemi dalgalanma gösterdiğinden çok sayıda yayma hazırlanması gerekebilir. 8-12 saat arayla 2-3 kez örnek, alınması tanı olasılığını artırır.

### **3. 8. 1. 4. Yöntem**

#### **a) Parmak ucundan kapiller kan alınması**

Lamlar (tercihen bir ucu buzlu cam) hasta adı, tarih gibi kısa bilgi ile etiketlenir. Alternatif olarak kulak memesi, çocuklarda ayak baş parmağı ya da topuk örnek almak için kullanılabilir.

#### **b) Damar yoluyla venöz kan alınması**

Venöz kan antikoagulan (tercihen EDTA) içeren vakumlu kan tüpüne alınır. Ya da bir enjektörle alınıp, antikoagulanlı bir tüpe boşaltılarak iyice karıştırılır.

### **3. 8. 1. 5. Kan yaymalarının hazırlanması**

Eğer venöz kan kullanılacaksa, parazit morfolojisi ve boyanma özelliklerinin değişmemesi için, yaymalar mümkün olduğunca çabuk hazırlanmalıdır.

### **3. 8. 1. 6. Kalın damla**

Kalın damla dehemoglobinize kırmızı kan hücrelerinin kalın bir tabakasından ibarettir. Kan elemanları (eğer varsa parazit dahil) aynı büyüklükte bir ince yayma preparata göre yaklaşık 15-20 kat halinde bulunurlar. Böylece parazitin saptanmasında duyarlılığı çok daha yüksektir. Kalın damla preparatlar 20-40 kez daha duyarlıdır ve mikrolitrede 5-50 trofozoit tespit edilebilir. Ancak parazit morfolojisi konusunda yeterli bilgi vermediğinden tür ayırımı kalın damla preparat ile mümkün değildir.

### **3. 8. 1. 7. İnce yayma**

İnce yaymalar kanın uca doğru kalınlığı giderek azalan ince yayılmış bir tabakadan ibarettir. Uca doğru hücreler tek tabaka şeklinde olmalıdır. İnce yayma preparatlar, tür tayini yapılması, dolayısıyla birden fazla tür ile enfeksiyonların tanısının konulması, parazitemi düzeyinin belirlenmesi ve parazitlerin hangi evrede olduğunun (şizont, gametosit ve nötrofil ve monositlerdeki sıtma pigmentinin görülmesi) tespiti için kullanılır.

Her hasta için en az 2 yayma hazırlanmalıdır.

### **3. 8. 1. 8. Kan yaymalarının Giemsa ile boyanması**

- 1.** Hazırlanan kan yaymaları tam olarak kurutulur ve metanol ile 1-2 dk. fikse edilir (kalın damla fikse edilmez).
- 2.** Boyanacak lam sayısına göre 1 ml saf su (pH 7.2) içine 1 damla Giemsa stok boyası eklenecek şekilde boya solüsyonu hazırlanır ve lamın üzerini kaplayacak şekilde dökülür (her bir lam için en az 3-5 ml).
- 3.** 30-40 dk, beklendikten sonra boya lamın üzerinden dökülür ve lam çeşme suyunda yıkanır. Kalın damla direk su altında tutulmaz, suya daldırılarak yıkanır.
- 4.** Boyadan çıkarılıp tekrar temiz su ile yıkanır ve kurutulduktan sonra ışık mikroskopunda immersiyon objektifi (x100) altında incelenir.

**Hızlı boyama:** Hızlı sonuç istenen acil vakalarda veya az sayıda (1-15) lamın boyanacağı durumlarda; %10'luk yoğun Giemsa boyası (3 damla stok Giemsa+1ml saf su) hazırlanarak kan yaymaları yaklaşık 8-10 dk gibi çok daha kısa sürede boyanabilirler.

### **3. 8. 1. 9. Kalın damlanın incelenmesi**

Eritrositlerin parçalanmasıyla parazitlerin daha fazla yoğunlaşması sağlandığı için, kalın damla yaymalar parazitlerin aranmasında ve birden fazla tür ile enfeksiyonların tanınmasında faydalı bir yöntemdir. Boyanma sırasında hemoglobin, eritrositlerden uzaklaştırıldığı (dehemoglobinizasyon) için, büyük miktarda kan hızlı ve kolay bir şekilde incelenebilir.

1. Preparat önce küçük objektif ile (x10 ya da x20 objektif) mikrofilarya gibi büyük parazitleri tespit edebilmek için taranır.
2. Daha sonra preparat immersiyon objektifi ile taranır. İyi boyanmış, boya kalıntılarının olmadığı ve yeterli çoğunlukta beyaz kan hücrelerin olduğu (10-20 beyaz kan hücresi/alan) bir alan seçilmelidir.
3. Kalın damla x100 büyüklükte incelendiğinde eritrosit, artıkları, beyaz hücreler ve trombositler görülecektir. Beyaz hücreler ve trombositler, nukleus etrafındaki sitoplazmanın görülmemesi dışında çoğunlukla ince yaymadakine benzer şekilde görülürler.
4. Eğer parazit görüldüyse, karışık enfeksiyonları dışlamak için en az 50 alan daha incelenmelidir.
5. İmmersiyon objektifi ile minimum 209 alan taranmalıdır. Bu süre deneyimli biri için yaklaşık 5-10 dk iken, alışık olmayan bir kişi için daha uzundur.

### **Negatif sonuç için**

Her biri yaklaşık 20 beyaz kan hücresi içeren, en az 100 alan incelenmelidir. Kanda ortalama 8000  $\mu$ l beyaz hücre olduğu düşünüldüğünde, duyarlılık sınırı 4 parazit/ $\mu$ l olmaktadır. NCCLS "standartlarına göre immersiyon objektifi ile en az 300 saha taranması önerilmektedir (13, 25, 34).

### **3. 8. 1. 10. İnce yaymanın incelenmesi**

İnce yayma tür identifikasyonu ve kalın damlanın kuruması beklenirken, parazitin aranmasına bir an önce başlanması yönünden faydalıdır.

1. Preparat dikkatli bir şekilde x100'lük objektif kullanılarak yaklaşık 20-40 dk (en az 30 dk) süreyle en uç kenardan başlanarak taranır.
2. Negatif sonuç vermeden, immersiyon objektifi ile x100 büyütme ile en az 200 alan incelenmelidir ve ancak bu durumda %90 duyarlılık sağlanmış olacaktır. NCCLS standartlarına göre en az 300 alanın incelenmesi önerilir (13, 25, 34).

İnce yayma ve kalın damla preparatlarının sıtma açısından karşılaştırılması

Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3.** İnce yayma ve kalın damla preparatlarının sıtma açısından karşılaştırılması (35)

ÖZELLİKLER	İNCE YAYMA KAN PREPARATI	KALIN DAMLA KAN PREPARATI
Preparat yüzeyi	250-450 mm <sup>2</sup>	50-90 mm <sup>2</sup>
Kan hacmi	1 µl	3-5 µl
Ortalama kalınlık	0.0025mm	0.06-0.09mm
100 mikroskop alanının ortalama hacmi	0.005-0.007	0.1-0.25
İncelemek için gerekli zaman	100-200 alan için 15-20 dakika	100 alan için 5 dakika
Boyanma sırasında bozulan parazitler ve lökositler	Yok	Lökositlerin % 8'i ve parazitlerin % 20'si
Eritrositler	Tespit edilmiş halde	Hemoliz olmuşlar.
Parazit yapıların morfolojik özellikleri	Bozulma yok	Bozulmuş olabilir.
Artefaktlar	Çok az görülür.	Çok görülür.



### 3. 8. 1. 11. Kan yaymalarında sıtma tanısı ve tür tayini

Sıtma parazitleri intraeritrositiktir. Enfekte hücrenin büyüklüğü ve sitoplazmik granüler türlerin ayırımında kullanılan önemli özelliklerdir (Tablo 2). Sıtma parazitleri soluk maviden koyu maviye değişen bir sitoplazma, pembe/kırmızı kromatin tanecikleri ve kahverenginden siyaha değişebilen pigmente sahiptirler. Pigmentler genç trofozoitlerden daha çok olgun formlarında görülürler. Sıtma hastalarında aynı zamanda lökositlerde de pigment vardır. Trombositler ve boya artıkları bazen eritrositler üzerinde sıtma parazitlerine benzer şekilde görülebilirler. Bu artefaktların tipik olarak etrafında soluk bir halka vardır ve parazitin çekirdek, sitoplazma ve pigmentine ait karakteristik özellikler yoktur.

Sıtma parazitleri birçok gelişme evresinden geçerler ve bu evrelerde farklı şekillerde görülürler. Ancak her evrede parazitin aynı parçası aynı renge boyanır (Şekil 10).

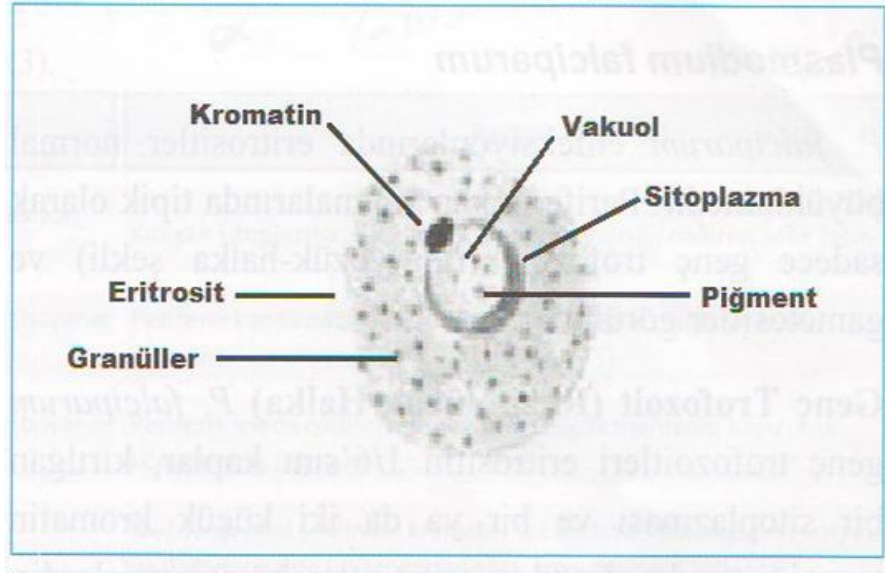
**Kromatin**, parazitin çekirdeğidir, genellikle yuvarlaktır ve parlak kırmızıya boyanır.

**Sitoplazma**, mavi boyanır, mavinin tonları türler arasında farklılık gösterir ve bazen ayırt edici bir özelliktir.

**Pigment**, parazitin büyümesiyle ortaya çıkan taneciklerdir. Kahverenginden siyaha farklı tonlarda boyanabilir. Pigmentlerin rengi ve büyüklüğü türlere göre değişiklik gösterir, ayırt edici özelliğindedir.

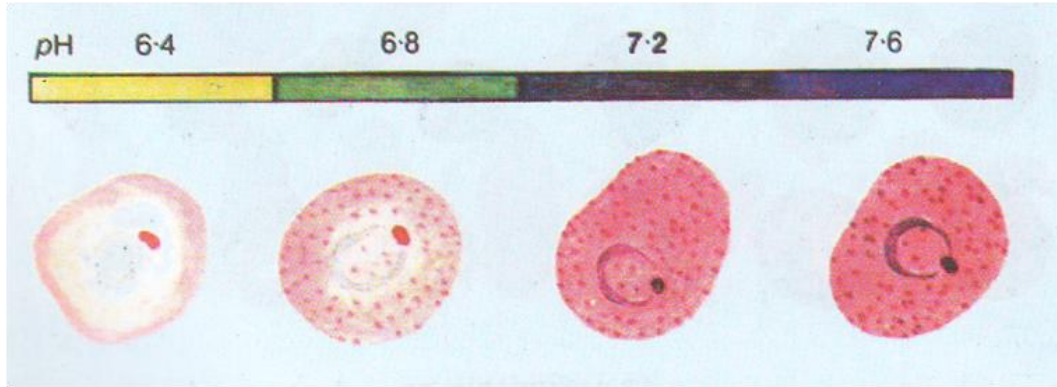
**Granüller**, tanecik, noktalanma gibi tanımlamalar kullanılır. Parazitin konak üzerine etkisiyle ortaya çıkar, iyi boyanmanın işaretidir. En iyi bilineni ve kolay tanınanı "Schüffner granülleri" pembe boyalı noktalar şeklinde enfekte eritrositi doldurmuş olarak görülür. *P. ovale* enfeksiyonlarında çok fazla tanınmayan leylak renginde "James tanecikleri" görülür. *P. falciparum* enfeksiyonlarında "Maurer tanecikleri" boyanın kalitesine bağlı olarak görülür ve kolaylıkla tanınabilir.

**Şekil 10.** Eritrosit içinde sıtma parazitlerinin parçaları



Giemsa ile boyanan bir preparatta parazitin her bir parçası ayrı bir şekilde boyanır. İyi boyanmış bir yaymada parazit ve bütün parçaları kolaylıkla ayırt edilebilir. Boyada kullanılan tamponlanmış su pH 7.2 de olmalıdır. pH'ın dengeli olması, iyi bir boya için esastır. pH'ın kararlı olmadığı bir boyada pH derecesine bağlı olarak farklı boyanma özellikleri görülür (Şekil 11).

**Şekil 11.** Parazit morfolojisi üzerinde pH'nin etkisi



### 3. 8. 1. 12. Parazit sayısının hesaplanması

Dolaşımdaki parazit sayısının bilinmesi, hastalığın kliniğini ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek için, son derece önemlidir. Parazit sayısı kırmızı ya da beyaz kan hücreleri kullanılarak hesaplanabilir (8000/ $\mu$ l beyaz küre ve 4.000.000/ $\mu$ l eritrosit olduğu kabul edilerek). Parazitemi düzeyi ya enfekte eritrosit yüzdesi olarak ya da kanın her mikrolitresindeki parazit sayısı olarak ifade edilir. *P. falciparum* enfeksiyonları dışında parazitemi nadiren %2'nin üstünde olur. Oysa *P. falciparum* sıtmasında oldukça yüksek (%50<) olabilir. *P. falciparum* sıtmasında, enfekte eritrositler doku kapillerinde tutulabilirler, bu yüzden periferik kanda düşük sayıda parazit görüleceğinden, yanlış düşük parazitemi sonucu verilebilir. Bu durumlarda parazitin gelişmiş evrelerinin kan yaymalarında görülmesi hastalığın şiddetinin anlaşılmasında parazitin sayısından daha çok yardımcıdır. Olgun parazit formlarının varlığı (geç trofozoit ve şizont %20< ise) ve nötrofillerin %5'inden fazlasının sıtma pigmenti içermesi, ilerlemiş hastalığa ve kötü prognoza işaretir.

Tedavi takibi için, genellikle tedavinin başlanmasını takiben 24, 48 ve 72. saatlerde ve bazen 1. ayda parazitemi düzeyi kontrol edilir.

### **3. 8. 1. 13. Kalın damlada parazit sayısının hesaplanması**

Kalın damlada kanın mikrolitresi başına düşen parazit sayısı lökosit sayısı ile ilişkili olarak sayılır. Toplamda 500 ya da 1000 lökosit sayılarak kanın mikrolitresi başına düşen parazit sayısı olarak ifade edilir. Kanda lökosit sayısı ortalama 8000/ $\mu$ l olarak kabul edilir (25).

$$\text{Parazit}/\mu\text{l} = \text{Parazit sayısı}/\text{Sayılan Lökosit sayısı} \times 8000$$

### **3. 8. 1. 14. İnce yaymada parazit sayısının hesaplanması**

İnce yayma preparatta, enfekte eritrosit yüzdesi, enfekte olmayan eritrosit sayısı ile ilişkili olarak tespit edilir. Toplamda incelenen 500 ya da 2000 eritrosit içindeki, parazit ile enfekte eritrositler sayılır ve sonuç parazitemi yüzdesi olarak verilir. Kandaki eritrosit sayısı ortalama 4.000.000/ $\mu$ l olarak kabul edilir (25).

$$\text{Enfekte eritrosit yüzdesi} = (\text{enfekte eritrosit sayısı} / \text{sayılan total eritrosit sayısı}) \times 100$$

### **3. 8 . 2. Nükleik asitleri boyayan floresan boyalar ile tanı**

#### **3. 8. 2. 1. Kawamoto tekniği**

Lam yüzeyindeki yaymalar akridin oranj ile boyanıp floresan mikroskobu veya özel filtreli ışık mikroskobunda incelenir. Çekirdek DNA'sı

yeşil, sitoplazmik RNA kırmızı renkte boyanarak parazitin tanınmasını sağlar (34, 36).

### **3. 8. 2. 2. Niceliksel sarımsı katman sistemi**

#### **(Quantitative Buffy Coat, QBC™; Becton Dickinson)**

Kan, akridin oranj ve antikoagülan içeren özel tüpe alınıp santrifüjlenir. Daha sonra tüp, özel bir tutucuya yerleştirilerek floresan mikroskobu veya özel filtreli ışık mikroskobunda incelenir. *Plasmodium*'lar tüpteki granülosit tabakasının altında birikir (34). Bazı laboratuvarlar, pozitif sonuçları mutlaka kalın damla/ince yayma ile destekleyerek tarama testi olarak kullanırlar.

### **3. 8. 3. Kültür yöntemleri**

*Plasmodium*'ların sivrisinekte seksüel ve insanlarda aseksüel üreme ile karakterize karışık ve kompleks bir hayat döngüsü vardır (37). Sivrisinekte geçen hayat döngüsü sporogonik fazdır ve bu faz sonunda oluşan sporozoitler, vektör olan sivrisineklerin sokmalarıyla omurgalı konaklara geçerler. Omurgalı konakta sporozoitler ekstraeritrositik ve intraeritrositik şizogonik faza girerler. Parazit sporogonik dönemde ekstraselüler, şizogonik dönemde intraselülerdir. Parazitin in vitro kültürü sivrisinekte ekstraselüler sporogoni, insanda eritrositer ve eritrosit dışı şizogoni dönemlerinin benzerlerinin oluşturulması gerektiğinden oldukça karmaşık ve zordur. Az ya da çok ölçüde insanları enfekte eden, 4 Plasmodim türünün kültürü yapılabilmektedir. Ancak kültürde tüm yaşam döngüleri kurulmuş tek tür *P. falciparum*'dur (38). *Plasmodium* türleri arasında farklılıklar vardır. Bazı suşlar kolaylıkla in vitro üretilirken, bazıları kültürde üremeye dirençlidirler. İzolatlar, kültürde değişikliğe uğrarlar. *P. falciparum*' da

örneğin yeni kültürlerde gametosit oluşumu tipiktir, fakat uzamış kültürlerde bu kaybolur (39).

### 3. 8. 3. 1. Ekstraeritrositer evre

Sporozoitler kan dolaşımına geçmelerinden hemen sonra karaciğer hücrelerini istila ederler. *P. falciparum* sporozoitleri muhtemelen ilk olarak Kupffer hücreleri tarafından alınır. Mazier ve ark. (40) karaciğer biyopsi örneklerinden "minimal essential medium" (MEM) içinde hazırladıkları hepatositleri *P. falciparum* sporozoitleri ile başarıyla enfekte ettiklerini immüfloresan boyalar ile boyayarak göstermişlerdir. Daha sonra sporozoitler kültür plağında şizontlara dönüştürülmüştür. Enfekte hepatosit kültürlerine insan eritrositlerinin eklenmesiyle, eritrositleri enfekte eden merozoitlerin üremesi gösterilmiş ve eritrositler içinde halka-yüzük dönemi şekilleri oluşmuştur. Calvo-Calle ve ark. (41) *P. falciparum*'un insan karaciğer hücreleri huH-1 ve huH-2 içinde daha iyi geliştiğini gözlemlemişlerdir. Farklı bir insan karaciğer hücresi olan HHS-102 *P. falciparum*'un karaciğer evresinin gelişimini ve eritrositlerin eklenmesiyle halka (genç trofozoit) döneminin oluşmasını kolaylaştırmıştır (42). Primer insan hepatositlerinde *P. ovale*'nin eritrosit dışı döneminin dönüşüm ve olgunlaşmasını başarıyla tamamlanmıştır. Ancak diğer tip hücreler (HepG2) ve rat hepatositlerinde sadece dönüşüm tamamlanmıştır (43). *P. malaria*'nın karaciğer gelişim dönemleri şempanze hepatositlerinde üretilmiştir (44).

### 3. 8. 3. 2. Eritrositer evre

Aşı geliştirilmesi ve sıtma patogenezinin anlaşılması ile de ilgili olarak, en büyük emek ve zaman *Plasmodium* 'ların eritrositer dönemlerinin kültürünün yapılmasına harcanmıştır. Bu alandaki en büyük başarı *P. falciparum*'un devamlı kültürü için in vitro koşulların belirlenmiş olmasıdır. Bu Trager ve Jensen (45) tarafından HEPES ile tamponlanmış RPMI 1640, insan serumu, eritrositi ve sodyum bikarbonat ile desteklenmiş lökositlerin in vitro ekimi için geliştirilmiş bir doku kültür ortamı kullanılarak başarılmıştır. Parazitler başlangıçta petri plaklarında kültüre edilmişlerdir. Plaklar ya %3 CO<sub>2</sub>-%17 O<sub>2</sub> ya da %7 CO<sub>2</sub>-%1 O<sub>2</sub>-%92 N<sub>2</sub> İçeren ortamlara konur. Bu ortamları sağlayan sürekli belli oranlarda gazları veren cihazların yanında kültür süspansiyonlarında son zamanlarda geliştirilmiştir (46).

### 3. 8. 3. 3. Temel kültür ortamı

Doku kültür ortamı RPMI 1640 tüm *Plasmodium* türleri için seçilecek en iyi kültür ortamıdır. RPMI 1640 içine hipoksantin, glikoz, kalsiyum pantotenat, çeşitli amino asitler (sistin, glutamin, izolösin, metionin, prolin ve trozin), riboflavin, nikotinamid, pridoksin, tiamin gibi vitaminler eklenerek *Plasmodium*'lar için en uygun üretme ortamı sağlanır (47, 48).

### 3. 8. 3. 4. Kültür sisteminde eritrositlerin yeri

Kırmızı kan hücreleri parazitin gelişiminde olmazsa olmazdır. Eritrositler parazitin gelişimindeki konumları dışında, parazit için besin kaynağıdır. Tüm insan kan grupları *P. falciparum* üremesi için uygundur. O grubu kan hücreleri, diğer kan gruplarının serum/plasması ile uyumlu olduğu

için daha çok tercih edilir (49). AB kan grubundan elde edilen serum diğer tüm grupların kan hücreleri ile uyumludur.

### **3. 8. 3. 5. Kültür sistemi**

Kültür plakları %5 hematokrit ve %1 parazitemi ile hazırlanır. Daha sonra *in vitro* hızlı parazit sayısının artacağı düşünülerek, her zaman başlangıçta düşük parazitemi ile başlanmalıdır. Trager %0,1 parazitemi ile başladığı kültürlerde parazit sayısının 20-50 kat arttığını bildirmiştir. Kültürlerin parazitemi düzeyi %20 arttığında, yaklaşık her 8 saatte bir yeni kültür ortamlarıyla değiştirilmelidir (50). Parazitemi düzeyi Giemsa boyalı yaymalar hazırlanıp, mikroskopik olarak enfekte eritrositler sayılarak yapılmaktadır.

Kullanılan *in vitro* üreme sistemleri *P. falciparum* için çok iyi çalışmasına rağmen, *P. vivax* için çok uyumlu değildir. *P. vivax* şizogonik evresi için SCMI 612 mediumun RPMI 1640 dan daha iyi çalıştığı bildirilmiştir (51). *P. vivax* için çok daha yüksek düzeylerde glikoz (3mg/ml) ihtiyacının olduğu belirtilmiştir. *P. falciparum*'un aksine *P. vivax* gelişmek için, gelişmekte olan eritrositleri (retikülositleri) tercih eder. Bu yüzden *P. vivax* kültürünün devamı için mutlaka kültür ortamına sürekli olarak bol miktarda retikülosit eklenmelidir.

### **3. 8. 4. Antikor saptayan yöntemler**

Serolojik olarak, sıtma parazitine karşı oluşmuş antikorlar İFA ya da ELISA yöntemiyle saptanabilir. Seroloji mevcut enfeksiyondan ziyade geçmişte enfeksiyon etkeniyle karşılaşmış olma durumunu saptamaya yarar. Özellikle eritrositer şizogoni döneminde parazitlere karşı oluşan IgM ve IgG antikorları gösterilebilir. Antikor arama temeline dayalı yöntemlerin başlıca sorunu



kullanılan antijenlerin standardizasyonudur. Rutin tanıda pek tercih edilmezler; ancak transfüzyona bağlı sıtmada ve retrospektif araştırmalarda fayda sağlayabilirler.

### 3. 8. 4. 1. İndirek fluoresan antikor testi

Sıtma antikorunun tespiti için kullanılan başlıca serolojik yöntemlerden biridir. Serolojik testlerin, antikor oluşması için belli bir süre gerekmesi ve antikorların uzun süreler kanda bulunması gibi nedenlerle akut sıtma tanısında kullanılması pratik değildir. Ancak antikor tespitinin yapılması řu durumlarda faydalı olabilir:

- Kan donörlerinin taranmasında (özellikle parazitemi düzeyi tespit edilebilme seviyesinin altında olan kan bağışçılarında)
- Endemik bölgede yaşayan, tekrarlayan ya da kronik sıtma (tropikal splenomegali sendromu) enfeksiyonlu kişilerde
- Yakın zamanda sıtma şüphesiyle sıtma tedavisi alan, ancak tanısı kesin olmayan kişilerde
- Yaymaları negatif olup sıtma şüphesi olan ateşli kişilerde

Türe spesifik testler üç tür için mevcuttur: *P. falciparum*, *P. vivax* ve *P. malaria*, *P. ovale* için antijen her zaman hazır olmadığından antikor testi rutin olarak yapılmaz. Çapraz reaksiyon *Plasmodium* türleri ve *Babesia* türleri arasında sıklıkla olur. *Plasmodium*'ların eritrositer evreleri, şizontlar (meront) genellikle antijen olarak kullanılır. Sıtma parazitleri ile karşılaşmış hastanın serumunda oluşmuş homolog antikorlar, antijen ile reaksiyona girerek antijen-antikor (Ag-Ak) kompleksi oluşacaktır. Floresan işaretli konjuge (*Anti-human*

antikor) eklendiğinde, hastanın sıtma-spesifik antikoruna bağlanır. Preparat floresan mikroskop ile incelendiğinde parazit elma yeşili refle veriyorsa pozitif olarak değerlendirilir (52).

#### **3. 8. 4. 2. ELISA testi**

ELISA kan donörlerinin taramasında kullanılmaktadır, ancak sensitivitesi sadece *P. falciparum* antijeni kullanılması nedeniyle sınırlıdır (53). Araştırma amaçlı yapılan çeşitli çalışmalarda parazitin farklı proteinleri antijen olarak kullanılmıştır.

#### **3. 8. 5. Antijen saptayan yöntemler**

Sıtma parazitlerinin antijenlerini tespit etmeye yarayan hızlı tanı testleri geliştirilmiştir. Bu testler immunokromatografik yöntemler kullanarak sıtma antijenlerini kanda tespit etme temeline dayanır. Bu hızlı tanı testleri (HTT), "Rapid Diagnostic Tests" (RDT), güvenilir mikroskopik tanının olmadığı durumlarda hızlı bir şekilde sıtma tanısı koymak için faydalı bir alternatiftir (54). FDA ilk defa 2007 yılında HTT'lerin Amerika'da kullanılmasını onaylamıştır. Sıklıkla hedef antijene karşı monoklonal antikor kaplanmış dipstik, kaset, kart test ya da strip test şeklindedir. Yaklaşık 2-15 dakika gibi oldukça kısa sürede sonuç verirler. Çok sayıda ticari test kiti piyasada bulunmaktadır. Bu alan hızla gelişmekte ve teknik gelişmeler HTT'lerin sıtma tanısında kapasitelerinin ve önemlerinin giderek artacağını göstermektedir (55).

*P. falciparum*'da bulunan histidinden zengin protein II (*Histidine rich protein-II-HRP-II*) ya da tüm *Plasmodium* türlerinde bulunan tür spesifik *Plasmodium*

laktat dehidrogenaz veya aldolaz antijenini enzimatik aktivite ya da immunoassay yoluyla saptarlar (56, 57). HRP-II antijenleri, *P. falciparum* trofozoit ve genç (immatür) gametositleri tarafından üretilen suda çözünen bir proteindir ve periferik kanda bulunur. *P. falciparum* HRP-II'yi tespit eden ticari kitler vardır. Bazı kitlerde (Pafasight F™, Macro-Mal™) sadece HRP-II saptandığından yalnızca *P. falciparum* tanısı verilebilir. Tedaviyi izleyen iki hafta süresince bu testler pozitif kalabilir.

*Plasmodium* laktat dehidrogenaz (pLDH) aseksüel ve seksüel (gametosit) sıtma parazitleri tarafından üretilir. Mevcut testler insanı enfekte eden 4 *Plasmodium* türünü tespit eder. Bu testler (optiMal™) *P. falciparum*'u diğer türlerden ayırt ederler fakat *P. vivax*, *P. ovale* ve *P. malaria* türlerini birbirlerinden ayırt etmezler. pLDH antijenini saptayan testler tedaviyi izleyen dönemde pozitif sonuç vermezler (58).

Bazı testlerde 4 türden salınan diğer antijenler hedeflenmiştir. *P. falciparum*'u HRP-II antijeni ile birlikte diğer türlerin henüz belirlenmemiş "pan malaryal" antijenlerini de tespit eder.

Düşük düzey parazitemi (<200 parazit µl) ve matür gametosit varlığı gibi bazı durumlarda duyarlılıkları düşüktür. Bu nedenle düşük düzey parazitemi varlığında kullanımları fazla önerilmemektedir. Diğer enfeksiyon ajanlarla çapraz reaksiyon ya da romatoid faktör, anti-nükleer antikor, heterofil antikor gibi immünolojik faktörlerin varlığında yalancı pozitiflik izlenebilir (56).

### 3. 8. 6. Moleküler tanı yöntemleri

Son yıllarda enfeksiyon ajanlarının saptanmasında moleküler tanı yöntemleri önemli bir yer almaktadır. Bu teknikler önceleri yavaş bir şekilde gelişmeye başlamakla beraber sonraları bu konudaki ilerlemeler hızlanmış, moleküler tanı yöntemleri paraziter hastalıkların saptanmasında, epidemiyolojik çalışmalarda, paraziter hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler tekniklerin başlıca avantajı patojenlerin saptanmasındaki duyarlılığı ve organizmanın tanımlanmasındaki kesinliğidir. Direkt mikroskopi de parazitlerin saptanmasında ve morfolojik yapılarına göre türlerin tanımlanmasında yeterli olmakla beraber bu durum genelde parazit miktarının yüksek olduğu durumlar için geçerlidir. Oysa parazit miktarının düşük olduğu durumlarda tanısız test olarak moleküler yöntemlerin kullanılmasında büyük yarar vardır (59).

Franzen ve ark. ilk defa 1984 yılında sıtma tanısında kullanılan DNA hibridizasyon yöntemini bildirmişlerdir (60).

Sıtma parazitlerinin tanısı için 18S rRNA gen bölgesini hedefleyen özel primerler geliştirilmiştir (61, 62).

Snounou ve ark. organik DNA ekstraksiyonundan sonra agaroz jel elektroforezi uygulayarak *Plasmodium* DNA'sını tespit edip, 0.01–11 parazit/μl yoğunluktaki parazit yükünü saptayabilen Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemleri geliştirmişlerdir (63).

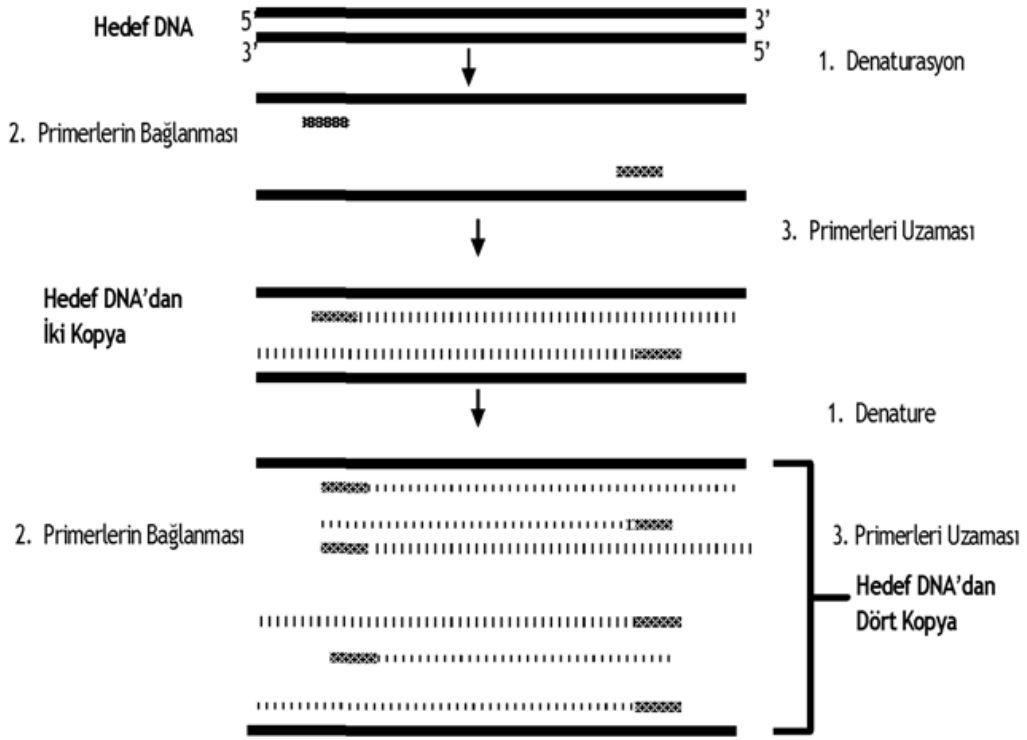
#### 3. 8. 6. 1. Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR, parazit genetik materyalinin çok küçük miktarı kullanılarak, araştırılacak gen bölgesinin çoğaltılmasını sağlayarak, büyük çaplı epidemiyolojik çalışmaların yapılmasını kolaylaştırmıştır. Parazitolojide PCR;

- Parazit genotipi ile direnç arasındaki ilişkinin saptanması,
- Kullanılan moleküler belirteçlerin prevalansının ölçülmesi,
- Duyarlı ve dirençli suşlar arasında farklılıkları ortaya koyması
- Mevcut parazit popülasyonundaki dirençle ilgili polimorfizm sayısının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (64).
- PCR'nin düşük parazit yükü bulunan kronik ve sıklıkla asemptomatik olan enfeksiyonların tanısındaki önemli değeri ortadadır (60). Bu karmaşık yöntemlere ilaveten *P. falciparum*'un tespiti için oldukça basit ve duyarlılığı yüksek olan nested PCR geliştirilmiştir. Bu yöntemle parmak ucundan alınan 10 µl'lik bir kan örneği içinde 13 parazit gibi parazitemisi %0.000026) olan vakalarda dahi parazit yoğunluğu tespit edilebilmiştir (65).

PCR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test tüp sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak çoğaltılmasını sağlar. Bu yöntemin uygulanabilmesi için yok denecek kadar az DNA yeterlidir. PCR'de bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanabilecek olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq polimeraz, DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. PCR reaksiyonunda üç temel aşama vardır ve bu üç temel aşamaya bir döngü (siklus) denir (Şekil 12).

Şekil 12. PCR ile amplifikasyon



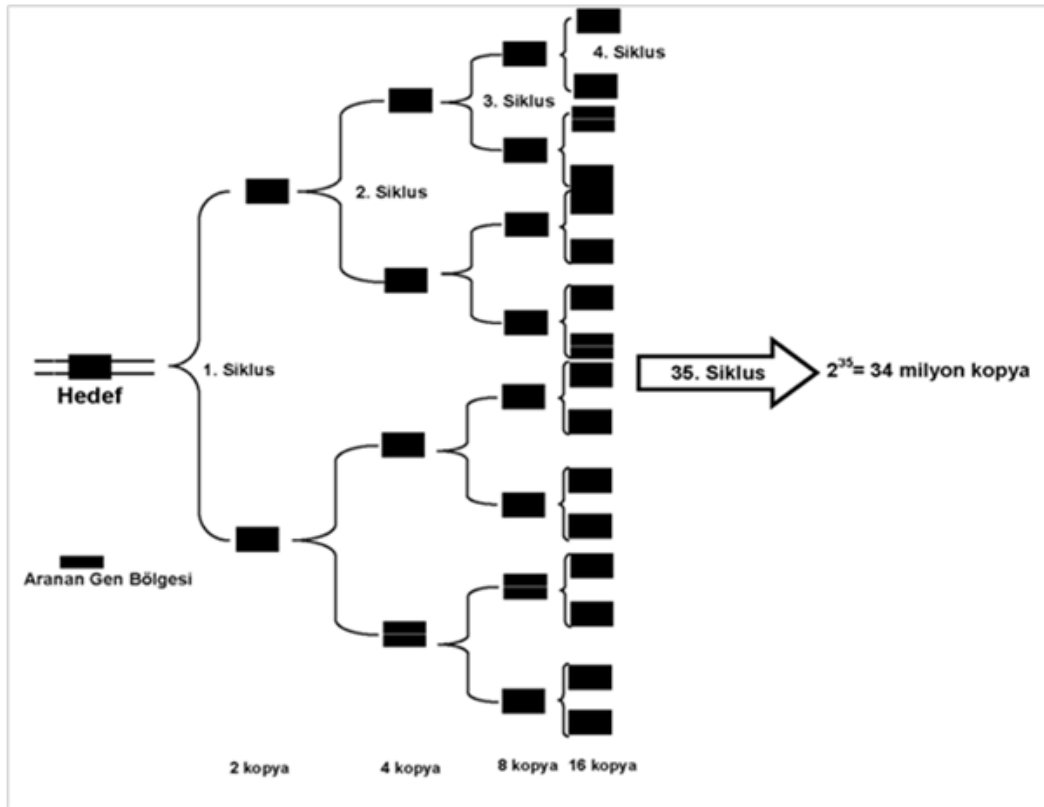
**1) Denatürasyon:** Çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir.

Bu DNA steril olmak zorunda değildir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. (94–96°C’de birkaç dakika). Bu süreçte enzimler çalışmaz.

**2) Bağlanma (Annealing):** Sıcaklık 50–65°C’ye düşürülür ve primerlerin tek zincirli DNA’ya bağlanması sağlanır. Bu süreçte tek zincirli primer ile tek zincirli kalıp DNA arasında hidrojen bağları oluşur. Kararlı bağlar oluştuğunda polimeraz nükleotidleri eklemek üzere bağlanır. Bu primerler 15–30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir. Primerler çoğaltılacak olan DNA dizisinin uçlarındaki tamamlayıcı baz dizisine özgün olarak bağlanır. Bu primerler kalıp DNA’nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. Yaklaşık 20 bp uzunluğunda primerlerin kullanılması durumunda bağlanma ısısı olarak 54°C’nin belirlenmesi optimal sonuçları vermektedir.

**3) Uzama (Extension):** Isı 65–72°C'ye getirilir ve birkaç dakika beklenir. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq polimeraz, nükleotitleri 5'→3' yönünde ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur. Doğru pozisyon almamış primerler ve kalıp DNA arasındaki bağlar bu ısıda ayrılırlar. PCR bir zincir reaksiyonudur; çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Sonuçta 25–30 döngü takibinde DNA miktarında yaklaşık 1 milyon kez artış olur (Şekil 13).

**Şekil 13.** PCR'nin tamamlanmış amplifikasyon siklusu



Bu yöntem ile bol miktarda hedef DNA fragmentleri elde edilir. Amplifikasyondan sonra PCR ürünleri genellikle jel üzerindeki kuyucuklara yüklenir ve daha sonra elektroforeze tabi tutulur.

### 3. 8. 6. 2. Nested PCR

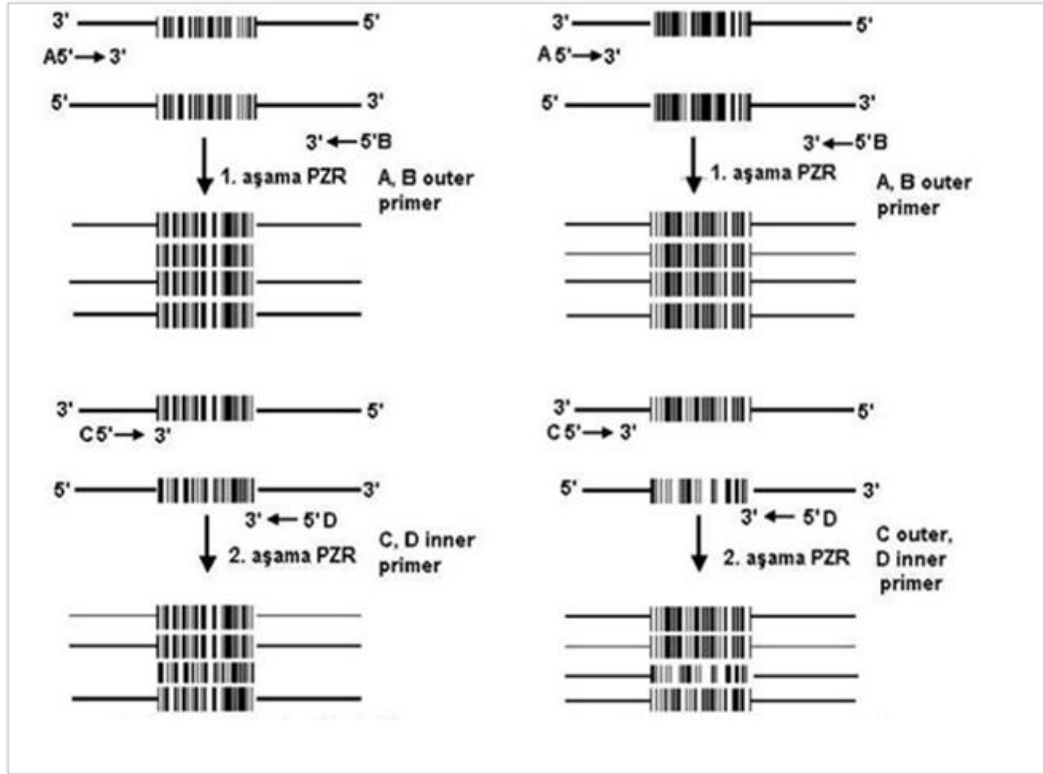
İki aşamalı amplifikasyon yöntemleridir. "Nested" PCR'de, ilk aşamada iki adet dış (outer) primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır (15-30 siklus). Sonra bu amplifikasyon tüpünden alınan örnekteki DNA'nın daha kısa bir bölümü iç (inner) primerlerle çoğaltılmaktadır (15-30 siklus). "Inner" primer, "outer" primerlerin bağlanma yerlerinin iç kısmında kalan, kendilerine özgül yerlerine tutunmaktadırlar . "Semi-nested PCR'de ise ikinci aşamada kullanılan primerlerden biri içerden (inner), diğeri "outer" primerle aynı yerden başlamaktadır. Örnekte tek bir hedef DNA molekül bulursa bile, iki aşamalı olarak yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır (Şekil 14). Bugün için *Plasmodium*'ların tanısında normal PCR'ye ilaveten nested PCR, seminested PCR, multipleks PCR ve real-time PCR metodları da başarıyla kullanılmaktadır.

*Plasmodium*'un saptanması ve türlerine ayrılması Snounou ve ark. tarafından üretilen primerlerin kullanılmasıyla iki aşamalı Nested PCR yöntemi kullanılarak yapılmaktadır. Birinci aşamada (PCR 1) 1 µl ekstrakte *Plasmodium* DNA genus spesifik primerler (rPLU1, rPLU3) kullanılarak amplifiye edilmektedir; ikinci aşamada 1 µl PCR 1 amplifikasyon ürünü parazit türünün bulunduğu türe spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmektedir. Nested PCR protokolu çalışma ayrıntıları Şekil 14'te verilmiştir. On µl PCR 2 DNA ürünü %2 agaroz jele dağıtılır. 15 dakika etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV ilüminasyon ile görüntülenir. Bir spesifik PCR ürünü, reaksiyonda bulunan ilgili türlerin DNA'sından sadece elde edilebilir. Yalnız insan DNA'sıyla amplifikasyon reaksiyonu gözlenmez. Her türe ait spesifik PCR ürünü uzunlukları



farklılık gösterir. *P. falciparum* için 205 bp, *P. vivax* için 120 bp, *P. malaria* için 144 bp, *P. ovale* için 800 bp'dir (Şekil 15). Birinci amplifikasyon ürünüyle karşılaştırıldığında her fragmanın 1.2 kb olduğu gözlenir (63).

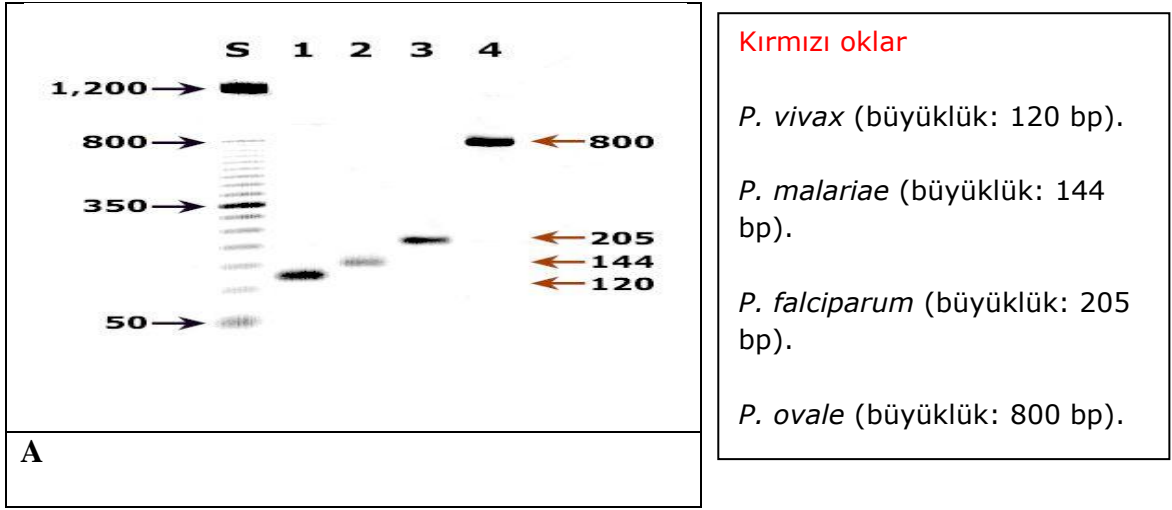
**Şekil 14.** Sırasıyla nested PCR ve semi-nested PCR amplifikasyonu



### 3. 8. 6. 3. PCR ve PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Klinik örneklerde belli bir nükleik asit konsantrasyonu genellikle sınırlı olduğundan, çoğu tanı yönteminde mutasyon belirlenmesinden önce nükleik asit çoğaltma işlemi uygulanmaktadır. İyi tanımlanmış hedef dizilerin çoğaltılması, mutasyon belirleme yaklaşımlarının özgüllüğünü de artırmaktadır. En basit yaklaşım nükleik asit çoğaltılmasını takiben endonükleazlarla uygulanan RFLP analizi ile DNA parçalarının agaroz jel elektroforezinde ayrımının birlikte

**Şekil 15. A:** Agaroz jel gel (2%) türe özgü *Plasmodium* DNA'sının PCR ile analiz edilmesi. Snounou tarafından yapılan primerler kullanılmıştır (63).



kullanımı olmaktadır. Açıklayıcı dizi bilgisi sağlaması ve bilinmeyen polimorfizm ve mutasyonların belirlenmesinde bugün için “altın standart” ise nükleik asit dizi analizidir. Laboratuvarların kendi donanımına göre mutasyon taraması için uygun olan yöntemi seçmesi önem taşımaktadır. Allel-spesifik PCR ve PCR-RFLP daha kolaylıkla uygulanabilirken, DNA dizi analizi için laboratuvar ortamında daha üst düzey bir teknik donanım bulunması gerekmektedir. Kullanılacak yöntemde, hedef dizilerin karmaşıklığına göre de karar vermek gerekebilir. Klinik açıdan PCR-RFLP, tek nükleotid polimorfizmi (TNP, Single nucleotid polymorphism SNP) saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. DNA çoğaltılmasının ardından bir PCR ürününün restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi jel elektroforezi ile ayrılabilen bir kaç fragman oluşturabilir ve elde edilen ürünlerin büyüklüğüne göre belli profiller ortaya konabilmektedir. Mutasyonlar kesim bölgesini değiştiriyorsa endonükleaz bu bölgeyi tanımayacak ve o noktada DNA'yı kesmeyecektir. Sonuçta farklı büyüklüklerde kesilmiş fragmanlar ortaya çıkmakta ve kesilmiş fragmanların

uzunluk polimorfizmi profilinde değişiklikler oluşmaktadır. Bu yöntemin uygulanması göreceli olarak kolay olmakla birlikte, uygulanması uzun zaman almaktadır. Sonuçların güvenilirliği, kesim enziminin aktivitesi ile ilgili yeterli kalite kontrollerinin yapılmış olmasını gerektirmektedir. Aynı zamanda, bu yöntem için hedef bölgede özgün mutasyonların belirlenmesini sağlayacak uygun kesim enzimlerinin bulunması gerekmektedir. Birkaç varyantı farklı miktarlarda içeren karışık dizilerin, bu yöntemle belirlenmesi genellikle karmaşık olup, azınlıkta kalan varyantların belirlenmesinde duyarlılığının düşük olduğu belirtilmiştir.

#### **3. 8. 6. 4. Restriksiyon endonükleazlar**

Restriksiyon endonükleaz enzimleri, kısa DNA dizilerini spesifik olarak tanıyarak, bu dizilimler içindeki bölgelerden veya bu dizilimlere yakın bölgelerden DNA'yı kesen yapılar olarak tanımlanmaktadır. Restriksiyon endonükleazlar çift zincirli DNA'daki iç fosfat bağlarını rastgele kıran endonükleazlardan (DNaz, fosfodiesteraz) farklı olarak 4, 6 ve 8 nükleotidden oluşan ve çoğunlukla genomda iki yönlü simetri oluşturan palindromik bölgelerdeki (tersten ve düzden okunuşu karşılıklı her iki iplikte de aynı olan) baz dizilerini tanıyıp, kesen endonükleaz yapısı içermektedirler (66). Günümüzde 400'e yakın farklı bakteri genomundan elde edilen ve DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 4000'den fazla restriksiyon enzimlerinin varlığından söz edilmektedir (67, 68, 69). Restriksiyon enzimlerinin çok büyük bir kısmı prokaryotlardan, çok az bir kısmı da ökaryotlardan izole edilmiştir. Restriksiyon enzimlerine ait genler kromozom veya plazmid DNA'sı üzerinde modifikasyon genleri ile beraber

bulunmaktadırlar (67). Bu iki genin yakın bulunması nedeniyle oluşan sistem restriksiyon ve modifikasyon sistemi olarak adlandırılmaktadır (66, 70, 71).

### **3. 8. 6. 5. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı yerler**

Rekombinat DNA teknolojisi 1970'li yıllardan sonra restriksiyon endonükleaz kullanımına bağlı olarak hızla gelişmeye başlamış ve özellikle klonlama çalışmaları yapan araştırma laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmıştır. Bu gelişme ile seçilen genin çoğaltılması, genin kodladığı proteinin üretilmesi, DNA dizisinin belirlenmesini mümkün hale getirmiştir. Ayrıca çeşitli organizma DNA'larının özel restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmesi sonucunda, türlere ve hatta bazen suşlara özgü farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşması ile karakterize DNA modelleri elde edilmiştir. Bu amaçla restriksiyon enzim analizleri kullanılarak yapılan birden fazla tiplendirme metodu bulunmaktadır. Bunlar, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Pulsed field Gel Electrophoresis (PFGE), Random amplified polymorphic DNA (RAPD) gibi yöntemler olup rutin kullanımda hızlıca yerlerini almışlardır. RFLP yönteminin tüm DNA zinciri hedef alınarak kullanılmasının yanında, bir DNA dizisi hedef alınarak, PCR yöntemiyle çoğaltılıp restriksiyon enzimleri ile keserek daha keskin rezolusyonlu bantlar elde etmek mümkün olabilmektedir. Özellikle tür düzeyinde tanı koyabilmek amacıyla bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak restriksiyon endonükleazlar popülasyon polimorfizminin analizinde, DNA haritalarının çıkartılması ve DNA molekülünün yeniden düzenlenmesinde, problemlerin hazırlanmasında ve mutant organizmaların meydana getirilmesinde kullanılmaktadır (67, 72, 73, 74, 75).

### **3. 8. 6. 6. PVCS gen bölgesinin kullanılmasıyla *Plasmodium vivax* genotiplemesi**

Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda, *Plasmodium vivax*'ın 4 polimorfik geni: Bir gametosit antijenini kodlayan *Pvgam1* geni, circumsporozoite proteini kodlayan *Pvcs* geni, 1 ve 3 alfa merozoit yüzey proteinlerini kodlayan *Pvmsp1* ve *Pvmsp3a* genleri *P. vivax*'ın genotiplemesinde bağımsız olarak kullanılmaktadır.

### **3. 9. Korunma**

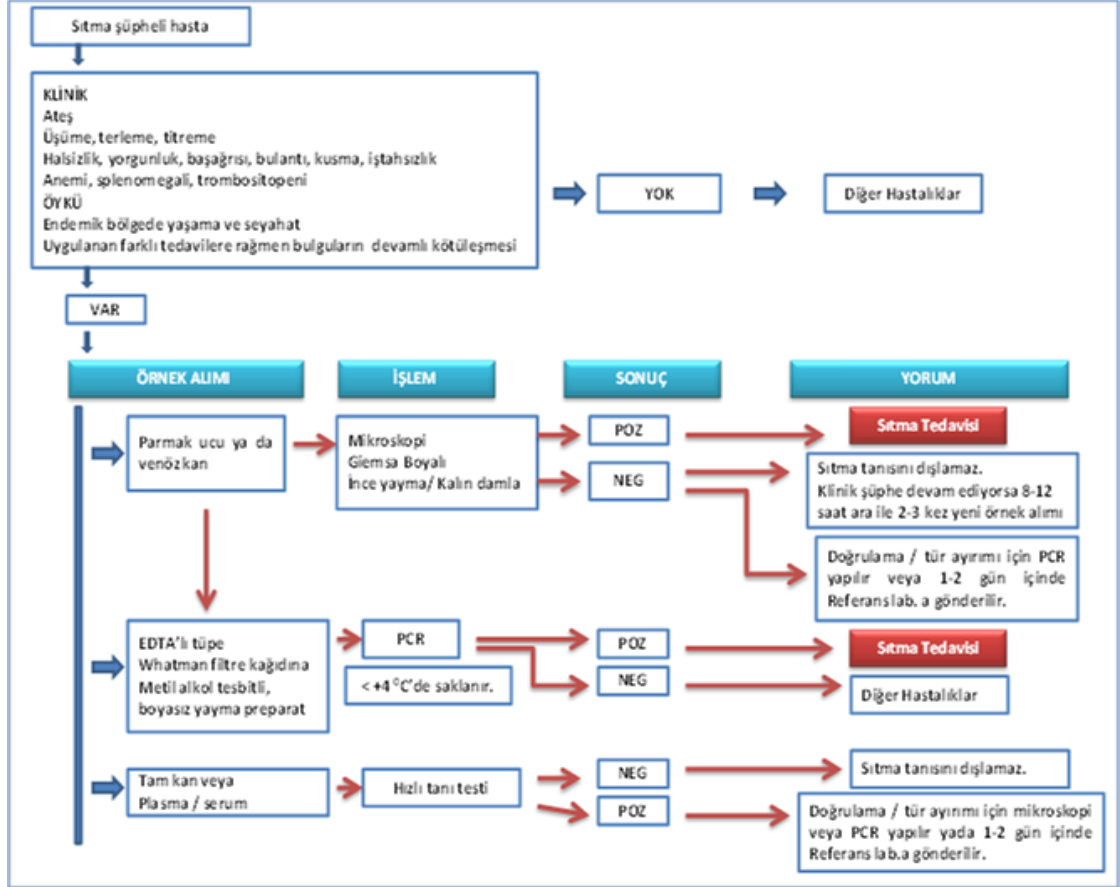
Hastaların tedavisi yanında sağlam şahısları korumak da önemlidir. Bunun için bulaşmayı ve hastalığı önlemek gerekir.

Sıtma ile mücadelede alınacak önlemler şunlardır:

1. Kitlesel taramalar yapılarak sıtmalılar saptanmalı, sıtmanın kuluçka dönemi araştırılmalı, hastaların çevresi ile ilgili tüm bilgiler kaydedilerek tedavisi yapılmalıdır.
2. Halkın eğitime önem verilmeli, hastalar hiç olmazsa doktor kontrolünden geçirilmeli ve ilaçlamada iş birliği sağlanmalıdır.
3. Gecekondulaşma önlenmelidir.
4. Sivrisineklerin erişkinleri ile mücadele edilmeli;
  - a. İnsektisitlerle (D.D.T., Malation., temephos. fenitritation ve propoxur) yapılmalıdır. Sivrisineklerin insektisitlere direnç kazanmaları durumunda ilaç değiştirilmelidir.
  - b. Şahsi korunma (Cibinlik, pencerelere tel ve sinek kaçıracı ilaçlarla) sağlanmalıdır.
5. Larvalarla mücadele edilmeli;

## Tanısal Yaklaşım

Şekil 16 . Tanısal algoritma (25)



a. Sivrisinek üreme yerleri saptanmalı (Kuyular, foseptik çukurlar, havuzlar, su birikintileri, durgun su kanal ve kanaletleri),

b. Çevre düzenlemesi yapılmalı

6. Türkiye'de sıtma savaşında elde edilen başarıların olmasına rağmen, günümüzde hala sıtma olgularının görülmesi, bazı bölgelerin endemik olması, zaman zaman sıtma olgularının azalıp çoğalması nedenleriyle, sıtma mücadelesine ayrılan personelin ve bütçenin aynı oranda korunması ve devam ettirilmesi gerekmektedir.

7. Sıtma savaşında, Sağlık Bakanlığı, üniversiteler, yerel yönetimler ve Milli Eğitim Bakanlığı gibi diğer kurumlar ile işbirliği sağlanmalıdır.

### **3. 10. Amaç**

Sıtma, dünyada ve Türkiye’de önemli bir halk sağlığı sorunudur. Nüfus hareketleri, küreselleşmeye bağlı sağlık sistemlerinde yapılan değişiklikler, savaşlar, iç ve dış göçler nedeniyle sıtma parazitini taşıyan insanların hastalığı diğer bölgelere taşınmaları, vektör olan Anofel türü sivrisineklerin sulama projeleriyle çoğalma alanlarının artması ve insektisitlere direnç gibi nedenlerle sıtmanın önemini koruması ve görülme sıklığının artması beklenmektedir (6).

Türkiye’de, İkinci Dünya Savaşı sonrasında (1950–1975) Sıtma Savaş Programının etkili bir biçimde yürütülmesi sonucu kontrol altına alınan sıtma, sağlık sisteminin değişmesi, sıtma personelinin diğer alanlara kaydırılarak Sıtma Savaş Örgütü’nün dağıtılması, hizmet içi eğitimlerin yapılmaması, sağlık personelinin ders programlarında yeterli yer ayrılmamasına bağlı sıtmaya olan ilgi ve bilgisinin eksilmesi, halkın sıtmayı unutmaya başlamış olması, sivrisineklerin direnç kazanması, sulu tarıma geçiş gibi nedenlerle sıtma olguları tekrar artmaya başlamış ve ülke düzeyinde epidemiler gözlenmiştir. Bu değişimler sonucu olarak 1977 yılında, sıtma olgusu sayısı 115.512’ye ulaşmıştır. 1994 yılında 84.345’e ulaşan olgu sayısı ile ikinci büyük epidemiyi Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde meydana gelmiştir (12). Sürveyans bilgileri değerlendirildiğinde sıtma insidansının son on yılda düştüğü görülmektedir. Düşüşün temel nedeninin 2005’te onaylanan Taşkent Deklarasyonuna göre güçlü siyasi kararlılık gösterilerek sıtma kontrol çalışmalarının yoğunlaşmasıdır (17).

Türkiye’de, sıtma savaşında elde edilen başarıların olmasına rağmen, günümüzde hala sıtma olgularının görülmesi, bazı bölgelerin özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nin endemik olması, zaman zaman sıtma olgularının azalıp çoğalması nedenleriyle, sıtma mücadelesinin sürekliliğinin sağlanması gerekir.

Sıtma kontrolünün ilk adımı erken tanı ve tedavidir. Bu nedenle olgunun bir sağlık merkezine başvurması ve hızlı bir şekilde tanısının konulması gereklidir. Ayrıca erken, hızlı tanı ve etkili tedavi, sıtma morbiditesi ve mortalitesini azaltmada anahtar rol oynamaktadır. GAP nedeniyle sulu tarım şehri haline gelen ve iklim değişikliğinin yaşandığı Şanlıurfa’ya göçer tarım işçisi gelmesinin yanı sıra, bölgeden Türkiye’nin çeşitli illerine tarım işçisi gitmektedir. Komşu ülkelerde de sıtma olguları görülmektedir. Bu da sıtma transmisyonuna zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle, sıtmanın endemik olduğu Şanlıurfa’da sıtmanın erken, hızlı ve doğru tanısı bir zorunluluktur. Sıtmanın tanısında altın standart olarak kabul edilen mikroskopik tanı, türlerin tanımlanmasında, miks enfeksiyonların saptanmasında, parazit miktarının düşük olduğu durumlarda, anti-malaryal ilaç direncin saptanmasında yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle pek çok araştırma laboratuvarı sıtma tanısında alternatif yöntem olarak moleküler tanı yöntemlerini kullanmaktadır (1).

Aynı *Plasmodium* türlerinin farklı alt tiplerinin, enfeksiyon kliniği, rekrudesens özelliği, immünolojik çapraz reaksiyon, ilaç direnci ve çeşitli vektörlerle bulaşma özellikleri gibi faktörlerle değiştiği bilinmektedir. Sıtma parazit popülasyonunun yoğunluğu ile immünolojik, patolojik ve epidemiyolojik faktörler arasındaki ilişkinin iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu amaçla *Plasmodium* türlerinin alt tiplerinin araştırılması amacıyla moleküler yöntemler



kullanılarak (PCR, PCR-RFLP, DNA sekans analizi vs) genotiplendirme çalışmaları yapılmaktadır.

Metodolojik tipteki bu epidemiyolojik araştırmada, sıtma tanısında altın standart olarak kabul edilen mikroskopik tanıya göre nested (iki basamaklı iç içe) PCR yönteminin validitesinin (geçerliliğinin) ve güvenilirliğinin belirlenmesi, nested PCR ile sıtma tespiti ve *Plasmodium* türlerinin tanımlanması ve *P. vivax* alt türlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle, Şanlıurfa'da sıtmanın endemik olduğu ve sıtma olgularının saptandığı ilçelerde, *Plasmodium* pozitifliği araştırılmıştır. *Plasmodium* tespiti, *Plasmodium* tür tayini ve *Plasmodium vivax* alt tür tayini için Snounou ve arkadaşlarının (63) geliştirdiğı primerler kullanılarak nested PCR yapılmıştır. Yine bu çalışmada, *P. vivax*'ın genotiplendirilmesi için en yaygın kullanılan gen bölgesi olarak circumsporozoite protein (CSP) kullanılmıştır.

Bu çalışmanın düşük parazitemili sıtma olgularının tanısında, miks enfeksiyonların saptanmasında, *Plasmodium vivax*'a karşı yapılan aşı çalışmalarında, ilaç direnci ile ilgili çalışmalarda, in vivo ilaç etkinliği çalışmalarında yararlı olacağı düşünülmektedir.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4. 1. Çalışma izni ve proje fonu

Bu doktora tez çalışması Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsanlar Üzerinde Yapılacak Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 22.09.2011 tarih, 13 numaralı oturum ve 13 sayılı karar ile etik olarak uygun görülmüş ve onaylanmıştır. Doktora tez çalışması Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (FÜBAP) sunulmuştur. 20.12.2011 tarihinde FÜBAP tarafından TF.11.76 numaralı proje olarak kabul edilmiş ve desteklenmiştir.

Çalışma, Şanlıurfa Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü'nün resmi onay, izin ve bilgisi dahilinde gerçekleştirilmiştir.

### 4. 2. Örneklerin toplanması

Şanlıurfa'nın sıtma görülen ilçelerinde (Harran, Siverek ve Akçakale) tarımla uğraşan, mevsimlik işçi olarak çalışan ve sıtma şüpheli 100 bireye ulaşılması hedeflenirken 153 bireye ulaşılmıştır. Bireylere çalışma hakkında bilgi verilmiş ve aydınlatılmış onam formu imzalatılmıştır. Bu bireylerin rızaları alınarak parmak ucu (100-200µl) kan ve 5ml'lik EDTA'lı Hemogram tüpüne venöz kan alınarak -20<sup>0</sup>C'de saklanmıştır. Alınan parmak ucu kan Whatman 3M filtre kağıtlarına (Whatman, Piscataway, NJ) emdirilmiştir ve havada kurutulmuştur. Whatman 3M filtre kağıtları plastik kaplar içerisinde oda ısısında saklanmıştır. Ayrıca kalın damla ve ince yayma preparatları hazırlanmıştır. Çalışmaya katılan bireylerin yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, geçmişte sıtma hikayesinin olup olmadığı, önceden sıtma tedavisi görüp görmediği, ailesinde sıtma öyküsü olup olmadığı, yurt dışına seyahat öyküsünün olup olmadığı,

mevsimlik tarım işçisi olup olmadığı, kronik hastalıklarının olup olmadığı evlerine yakın akarsu ve kanalizasyonun geçip geçmediği gibi soruları içeren anket uygulanmıştır.

#### **4. 3. Kalın damla ve ince yayma kan preparasyonu**

Kullanılan malzemeler ve yöntemin uygulanışı aşağıda verilmiştir:

##### **4. 3. 1. Gereçler**

- Lam
- Lanset
- Işık Mikroskobu (Olympus BX51, Japonya)
- Mezur

##### **4. 3. 2. Reaktifler**

- Giemsa Solüsyonu (MERCK, Almanya)
- Distile Su
- Metil Alkol
- İmmersiyon Yağı

##### **4. 3. 3. Kalın damla kan preparasyonu**

**1.** Hastanın parmak ucu alkollü pamuk ile temizlendikten ve lanset ile delindikten sonra ilk bir damla kan silinmiştir. Sonraki bir damla kan temiz bir lama temas ettirilerek alınmıştır.

**2.** Alınan kan damlası başka bir lamın kenarı ile dairesel hareketler yapılarak yaklaşık 2 cm çapında yuvarlak bir alana yayılmıştır.

**3.** Preparat havada kurutulmuştur, tespit edilmemiştir.

4. Mezura konulan 10 ml distile su üzerine, her 1 ml distile su için 1 damla oranına göre 10 damla ticari Giemsa boyası ilave edilmiştir. Mezur, dairesel hareketler yapılarak hafifçe karıştırılmıştır.
5. Hazırlanan Giemsa boyası preparat üzerine dökülüp ve 20 dakika süreyle beklenmiştir.
6. Lam üzerindeki boya dökülmüş, lam musluk suyu ile yıkandıktan sonra havada kurutulmuştur.
7. Kuruyan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile ışık mikroskopunda incelenmiştir.
8. İnceleme yaparken en az 200 sahaya bakılmıştır.

#### **4. 3. 4. İnce yayma kan preparasyonu**

1. Hastanın parmak ucu alkollü pamuk ile temizlendikten sonra lanset ile delinmiştir, temiz bir lama temas ettirilerek lamın kenarından 1 cm mesafede orta bir noktaya bir damla kan alınmıştır.
2. Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında kan damlası işaret parmağının bulunduğu tarafta olacak şekilde tutulmuştur.
3. Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan bir lam, kan damlasının ön kısmına işaret parmağına bakan 45°'lik bir açı yapacak şekilde temas ettirilmiştir.
4. Kanın lamın iki köşesine yayılması için kısa bir süre beklenmiş ve açı korunarak sol tarafa doğru sürülmüştür.
5. Preparat havada kurutulmuştur.
6. Preparatın üzerine metil alkol dökülmüştür ve 2-3 dakika beklenerek tespit edilmiştir.

7. Mezura 10 ml distile su konularak, üzerine (her 1 ml distile su için 1 damla oranına göre) 10 damla ticari Giemsa boyası ilave edilmiştir. Mezur, dairesel hareketler yapılarak hafifçe karıştırılmıştır.
8. Hazırlanan Giemsa boyası preparat üzerine dökülmüştür ve 20 dakika süreyle beklenmiştir.
9. Lam üzerindeki boya dökülmüştür, lam musluk suyu ile yıkanmış ve havada kurutulmuştur.
10. Kuruyan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile ışık mikroskopunda incelenmiştir.
11. İnceleme yaparken en az 200 saha incelenmiştir.

#### **4. 3. 5. Parazitolojik değerlendirme**

Parazitemi düzeyi (Aseksüel parazit sayısı/ $\mu$  kan), kalın ve ince yayma preparatlar incelenerek aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır.

$$Parazit/\mu l = Parazit\ sayısı / Sayılan\ Lökosit\ sayısı \times 8000$$

Her bir kalın damla preparat için 200 lökositin sayıldığı tüm mikroskop alanında parazit görülmedi ise örnek negatif olarak kabul edilmiştir. 200 lökositlik alan tarandığında her  $\mu$ l kanda sayılan parazit sayısı 40 katsayısı ile çarpılarak parazitemi düzeyi saptanmıştır

#### **4. 4. Kan emdirilmiş filtre kağıdından DNA ekstraksiyonu**

Kan emdirilmiş filtre kağıtlarından üretici firmanın talimatlarına göre mini kit DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

#### **DNA mini blood kit**

Başlamadan önce;

- Su banyosu veya ısı bloğu 85<sup>0</sup>C, 56<sup>0</sup>C ve 70<sup>0</sup>C'ye ayarlanmıştır.
- Elüsyon işlemi için Buffer AE oda sıcaklığına getirilmiştir.
- Buffer AW1 ve buffer AW2 protokole göre hazırlanmıştır.
- Buffer AL ve Buffer ATL içinde kristallenme varsa 56<sup>0</sup>C derecede inkübe edilmiştir.

**NOT:** Tüm santrifüj basamakları oda sıcaklığında yapılır.

1. 3 mm'lik 3 parça filtre kağıtları 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne (ependorf) bırakılmıştır. Örnek üzerine 180 µl Buffer ATL eklenmiştir. 85<sup>0</sup>C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüp kapaklarının iç tarafındaki damlaları tüpün içine almak için kısaca santrifüj edilmiştir.
2. 20 µl Proteinase K eklenmiş, iyice vortekslendikten sonra 56<sup>0</sup>C'de 1 saat kadar inkübe edilmiştir. Tüp kapaklarının iç tarafındaki damlaları tüpün içine almak için kısaca santrifüj edilmiştir.  
NOT: Proteinaz K'nın eklenmesi önemlidir.
3. Örnek üzerine 200 µl Buffer AL eklenmiştir. 15 saniye vortekslenmiş ve 10 dakika 70<sup>0</sup>C derecede inkübe edilmiştir. Etkili lizisin sağlanmasından emin olmak için örnekle Buffer AL'nin anında ve iyice karıştırılması gerekir.
5. Tüp kapaklarının iç tarafındaki damlaları tüpün içine almak için kısaca santrifüj edilmiştir. 200µl ethanol (%96-100) eklenmiştir. 10 saniye vortekslendikten sonra kısaca santrifüj edilmiştir.
6. Tüplerin içindeki karışım mini spin kolona aktarılmıştır. Tüplerin kapağı kapandıktan sonra 6000xg (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Spin kolonun yerleştiği tp atılmıştır. Spin kolon temiz 2ml'lik toplama (collection) tüpüne yerleştirilmiştir.

7. Mini spin kolon dikkatlice açılmış ve tüplerin içine 500µl Buffer AW1 eklenmiştir. Tüplerin kapağı kapandıktan sonra 6000xg (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolonun yerleştiği tp atılmıştır. Mini spin kolon temiz 2ml'lik toplama (collection) tüpüne yerleştirilmiştir.
8. Mini spin kolon dikkatlice açılmış ve kolon üzerine içine 500µl Buffer AW2 eklenmiştir. Tüplerin kapağını kapattıktan sonra 20,000xg (14,000 rpm) hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolonun yerleştiği tp atılmıştır. QIAamp Mini spin kolon temiz 2ml'lik toplama (collection) tüpüne yerleştirilmiştir. 20,000xg (14,000 rpm) hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolonun yerleştiği tp atılmıştır. Mini spin kolon 1.5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirilmiştir.
9. Mini spin kolon dikkatlice açılmış ve 150µl Buffer AE kolonun tam ortasına gelecek şekilde aktarılmıştır. Kolonun kapağı kapatılmış ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 6000xg (8000 rpm) hızda 1 dakika kadar santrifüj edilmiştir.
10. Spin kolon atılmıştır. Elde edilen DNA ürünü çalışılana kadar 4<sup>0</sup>C'de, çalışıldıktan sonra ise -80<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

#### 4. 5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hazırlık aşaması

##### 4. 5. 1. Kullanılan araçlar

ADI/MODELİ	ÇALIŞMADA KULLANIM AMACI
Memmert Schutzart DIN 40050-IP 20	70 <sup>0</sup> C’de İnkübasyon
Nüve Benmari Type NB9 (80 <sup>0</sup> C)	56 <sup>0</sup> C’de inkübasyon
Thermo Block TDB-120 (Biosan)	85 <sup>0</sup> C’de inkübasyon
Sanyo CFC FREE -80 <sup>0</sup> C derin dondurucu	Ürünlerin ve reaktiflerin saklanması
Siemens No Frost (-20 <sup>0</sup> C buzdolabı)	Reaktiflerin -20 <sup>0</sup> C’de saklanması, +4 <sup>0</sup> C’de reaktiflerin ve kullanıma hazır PCR ürünlerinin saklanması
Yellow line TTS2 (vorteks)	Ekstraksiyon ve PCR amplifikasyonu sırasında elde edilen ürünlerin karıştırılarak homojen hale gelmesi
Galaxy 16 DHVWR (mikrosantrifüj)	DNA ekstraksiyonu sırasında santrifüj etme
Gene Amp PCR System 97000 (PE Applied Biosystems)	PCR amplifikasyonu
Thermo EC 250-90 (Elektroforez cihazı)	Elektroforez
Owl A1model Elektroforez tankı	Elektroforez yürütme
Vilber Lourmat (V027378) (UV)	Ultraviyole transluminatör
Syngene Bio Imaging	Ultraviyole transluminatör
Bilgisayar	Görüntülerin bilgisayra aktarılması
Olympus CH30 mikroskop	İnce yayma ve kalın damla preparatların incelenmesi
Mikrodalga Fırın (Arçelik)	Jelin eritilmesi
Elektronik hassas terazi	Kimyasalların tartılması
pH metre	Hazırlanan solüsyonlarının Ph dercesinin ölçülmesi
Otomatik pipet (0.5-20-50 µl)	Pipetleme
Beherler	Ölçme, solüsyon hazırlama
Ependorf tüpleri	Saklama
Muhtelif uçlar (10’luk, 100’lük, 200’lük, 1000’lik)	



#### 4. 5. 2. Kullanılan reaktifler ve kimyasallar

ADI	Firma/Ülke/Cat. ve Lot. NO:
TBE Buffer (10X stok)	1 M Tris, 1 M boric acid, 50 mM EDTA. pH yaklaşık 8,3
TE Buffer	10 mM Tris, pH 8,0 (Tris-base plus), 0.1 mM EDTA
Taq PCR Core Kit	(QIAGEN, Almanya, Cat. No. 201223) (10X PCR Buffer, dNTP, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , Taq Polimeraz Enzimi 5U/μl)
10X PCR Buffer (15mM MgCl <sub>2</sub> içermektedir.)	(QIAGEN, Almanya, Lot No:139284228)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	(QIAGEN, Almanya, Lot No:139286244)
dNTP-Miks (Herbiri için 10 mM)	(QIAGEN, Almanya, Lot No:139286070)
Taq DNA Polymerase (5units/μl)	(QIAGEN, Almanya, Lot No: 139283064)
Gelpilot DNA Loading Dye 5X	(QIAGEN, Almanya, Cat. No. 239901)
Gelpilot 100 bp Ladder 100 Lanes (6μl/lane)	(DNA Moleküler Ağırlık Marker) (Invitrogen, USA, Cat No: 15628-019)
Metaphor Agaroz (%2, 1X TBE içinde hazırlanır.)	Lonza, ABD, Cat No: 50180
QIAmp DNA Blood Mini Kit	(QIAGEN, Almanya, Cat. No. 51304)
QIAmp DNA Mini Kit	(QIAGEN, Almanya, Cat. No. 51104)
0.02 Standart Primerler	(Invitrogen, ABD)
Restriksiyon Endonükleaz Alu I 10U/μl	(Roche, Almanya, Cat.No. 10239275001)
Restriksiyon Endonükleaz Bst NI (MvaI) 10U/μl	(Roche, Almanya, Cat.No.11288075001)
BSA (Bovine Serum Albumin, 100X)	(Bio Labs New England) (Lot: 0051109)
Tris Base (121.14g/mol)	Bioshop, Kanada, Lot No: 1J220
EDTA (372.298 g/mol)	(Merck, Germany)
Boric acid (61.83g/mol)	(Merck, Germany)
MgCL <sub>2</sub> (203.3 g/mol)	(Fisher Scientific, Germany, Lot No: 107996)
Ethidium bromide (1 gr) Su	(Sigma, Aldrich, Cat. No. E8751)

#### 4. 5. 3. Kullanılan primerler (Invitrogen, ABD)

##### **PLASMODİUM GENUS SPESİFİK PRİMERLER**

Primer 1: rPLU 1 (5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3')

Primer 2: rPLU5 (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3')

Primer 3: rPLU3 (5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT-3')

Primer 4: rPLU4 (5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3')

##### **PLASMODİUM TÜRE SPESİFİK PRİMERLER**

###### ***P. vivax*'a spesifik primerler**

Primer 5: rVIV1 (5'-CGC TTC CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3')

Primer 6: rVIV2 (5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3')

###### ***P. falciparum*'a spesifik primerler**

Primer 7: rFAL1 (5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3')

Primer 8: rFAL2 (5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3')

###### ***P. malaria*'ya spesifik primerler**

Primer 9: rMAL1 (5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3')

Primer 10: rMAL2 (5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAT TAT ACA AA-3')

###### ***P. ovale*'ye spesifik primerler**

Primer 11: rOVA1 (5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3')

Primer 12: rOVA2 (5'-ATC TAA GAA TTT CAC CTC TGA CAT CTG-3')

##### **PVCS GEN BÖLGESİNE GÖRE *P. VIVAX* PARAZİTLERİNİN GENOTİPLENDİRMESİNDE KULLANILAN PRİMERLER**

Primer 13: VCS-OF (5'-ATG TAG ATC TGT CCA AGG CCA TAA A-3')

Primer 14: VCS-OR (5'-TAA TTG AAT AAT GCT AGG ACT AAC AAT ATG-3')

Primer 15: VCS-NF (5'-GCA GAA CCA AAA AAT CCA CGT GAA AAT AAG-  
3')

Primer 16: VCS-NR (5'-CCA ACG GTA GCT CTA ACT TTA TCT AGG TAT-3')

#### **4. 5. 4. Tamponların hazırlanması**

##### **4.5. 4. 1.Tris-Edta buffer (TE Buffer)**

10 mM Tris, pH 8,0 (Tris-base plus Tris HCl),

0.1 mM EDTA

TE Buffer hazırlanmıştır.

##### **4. 5. 4. 2. Tris-boric acid-edta buffer (TBE Buffer) (10x stok)**

1 M Tris-base,

1M Boric acid,

50 mM EDTA

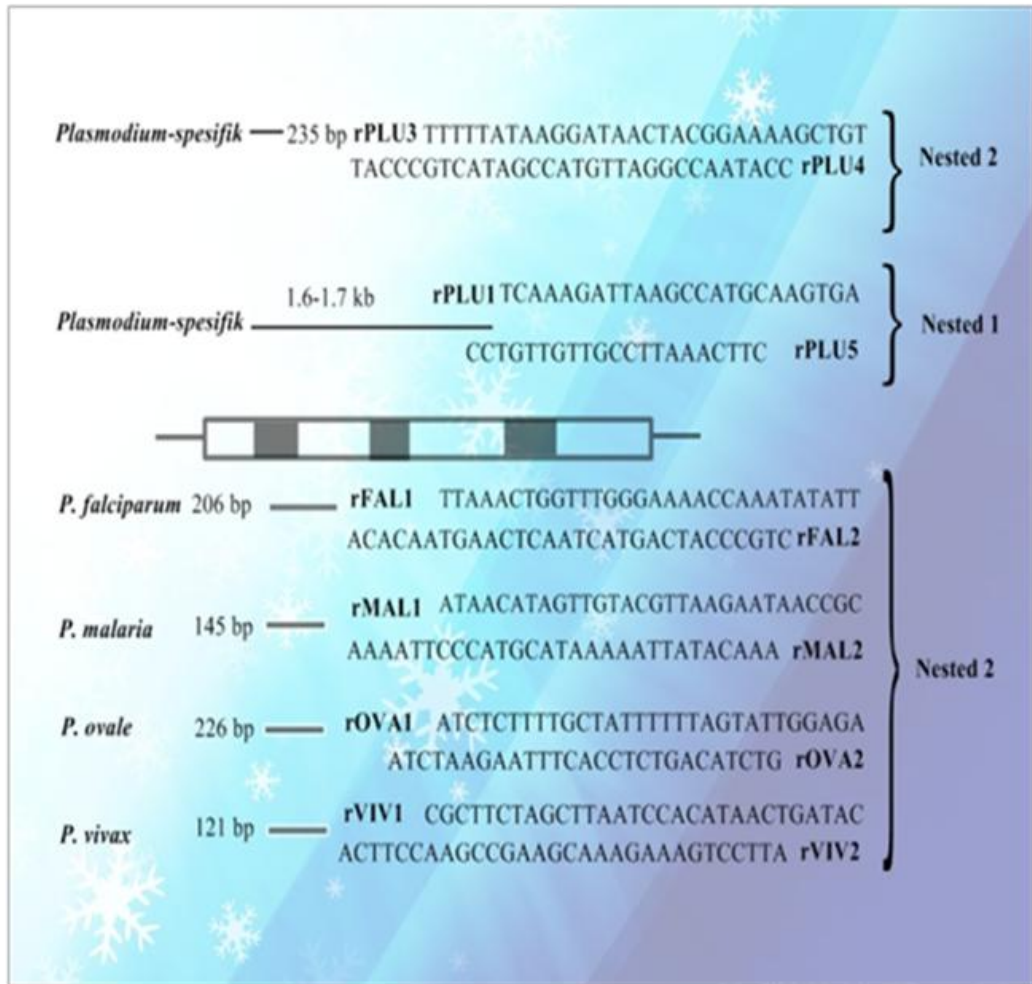
kullanılarak TBE Buffer hazırlanmıştır.

#### **4. 6. PCR amplifikasyonu**

DNA ekstraksiyonundan sonra *Plasmodium*'un saptanması ve türlerine ayrılması Snounou ve arkadaşları tarafından geliştirilen 18S rRNA gen bölgesi hedeflenen primerlerin kullanılmasıyla iki aşamalı nested PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır (90). Nested 1 reaksiyonunda elde edilen DNA ürünü yaklaşık 1.6-1.7 kb büyüklüğündedir. Cins ve tür spesifik primerlerin özgülüğü oldukça yüksektir. Nested 2 reaksiyonundan elde edilen amplifikasyon ürünleri tanı koydurucu büyüklükte dirler. Bütün PCR amplifikasyonlarında her bir reaksiyon için kullanılan karışım hacmi 20µl'dir. DNA hariç bütün reaktifleri içeren bir master miks hazırlanıp reaksiyon tüplerine 20'şer µL olacak şekilde dağıtılmıştır.

- 1- PCR buffer, oligonükleotid primerleri dondurucudan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözülmüştür. Uygun miktarda master mix tüpüne bırakılmıştır.
- 2- Master miks tüpünün üzerindeki etikete uygun reaktif hacimlerini eklenmiştir: sırasıyla su, PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ve oligonükleotid primerleri eklenmiştir.

**Şekil 17.** *Plasmodium* ssrRNA genine ait farklı oligonükleotid çiftlerinin dizileri ve yaklaşık pozisyonlarının şematize edilmesi, kullanılan nested PCR protokolu (65)



- 3- dNTP dondurucudan çıkarılıp çözülmüş ve vortekslendikten sonra uygun miktarda master miks tüpüne eklenmiştir. Her dNTP nihai konsantrasyonu 125 mM'dir.
- 4- Taq polimeraz dondurucudan çıkarılıp uygun miktarda master miks tüpüne eklenmiş ve artan kısmı hemen dondurucuya bırakılmıştır. Her 20µL'lik reaksiyon için toplam enzim miktarı 0.4 U'dur (2 U/100 µL).
- 5- PCR karışımı (master miks) tüpündeki bütün içerikler vortekslenmiştir. Her tüpe 20µL'lik master miks koyulmuştur.
- 6- 20µL'lik master miks hacmine (PCR karışımı) 1 µL ekstrakte edilen *Plasmodium* DNA'sı eklenerek toplam 21 µL'lik hacimden oluşan tüpler Gene Amp PCR System 97000 (PE Applied Biosystems) cihazına yüklenmiştir. Nested PCR amplifikasyon kurma aşamaları Snounou ve ark. yöntemine göre uygulanmıştır.

#### **4. 6. 1. Nested 1 PCR amplifikasyonu**

Nested 1 amplifikasyonu, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 250 nM oligonükleotid primerleri, 125µM dört dNTP'nin her biri için, 0.4 unit Amplitaq polimeraz içeren toplam 20 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. Nested 1 PCR Reaksiyonunda *Plasmodium* genus spesifik primerler, rPLU 1 (5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3') ve rPLU5 (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3') kullanılmıştır. Hazırlanan 20 µl'lik PCR karışımına filtre kağıtlarından ekstrakte edilen template DNA'dan 1 µl ilave edilmiştir. Gene Amp PCR System 97000 (PE Applied Biosystems) Thermal Cycle cihazına yüklenmiştir.

**Tablo 4. Her bir hasta için PCR karışımının hazırlanması**

Reaktifler	Final Hacim (V) µl
Buffer (x)	4,0
Mg (mM)	1,6
dNTP (µM)	1,0
Oligo (nM)	4,0
Taq (U/µl)	0,2
Su	25
Toplam	40
1 Tüp Hacmi	20,0

Nested 1 PCR amplifikasyon reaksiyonu basamakları aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

1. Basamak: 95°C’de 5 dakika İlk (başlangıç) denatürasyon
  2. Basamak: 58°C’de 2 dakika Annealing (bağlanma)
  3. Basamak: 72°C’de 2 dakika Ekstansiyon (uzama)
  4. Basamak: 94°C’de 1 dakika Denatürasyon
- 25 Siklus
5. Basamak: 2. ve 4. basamakların tekrarı
  6. Basamak: 72°C’de 5 dakika son ekstansiyon
  7. Basamak: Reaksiyon, ısının 4°C’ye düşürülmesiyle tamamlanmıştır.

#### **4. 6. 2. Nested 2 PCR amplifikasyonu**

Birinci nested PCR reaksiyon sonucu elde edilen üründen yani amplifiye edilen DNA fragmanından alınan 1µl daha sonra ikinci Nested PCR amplifikasyon reaksiyonlarını ayırt etmede template DNA olarak kullanılmıştır. Nested 2 PCR reaksiyonu için PCR tüplerindeki master mikse template DNA’nın

eklenmesi kontaminasyonun önlenmesi için ayrı bir odada yapılmıştır. Template DNA'nın eklenmesi sonucu toplam 21 µl'lik hacimli PCR tüpleri içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde Gene Amp PCR System 97000 (PE Applied Biosystems) Thermal Cycle cihazına yüklenmiştir.

Nested 2 PCR amplifikasyon reaksiyonu basamakları aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır:

- |  |                              |             |
|--|------------------------------|-------------|
| 1. Basamak: 95°C'de 5 dakika   | İlk (başlangıç) denatürasyon | } 30 Siklus |
| 2. Basamak: 64°C'de 2 dakika   | Annealing (bağlanma)         |             |
| 3. Basamak: 72°C'de 2 dakika   | Ekstansiyon (Uzama)          |             |
| 4. Basamak: 94°C'de 1 dakika   | Denatürasyon                 |             |
| 5. Basamak: 2. ve 4. basamakların tekrarı  |                              |             |
| 6. Basamak: 72°C'de 5 dakika son ekstansiyon   |                              |             |
| 7. Basamak: Reaksiyon ısının 4°C'ye düşürülmesiyle tamamlanmıştır. Nested 2 PCR ürünü elde edilmiştir. |                              |             |

#### 4. 6. 3. *Plasmodium* genus spesifik nested PCR

Nested 1 PCR aşamasında 1 µl ekstrakte *Plasmodium* DNA, genus spesifik primerler rPLU1 (5' TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3'), rPLU5 (5' CCTGTTGTTGCCTTAACTTC-3') kullanılarak amplifiye edilmiştir.

Nested 1 PCR sonucu elde edilen 1 µl PCR DNA ürünü, nested 2 PCR reaksiyonunda *Plasmodium* genus spesifik primerler, rPLU3 (5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT-3') ve rPLU4 (5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3') ile amplifiye edilmiştir. *Plasmodium* pozitifliği saptanmıştır.

#### 4. 6. 4. *Plasmodium* türe spesifik nested PCR

Nested 2 PCR reaksiyonlarında, nested 1 PCR sonucu elde edilen DNA ürünü, *P. vivax*'a spesifik rVIV1 (5'-CGC TTC CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'), rVIV2 (5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3'); *P. falciparum*'a spesifik primerler rFAL1 (5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'), rFAL2 (5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'); *P. malaria*'ya spesifik primerler rMAL1 (5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3'), rMAL2 (5'- AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAT TAT ACA AA-3'); *P. ovale*'ye spesifik primerler rOVA1 (5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3'), rOVA2 (5'-ATC TAA GAA TTT CAC CTC TGA CAT CTG-3') kullanılarak amplifiye edilmiştir. *Plasmodium* pozitif örneklerin tür tayini yapılmıştır.

#### 4. 6. 5. PCR ürünlerinin analizi

##### 4. 6. 5. 1. Elektroforez

- 1- **Jelin Hazırlanması:** Metaphor agaroz kullanılarak 1X TBE ile %2'lik jel hazırlanmıştır. Mikrodalga fırında eritilmiştir. Eritilen jel oda sıcaklığında 55<sup>0</sup>C'ye kadar soğutulduktan sonra uygun şekilde hazırlanmış elektroforez kabına kalınlığı 3-5 mm olacak şekilde dökülmüştür (taraklar takılı olacak şekilde). Oda ısısında donması için yarım saat beklenmiştir. Daha sonra tarak çıkarılmış ve 1X TBE yüklü elektroforez tankına jel yerleştirilmiştir.
- 2- 6 µl loading dye ile 8 µl hasta PCR DNA ürünüyle iyice karıştırıldıktan sonra elektroforez cihazındaki jel kuyucuklarına yüklenmiştir. PCR ürünlerinin yanı sıra kuyucuklardan birine DNA Moleküler Ağırlık Marker



(Gelpilot 100 bp Ladder, Invitrogen, ABD), bir kuyucuğa pozitif kontrol, bir kuyucuğa negatif kontrol yüklenmiştir.

3- Elektroforez işlemi 100 V'ta 2 saat sürmüştür.

#### 4. 6. 5. 2. PCR ürünlerinin etidium bromürde boyanması

0.1–0.5µg/mL 1X TBE'de hazırlanmıştır. Elektroforezde yürütülen jel hazırlanan lü solüsyonda 30 dakika boyanmıştır.

#### 4. 6. 5. 3. PCR ürünlerinin ultraviyole görüntülenmesi

PCR ürünlerine ait bantlar UV ışık altında Syngene Bio Imaging (In Genius) görüntüleme sistemiyle bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

#### 4. 7. PVCS gen bölgesinin kullanılmasıyla *Plasmodium vivax* genotiplenmesi

Circumsporozoite proteini kodlayan PvcS gen bölgesi kullanılarak Imwong ve arkadaşlarının (76) tarif ettiği gibi *P. vivax*'ın polimorfik genotiplenmesi yapılmıştır.

Şekil 18. PvcS gen bölgesinin şematize edilmesi (76)

Gen	Primer	Sekans
PvcS	VCS-OF	ATGTAGATCTGTCCAAGGCCATAAA
	VCS-OR	TAATTGAATAATGCTAGGACTAACAATATG
	VCS-NF	GCAGAACCACAAAAATCCACGTGAAAATAAG
	VCS-NR	CCAACGGTAGCTCTAACTTTATCTAGGTAT

#### 4. 7. 1. PVCS gen bölgesi nested 1 PCR amplifikasyonu

*P. vivax* parazitlerinin genotiplendirilmesinde PvcS gen bölgesini hedefleyen primerler, VCS-OF (5'-ATG TAG ATC TGT CCA AGG CCA TAA A-3') ve VCS-OR (5'-TAA TTG AAT AAT GCT AGG ACT AAC AAT ATG-3') kullanılarak nested 1 PCR amplifikasyonu kurulmuştur. Nested 1 PCR amplifikasyonu, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 250nM oligonükleotid primerleri, 125µM dört dNTP'nin her biri için, 0.4 unit Amplitaq polimeraz içeren toplam 20 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan 20 µl'lik karışım hacmine filtre kağıtlarından ekstrakte edilen template DNA'dan 1 µl ilave edilmiştir. Gene Amp PCR System 97000 (PE Applied Biosystems) Thermal Cycle cihazına yüklenmiştir.

##### 4. 7. 1. 1. Nested 1 amplifikasyonu reaksiyonları ve döngü sayısı

- |   |                              |             |
|---|------------------------------|-------------|
| 1. Basamak: 95°C'de 5 dakika  | İlk (başlangıç) denatürasyon | } 25 Siklus |
| 2. Basamak: 58°C'de 2 dakika  | Annealing (bağlanma)         |             |
| 3. Basamak: 72°C'de 2 dakika  | Ekstansiyon (uzama)          |             |
| 4. Basamak: 94°C'de 1 dakika  | Denatürasyon                 |             |
| 5. Basamak: 2. ve 4. basamakların tekrarı                           |                              |             |
| 6. Basamak: 72°C'de 5 dakika son ekstansiyon                        |                              |             |
| 7. Basamak: Reaksiyon, ısının 4°C'ye düşürülmesiyle tamamlanmıştır. |                              |             |

##### 4. 7. 2. PVCS gen bölgesi nested 2 PCR amplifikasyon reaksiyonu

Nested 2 PCR amplifikasyon reaksiyonu, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 250nM oligonükleotid primerleri, 125µM dört dNTP'nin her biri için,

0.4 unit Amplitaq polimeraz içeren toplam 20 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan 20 µl'lik karışıma nested 1 PCR sonucu elde edilen PCR ürünü template DNA'dan 1.5 µl alınarak eklenmiştir ve Nested 2 PCR amplifikasyonu yapılmıştır. Nested 2 PCR'de, *P. vivax* parazitlerinin genotiplendirilmesinde PvcS gen bölgesini hedefleyen primerler, VCS-NF (5'-GCA GAA CCA AAA AAT CCA CGT GAA AAT AAG-3') ve VCS-NR (5'-CCA ACG GTA GCT CTA ACT TTA TCT AGG TAT-3') kullanılmıştır.

#### 4. 7. 2. 1. Nested 2 PCR amplifikasyon reaksiyonu basamakları ve döngü sayısı

- |  |                              |             |
|--|------------------------------|-------------|
| 1. Basamak: 95°C'de 5 dakika   | İlk (başlangıç) denatürasyon | } 30 Siklus |
| 2. Basamak: 62°C'de 2 dakika   | Annealing (bağlanma)         |             |
| 3. Basamak: 72°C'de 2 dakika   | Ekstansiyon (uzama)          |             |
| 4. Basamak: 94°C'de 1 dakika   | Denatürasyon                 |             |
| 5. Basamak: 2. ve 4. basamakların tekrarı  |                              |             |
| 6. Basamak: 72°C'de 5 dakika son ekstansiyon   |                              |             |
| 7. Basamak: Reaksiyon ısının 4°C'ye düşürülmesiyle tamamlanmıştır. Nested 2 PCR ürünü elde edilmiştir. |                              |             |

Nested 2 PCR sonucu elde edilen PCR ürünleri, analiz vaktine kadar +4°C'de saklanmıştır.

### **4. 7. 3. PVCS gen bölgesi amplifikasyon ürünü analizi**

#### **4. 7. 3. 1. Elektroforez**

PCR amplifikasyonunu takiben 8 µl DNA ürünü 6 µl loading dye ile karıştırıldıktan sonra %1.8'lik agaroz jelde 100 V'ta 2 saat yürütülmüştür. Elektroforez TBE tamponda yapılmıştır.

#### **4. 7. 3. 2. PCR ürünlerinin etidium bromürde boyanması**

0.1–0.5µg/mL etidium bromür 1X TBE'de hazırlanmıştır. Elektroforezde yürütülen jel hazırlanan etidium bromürlü solüsyonda 30 dakika boyanmıştır.

#### **4. 7. 3. 3. PCR ürünlerinin ultraviyole görüntülenmesi**

Nested 2 PCR ürünlerine ait bantlar UV ışık altında Syngene Bio Imaging (In Genius) görüntüleme sistemiyle bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

### **4. 8. PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)**

PCR-RFLP analizi için 10 µl Nested 2 PCR ürünü 10 µl restriksiyon kesim enzimleri *Alu I* (Roche) ve *Bst NI (Mva I)* (Roche) ile toplam 20 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. *P. vivax*'ta tekrarlanan iki gen bölgesini (VK210 ve VK247) ayırt etmek için nested 2 PCR ürünleri, kesim enzimleri, *Alu I* (Roche) ile 37<sup>0</sup>C'de 1 saat; *Bst NI (Mva I)* (Roche) ile 60<sup>0</sup>C'de 1 saat üretici firmanın talimatlarına göre inkübe edilmiştir. VK247 sekansı herhangi *Alu I* bölgesi taşımaz, bunun yanında VK210 birçok *Alu I* bölgesi barındırır.

#### **4. 8. 1. PCR-RFLP sonucu elde edilen ürünlerin analizi**

Elektroforezde PvcS bölgesi için 100bp DNA ladder moleküler ağırlık belirteci (Invitrogen-ABD) kullanılmıştır. Elektroforez edilen DNA fragmanları etidyum bromürde 30 dakika boyandıktan sonra ultraviyole transilluminatör ile görüntülenmiştir.

#### **4. 9. İstatistiksel Analizler**

Veri girişi ve analizlerde SPSS (11.5) istatistik programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistiklerden yüzde dağılımı, ortalama ve standart sapma kullanılmıştır.

Sıtma tanısında altın standart olarak kabul edilen mikroskopik tanı yöntemine göre Nested PCR analizinin sıtma tanısında validitesinin (geçerliğinin) ve güvenilirliğinin belirlenmesi için metodolojik tipte epidemiyolojik araştırma yöntemi kullanılmıştır. PCR analizinin duyarlılık, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri (PPD), negatif prediktif değeri (NPD) hesaplanmıştır.

## 5. BULGULAR

### 5. 1. Örnekler

DSÖ, sıtma savaşına başlayabilmek için, öncelikle kesin sıtma tanısının konması ve sıtmalı hastaların bulunmasını önermektedir. Bu nedenle, bu çalışma, 2008-2011 yıllarında, Şanlıurfa'nın sıtma olgusu görülen Harran, Siverek ve Akçakale ilçelerinde yürütülmüştür. Tarımla uğraşan, mevsimlik işçi olarak çalışan ve sıtma şüpheli 153 bireye çalışma hakkında bilgi verilmiştir ve Ek 8.'deki aydınlatılmış onam formu imzalatılmıştır.

### 5. 2. Epidemiyolojik veriler

Çalışmaya dahil olan bireylerin yaşları 1 ayla 77 yaş arası değişmekle beraber, yaş ortalamaları  $21.10 \pm 16.10$  bulunmuştur. Çalışma grubunun %50.4'ünün bayan, %49.6'sının erkek bireylerin oluşturduğu bulunmuştur.

Hastalar ve epidemiyolojik koşullarının analizi yapıldığında hepsinin tarım işçisi olduğu, pamuk ve çeltikle uğraştıkları görülmüştür. Sıtma olgularının %61.54'ünün üşüme, titreme, terleme ve baş ağrısı gibi sıtmaya özgü semptomlara sahip olduğu, %23.07'sinin herhangi bir şikayetinin olmadığı ve %15.39'unun ise halsizlik, yorgunluk ve bulantı-kusma gibi şikayetlerinin olduğu belirlenmiştir.

Çalışmaya katılanlara uygulanan anket sonucu, katılanların %38.2'sinin daha önceden sıtma geçirdiği ve klorokin ve primakinle tedavi oldukları, %61.8'inin ise sıtma yönünden herhangi bir ilaç kullanmadıkları anlaşılmıştır.

PCR ile saptanan 15 sıtma olgusunun 6'sının (%40) herhangi bir şikayeti olmadığı, 9'unun (%60) terleme, titreme, baş ağrısı, halsizlik, yorgunluk ve

şikayetleri olduğu görülmüştür. Olguların hepsinde ateş 38<sup>0</sup>C ve üzeri olarak ölçülmüştür.

Saptanan olguların yaş ortalamaları 25.92±15.46, cinsiyet dağılımı 7 kız (%46.7), 8 erkek (%53.3) bulunmuştur.

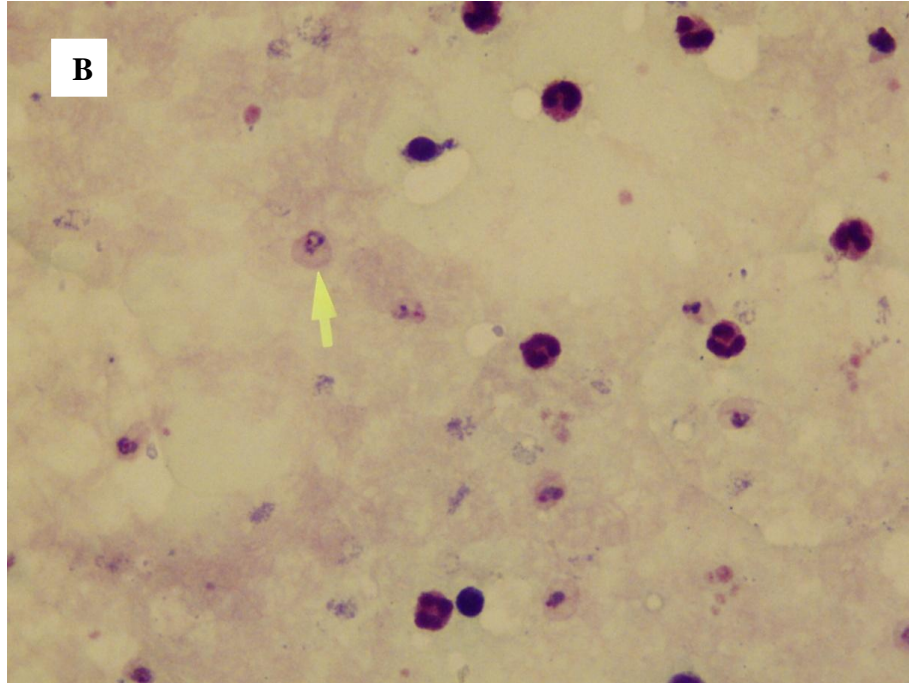
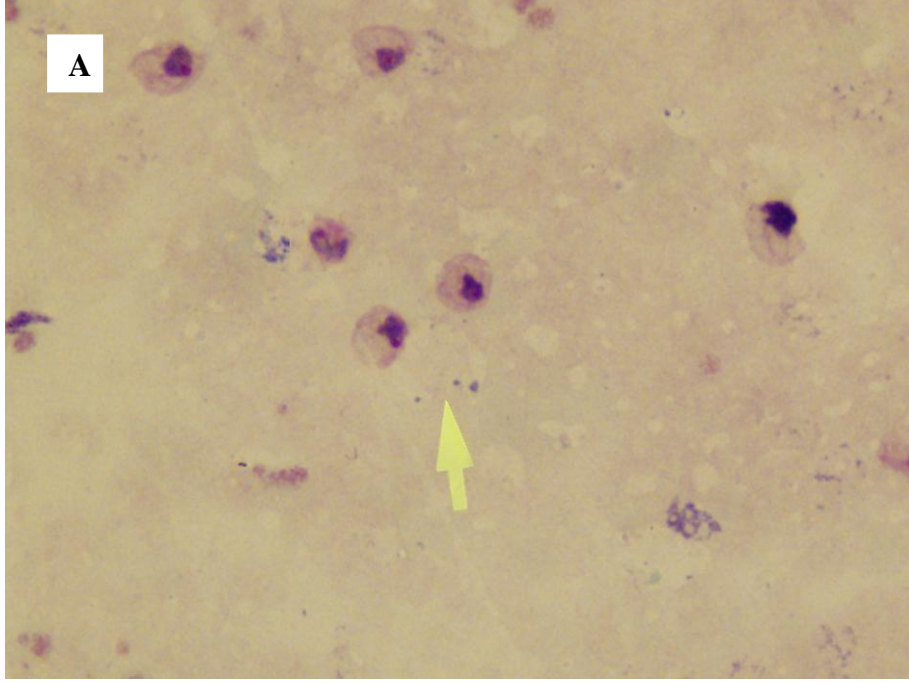
### 5. 3. Mikroskobi bulguları

Çalışmaya katılan 153 bireyden alınan kalın damla preparatları Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskopik olarak incelenmiştir. Mikroskopik bakıya göre çalışmaya katılan 153 bireyin 11'inde (%7.2) sıtma saptanmışken 142'sinde (%92.8) sıtma saptanamamıştır (Tablo 6). *Plasmodium*'ların kalın damla preparattaki görüntüleri Şekil 19A-B, ince yayma preparattaki görüntüleri ise Şekil 20 A-B'de görülmektedir. Olgulardaki parazitemi düzeyleri 640 ile 9760 arasında saptanmıştır (Tablo 5).

**Tablo 5.** Mikroskopik bakıya göre sıtma olgularının parazitemi düzeyleri

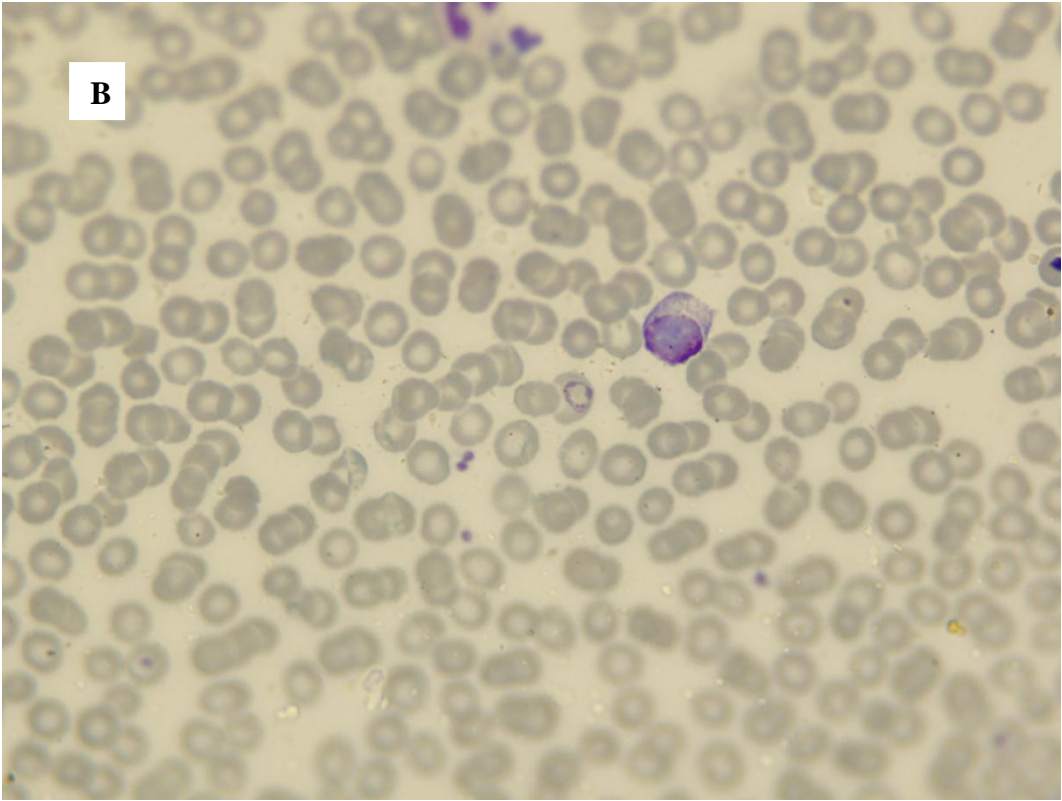
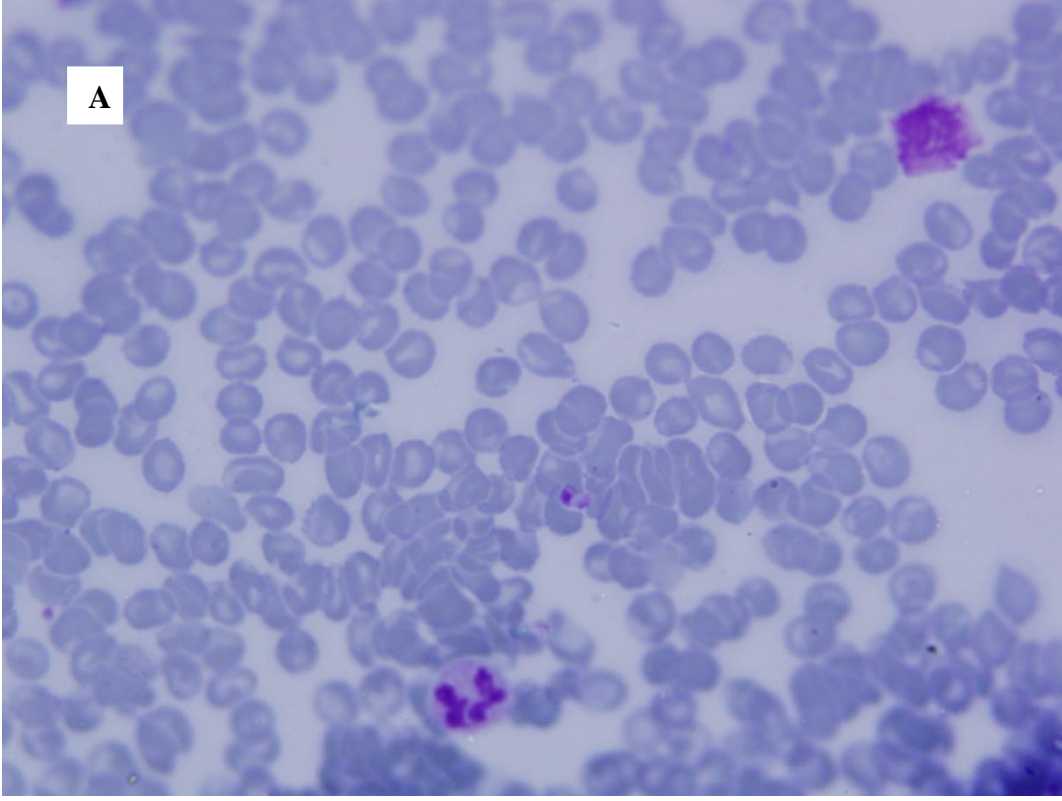
Sıtma Olguları	Parazitemi Düzeyi
	Parazit/ $\mu$ l
1	6720
2	7360
3	8180
4	1760
5	9760
6	7680
7	5920
8	640
9	1280
10	1200
11	960

Şekil 19 A-B. Kalın damla preparatlarda *P. vivax* formları (Giemsa)





Şekil 20 A-B. İnce yayma preparatlarda *P. vivax* formları (Giemsa)



#### 5. 4. Nested PCR analizi bulguları

##### 5. 4. 1. *Plasmodium* genus spesifik primerlerle yapılan nested PCR analizi bulguları

Çalışmaya katılan 153 kişiden parmak ucu alınan kanlar filtre kağıtlarına emdirilmiştir. Filtre kağıtlarından ekstrakte edilen DNA ürünleri, Snounou ve ark. nın geliştirdiği *Plasmodium* genus primerler kullanılarak iki aşamalı nested PCR ile analiz edilmiştir. Nested PCR sonucunda, çalışmaya katılanların 15'inde (%9.8) (Şekil 21), sıtma paraziti saptanmışken, 138'inde (%90.2) saptanamamıştır (Tablo 6). *Plasmodium* cinse spesifik PCR ürünü bant uzunluğu 235 bp'dir.

**Tablo 6. Mikroskopik bakı ve PCR analiz sonuçları**

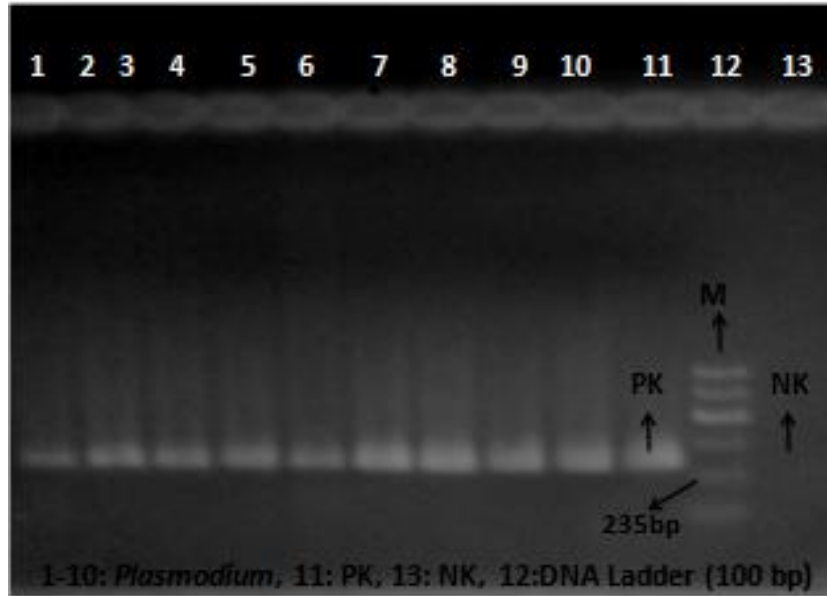
TEST	SONUÇ				TOPLAM	
	NEGATİF		POZİTİF		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
PCR	138	90.2	15	9.8	153	100
MİKROSKOPİ	142	92.8	11	7.2	153	100

##### 5. 4. 2. *Plasmodium* türe spesifik nested PCR analizi bulguları

Genus spesifik primerlerle *Plasmodium* pozitifliği saptanan 15 sıtma olgusunun hangi *Plasmodium* türü ile enfekte olduklarının belirlenmesi amacıyla türe spesifik primerler *P. falciparum* için rFAL1 ve rFAL2, *P. malaria* için rMAL1 ve rMAL2, *P. vivax* için rVIV1 ve rVIV2, *P. ovale* için rOVAL1 ve rOVA2 kullanılarak nested PCR analizi yapılmıştır. Her türe ait spesifik PCR ürünü uzunlukları farklılık gösterir. *P. falciparum* için 206 bp, *P. vivax* için 121

bp, *P. malaria* için 145 bp, *P. ovale* için 226 bp'dir . Birinci amplifikasyon ürünüyle karşılaştırıldığında her fragmanın 1.6-1.7 kb olduğu gözlenir (65). Saptanan 15 *Plasmodium*'un 14'ü *P. vivax* olarak saptanmıştır (Şekil 22 A-B). Bir örnek, genus spesifik primerle *Plasmodium* spp. olarak saptanmasına rağmen ikinci yapılan türe spesifik primerlerin kullanıldığı nested PCR ile 4 *Plasmodium* türünden herhangi biri olarak tanımlanamamıştır. Söz konusu bu örnek mikroskopik bakıyla *P. vivax* olarak tanımlanmıştır.

**Şekil 21.** %2'lik agaroz jelde *Plasmodium* DNA'sının genus spesifik nested PCR analizi (NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, M: Marker)

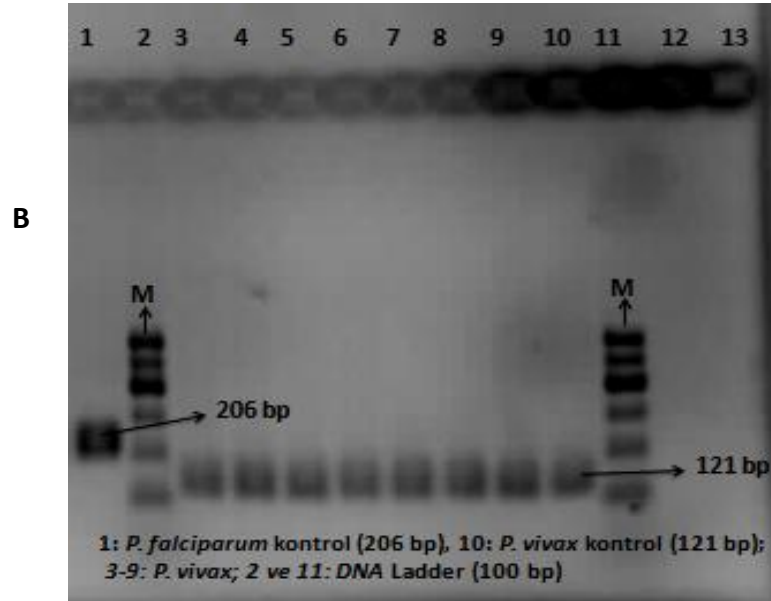
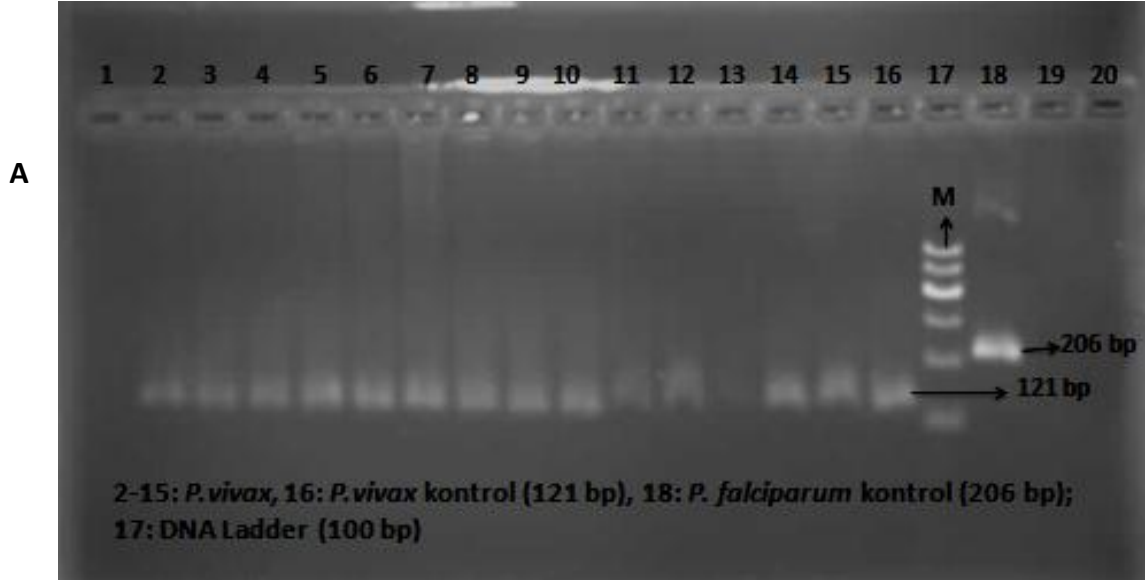


#### 5. 4. 3. *P. vivax* Pvcs gen bölgesine spesifik nested PCR analizi bulguları

*P. vivax* parazitlerinin genotiplendirilmesinde Pvcs gen bölgesini hedefleyen primerler kullanılarak tespit edilen 14 *P. vivax*'ın nested PCR analizi yapılmıştır. Bunların DNA örneklerinden *P. vivax* Pvcs amplifiye edilmiş ve amplifiye edilen gen bölgesine PCR-RFLP analizi uygulanmıştır, örneklerin 2'si

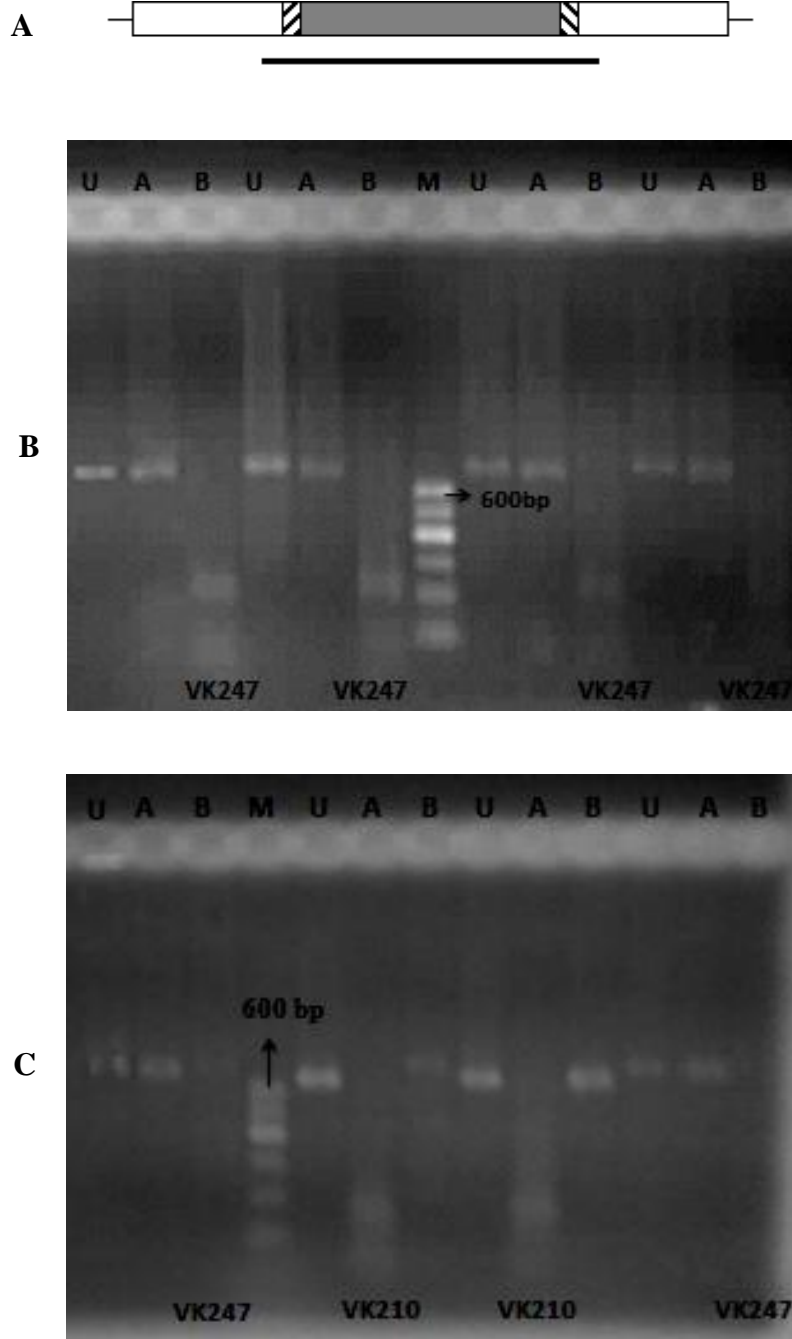
(%14.3) VK210, 12'si (%85.7) VK247 olarak tanımlanmıştır (Şekil 23 B-C).  
Örneklerin hiçbirinde karışık tipe rastlanılmamıştır.

**Şekil 22 A-B.** %2'lik agaroz jelde *Plasmodium* DNA'sının türe spesifik primerlerle nested PCR analizi (M: Marker)



**Şekil 23. A.** Pvcş gen bölgesinin şematik olarak gösterilmesi

**B-C.** %1.8'lik agaroz jelde Pvcşp gen bölgesi bazlı *P. vivax* izolatlarının PCR-RFLP ile tiplendirilmesi (M: Marker, U: Herhangi bir enzimle kesilmemiş, A: *Alu* I ile kesilmiş, *Bst* NI ile kesilmiş.)



## 5. 5. İstatistiksel bulgular

Nested PCR'nin altın standart olarak kabul edilen mikroskopik tanıya göre duyarlılığı %100, özgüllüğü %97.2, pozitif prediktif değeri %73.3, negatif prediktif değeri %100 olarak bulunmuştur.

*Plasmodium* pozitif olguların yaş ortalamaları  $25.92 \pm 15.46$ ; cinsiyet dağılımı 7 kız (%46.7), 8 erkek (%53.3) olarak bulunmuştur. *Plasmodium* pozitifliği ile olguların yaşları ve cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

## 6. TARTIŞMA

Sıtma, *Plasmodium* cinsi hücre içi parazitler tarafından oluşturulan ve bildirim zorunlu bir enfeksiyon hastalığıdır. İnsanda sıtmaya neden olan dört *Plasmodium* türü (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malaria* ve *P. falciparum*) bilinmektedir. Son yıllarda beşinci bir tür olarak *P. knowlesi*'nin insanlarda enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir. Bu parazitlerden *P. vivax* daha az tehlikeli fakat dünya genelinde en yaygın türdür. *P. falciparum* en ağır seyirli ve en ölümcül sıtma olgularından sorumlu olup, Afrika'da yaygındır. *P. malaria*, *P. ovale* ve *P. knowlesi* ise daha seyrek rastlanan türlerdir (7).

Sıtma, günümüzde de uluslararası seyahatlerin yaygınlaşması ile hastalığın endemik olduğu bölgelerden diğer bölgelere taşınabilmesi nedeniyle önemini koruyan bir enfeksiyondur (6). DSÖ 2010 sıtma raporuna göre, 2010 yılında 3.3 milyar insanın dünyada sıtma riski altında kaldığı ve dünyada 216 milyon sıtma olgusunun olduğu tahmin edilmektedir. Aynı yıl sıtmanın neden olduğu 655.000 ölümün %91'inin Afrika'da görüldüğü bildirilmiştir. Bu ölümlerin %86'sını ise 5 yaş altı çocuklar oluşturmaktadır (7).

DSÖ, sıtmayı önemli bulaşıcı hastalıklar kapsamında Tüberküloz ve AIDS ile birlikte ilk üçte değerlendirmektedir.

Küresel Sıtma Eylem Planı hedefleri ile tutarlı olarak, 2009 itibarıyla, 6 Avrupa Ülkesinde (Azerbaycan, Gürcistan, Kırgızistan, Tacikistan, Türkiye ve Özbekistan) ülke çapında pre-eliminasyon aşamasından eliminasyon aşamasına geçilmesi için kontrol çalışmaları devam etmektedir (7).

Sıtma geçmişte olduğu gibi bugün de Türkiye için önemli bir halk sağlığı sorunudur. Türkiye'nin Asya ve Avrupa arasında bir köprü görevi üstlenmesi,

komşu ülkelerde savaş ve yetersiz kaynaklar nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının kontrolünün yetersiz kalması, yılda 50000 göçmenin illegal yollarla Türkiye'ye girmesi gibi nedenlerle Türkiye'nin gelecekte Avrupa'da sıtma enfeksiyonunu taşıyan köprü rolü üstlenmesi kaçınılmazdır (10). Türkiye'de, 2005'te onaylanan Taşkent Deklarasyonuna göre güçlü siyasi kararlılık gösterilerek sıtma kontrol çalışmaları yoğunlaştırılmıştır (17). Ulusal sıtma eliminasyon stratejisi ve eylem planları, 2012'de bulaşın kırılmasını, 2015'te hastalığın ortadan kaldırılmasını amaç edinmiştir (7).

Türkiye'de, sıtma ile mücadelede elde edilen önemli başarıların yanı sıra, günümüzde hala sıtma olguları görülmektedir. Özellikle, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin sıtma endemik olması, zaman zaman sıtma olgularında gelgitlerin yaşanması nedeniyle, sıtma mücadelesinin aynı kararlılıkla devam ettirilmesi gerekmektedir.

Türkiye'de sıtma olgularının çoğunluğu yerli ya da intikal olgu olarak sınıflandırılmaktadır. 2008 yılında sıtma olgularının 49'u, 2009 yılı sıtma olgularının ise 46'sı yurtdışı kaynaklıdır. 2010 yılında 78 yurt dışı kaynaklı 9 nüks olgu tespit edilmiştir. Yerli olgu sayısı "0" (sıfır) dır. 2011 yılında, bir yerli yeni olgu Şanlıurfa'nın Akçakale ilçesinde tespit edilmiştir. 2010 yılında Türkiye genelinde 78 yeni olgu saptanmıştır (78). 2010, ülkemizde son 50 yılın en az sıtma olgusunun tespit edildiği yıldır.

Türkiye'deki yerli sıtma olgularının ana etmeni *P. vivax* olmakla birlikte son yıllarda yurt dışı kaynaklı *P. falciparum*'un neden olduğu sıtma olguları da sıklıkla görülmektedir (7). Türkiye'de en sık sıtma vektörlüğü yapan anofeller,



*Anopheles sacharovi*, *Anopheles superpictus*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles subalpinus*'dir.

Sıtma şüphesi acil bir durumdur ve kişi en kısa sürede bir sağlık merkezine başvurmalı ve hızlı bir şekilde tanısı konulmalıdır. Erken, hızlı tanı ve etkili tedavi sıtma morbiditesi ve mortalitesini azaltmak için anahtar rol oynar.

Halen sıtma tanısında kalın damla ve ince yayma kan örneklerinin mikroskopla incelenmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (54). Ancak bazen, mikroskopist *P. vivax* ve *P. ovale* gibi morfolojik olarak birbirine benzeyen türleri ayırt etmede, çok düşük parazitemili hastalarda, ilaç tedavisi nedeniyle morfolojisi bozulmuş olgularda ya da örneğin yanlış saklandığı durumlarda tanıda yeterli olmayabilir. İnsanlardaki sıtma enfeksiyonunu, parazitemi düzeyi %0.0005 veya 25 parazit/µl kan (her 8000 lökosit için 2.5 parazit,  $8 \times 10^3$  lökosit ve  $5 \times 10^6$  eritrosit/µl kan olduğu kabul edildiğinde) düzeylerinin altına düştüğünde tespit etme olasılığı hızla azalmaktadır. Tıbbi olarak önemi yoktur, çünkü bu kadar düşük düzeylerde parazitemi olması durumunda klinik bulguların olması çok nadirdir. Ancak dolaşımda bulunan bu parazitin tespitinin epidemiyolojik ve biyolojik önemi vardır (25, 65, 79). Böyle durumlarda doğrulayıcı moleküler testler kullanılarak *Plasmodium* türleri tespit edilebilir. Craig ve arkadaşları da mikroskopinin sıtma tanısında altın standart olamayacağını, düşük parazitemili olgularda ve miks enfeksiyonlarda paraziti saptayamadığını, mikroskopi sonuçlarının yorumlanmasında belirsizlik olduğunu ve preperasyon hazırlama prosedürlerinde uyuşmazlık olduğunu bildirmişlerdir (80). Sıtma konusunda uzman olan kişiler, tek bir negatif mikroskopi sonucu ile sıtma tanısının ekarte edilemeyeceğini söylemişlerdir. Akut ateş ve uygun hikâyesi olan hastalarda,

kalın damla ve ince yayma kan örneklerini tekrar incelemeden sıtma tanısının ekarte edilmemesi gerektiğini bildirmişlerdir (81). Hanscheid, orjinal kalın damla metodunun duyarlılığının %80-90 olduğunu, kalın damlada *Plasmodium*'ların saptanabilmesi için bir µl'de en az 5-20 parazitin bulunması gerektiğini, negatif sonuç rapor edilmeden önce en az 200 alanın incelenmesi gerektiğini bildirmiştir (82).

Thai-Myanmar sınırında yapılan çalışmalarda, hastalardan alınan kan örnekleri 10 farklı laboratuarda mikroskopi ile incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışmada, laboratuvarlar arasında özgüllük oranlarının %93,5 ile %98,3, duyarlılığın ise %92,6 ile %96,6 arasında değiştiği bildirilmiştir (83).

*Plasmodium*'ların tanısında kalın damla ve ince yayma kan örneklerinin mikroskopi ile incelenmesinin yanı sıra floresan boyama yöntemi, QBC yöntemi, hızlı tanısal testler ve moleküler tanı yöntemleri gibi alternatif tanı metodları da kullanılmaktadır (54, 81.).

*P. falciparum*'un genomik DNA'sını görüntülemek için fosfat ile işaretli probolar kullanmışlar, *P. falciparum* genomik DNA'sında birbiri ile sıkı sıkıya hibride olmuş iki DNA fragmanını pBR322 plazmid vektörüne klonlamışlardır. Daha sonra bu bölgelerden birini *Hind* III restriksiyon enzimi ile kesmiş, aynı vektör üzerinde klonlamışlardır. Sonuçta tekrarlayan 21 bp ünitelerinden oluşan bir fragman elde etmişler ve bu fragmanı *P. falciparum*'un saptanmasında hibridizasyon probu olarak kullanmışlardır (60).

*Plasmodium*'ların tanısı için 18S rRNA gen bölgesini hedefleyen özel primerler geliştirilmiştir (61, 62).

Daha sonraki çalışmalarda *Plasmodium*'ların rRNA'larının türe spesifik küçük ribozomal subüniteleri üzerine yoğunlaşmış ve elde edilen sonuçların duyarlılığının daha fazla olduğu görülmüştür. Ribozomal RNA, hücre içinde bulunan diğer DNA ve RNA'lardan daha yoğun olduğundan elde edilen sonuçlar daha net çıkmıştır, ancak stabilitesi daha az olduğundan başka suşlarla çapraz reaksiyonlar ortaya çıkmıştır. Bugün için dört ayrı sıtma suşuna ait RNA problemleri tespit edilmiş olup, bunların RNA içerisinde çok fazla sayıdaki tekrarları nedeniyle yüksek bir duyarlılığa sahip oldukları gösterilmiştir (1). *Plasmodium*'ların small-subünit RNA genleri hem cins hem de türe spesifik sekanslar içermektedir. Kurutulmuş kan örneklerinden bu RNA ekstrakte edildiğinde ve buna yönelik dört türe spesifik radyoizotopla işaretli problemler kullanıldığında 10–50 parazit varlığında bile *Plasmodium*'ların 4 türünün ayrımı yapılabilmektedir (59).

Halen *Plasmodium*'ların moleküler tanısında konvansiyonel PCR'nin yanı sıra nested PCR, seminested PCR, multiplex PCR ve Real-Time PCR başarıyla kullanılmaktadır (54, 63, 85, 86).

Snounou ve ark. , spesifik oligonükleotit primerler kullanarak, kırsal kesimden topladıkları kan örneklerinden dört *Plasmodium* türünü PCR ile tanımlamışlardır. 18S small-subünit rRNA genlerinde bulunan, türe ve cinse özgül küçük sekanslar amplifiye edilmiştir. Bu tekniğin *Plasmodium* türlerinin saptanmasında rutin mikroskopik tanıdan daha doğru ve duyarlı olduğunu, PCR'nin *Plasmodium* karma enfeksiyonları yüksek bir oranda saptayabildiğini bildirmişlerdir. Bu yöntemin epidemiyolojik verileri sağlamada mükemmel olduğunu bildirmişlerdir (87).

Nükleik asid teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak *Plasmodium*'ların saptanmasında DNA ve rRNA prob metodlarında da ilerleme olmuştur. Başlangıçta bu metodun kırsal kesimde kullanılmasında düşük duyarlılık oranları bulunmuş ama 1990'dan beri birçok PCR metodu geliştirilerek PCR'nin *Plasmodium*'ların tanısındaki duyarlılığı arttırılmıştır (88). *Plasmodium*'ların tanısında PCR, başlıca rutin tanı ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. PCR, epidemiyolojik çalışmalarda mikroskopinin kalite kontrolünün değerlendirilmesinde mükemmel bir tekniktir (89). Bununla beraber sıtmanın önemli bir sağlık problemi olduğu birçok ülkede PCR'nin tanıda kullanılmasına sıcak bakılmamaktadır. Bu bölgelerdeki yüksek bulaş ve maddi problemler PCR'nin tanısai bir metod olarak kullanılmasını sınırlamaktadır. Buna karşın düşük parazit yoğunluğunun olduğu klinikle bire bir uyuşmayan tabloların, nadir görülen, hakkında az şey bilinen türlerin tanısında ve tedavisinde yararlıdır. Mikroskopi 5–20 parazit/μl değerlerini tespit edebilmektedir ve eğer >100 parazit/μl'nin üzerinde parazit varsa hızlı tanısai testlerin duyarlılığının da %90'nın üzerinde olduğu bildirilmiştir. Buna karşı PCR yöntemi <5 parazit/μl ve muhtemelen 0.004 parazit/μl'i bile tespit edebilmektedir. Genel olarak PCR, sıtma şüphesi olup da kalın damlası negatif olan olguların saptanmasında, tanımlanmış türlerin doğrulanmasında ve tedaviye direncin izlenmesinde kullanılmaktadır (81).

Miks enfeksiyonlarda ve düşük parazitemi durumlarında, moleküler teknikler, sıtma parazitlerini saptayabilir ve tanımlayabilir (83).

Hanscheid, mikrolitrede 100'den fazla parazit varsa hızlı tanısai testlerin duyarlılığının %90'nın üzerine çıktığını, oysa PCR'nin mikrolitrede beş parazitin

altındaki parazitemi değerlerinde bile pozitif sonuç verebildiğini ifade etmiştir (81).

Coleman ve ark. , Batı Tayland'da yaptıkları aktif sürveyans çalışmasında laboratuvar ve saha mikroskopisi sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Çalışmada saha mikroskopisinde preparatlar 5-10 dakika süreyle x700 bytmelik ışık mikroskopunda, laboratuvarda ise 20 dakika süreyle x1000 bytmelik ışık mikroskopunda incelenmiştir.  $\mu$ l'de 5000'den fazla parazit bulunduğunda *P. vivax* ve *P. falciparum*'u pozitif saptama oranları laboratuvar ve saha şartlarında aynı iken,  $\mu$ l'de 50 parazitin bulunduğu parazitemili olgularda ise hem laboratuvar hem de saha mikroskopisinde hiç pozitif örnek saptanamamıştır. Çalışmada *P. falciparum* için saha mikroskopisinin özgüllüğü %99,3, duyarlılığı %10, *P. vivax* için ise özgüllük %99,2, duyarlılık %7,1 olarak bulunmuş ve saha mikroskopisinin özgül ama duyarlı bir yöntem olmadığı bildirilmiştir (90).

Mikroskopi, PCR ile karşılaştırıldığında, mikropkobik incelemede en sık görülen hatanın, ilk değerlendirmede türlerin yanlış tanımlanmasında ortaya çıktığı bildirilmektedir. Burada yapılan en sık hata, *P. falciparum*'un yanlışlıkla *P. vivax* olarak tanımlanmasıdır. Bu hatanın saha çalışmalarında görev yapan görevlilerin deneyimsiz olmasından, kan yayma preparatlarının hazırlanmasında kullanılan prosedürlerin farklılığı ve boyanın kalitesinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Bu durum, saha çalışmalarında pozitif bulunan örneklerin tekrar laboratuvarlarda uzman mikroskopistler tarafından değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Ama deneyimli mikroskopistler bile hala türlerin tanımlanmasında hatalar yapmakta ve mikst enfeksiyonları atlamaktadırlar (91).

**Tablo 7.** Sıtma tanısında ışık mikroskopisi ile PCR'nin karşılaştırılması (82)

Metod	Işık mikroskopisi	PCR
<i>Duyarlılık</i>	+++	+++++
<i>Uzman ihtiyacı</i>	+++	+++++
<i>Ek ekipman</i>	+ / ++	+++++
<i>Test süresi</i>	<i>Yavaş</i>	<i>Çok yavaş</i>
<i>Otomasyon</i>	<i>Uygun değil</i>	+++
<i>Tür tanımlama</i>	+++	+++++
<i>Tekrarlanabilirlik</i>	+++	+++
<i>Parazit sayısının hesaplanması</i>	+++	<i>Yok</i>
<i>Fiyat/Test (US\$)</i>	<i>0.03</i>	<i>&gt;3</i>

PCR için kan örnekleri filtre kâğıtlarına emdirilmekte veya EDTA'lı, PBS'li, sitratlı ve heparinli tüplere alınmaktadır (87, 92, 93). PBS içeren mikrosantrifüj tüplerine kan alınarak yapılan çalışmalarda en sık görülen problem, bakteri ve funguslara bağlı olarak gelişen kontaminasyondur. Bunu engellemek için tüplere 10 ünite/ml nistatin ve 25 µg/ml gentamisin ilave edilmektedir. Örnekler yedi gün +4 °C'de saklanabilmektedir (94, 95, 96, 97). Heparinli tüplere toplanan kan örneklerinde yaşanan en önemli problem ise PCR'nin heparin ile inhibe olmasıdır (98). Filtre kâğıdının kullanıldığı çalışmalarda genelde Whatman 3M kullanılmaktadır. Bunun başlıca avantajı, kan örneklerinin oda ısısında uzun süre saklanabilmesi ve plastik kaplar içinde rahatlıkla bir yerden diğerine taşınabilmesidir (92, 97). Filtre kâğıtlarında bulunan kurutulmuş kan örneklerinin, tropikal bölgelerde uzun süre kalsalar (12 ay) bile test sonuçlarının doğruluğunda bir hataya neden olmadığı ve aynı örnekte farklı gen bölgelerini araştırmakta da kullanılabilirdiği bildirilmektedir (89).

Bu tez çalışmasında, PCR çalışması için parmak ucu kan örnekleri Whatman 3M filtre kağıtlarına alınmıştır ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Filtre kağıtlarına alınan kanların depolanması için düşük ısıya ihtiyaç duyulmaması, bu yöntemle alınan kanın hemoliz olmaması büyük bir avantajdır. Bu yöntemin, aynı zamanda hastane ve çalışma laboratuvarından uzak kırsal bölgelerde çalışırken kanın kolaylıkla depolanmasına olanak sağladığı için yararlı olduğu söylenebilir. Bazı hastalardan alınan kan örnekleri ise EDTA'lı tüplere alınmış ve -80°C'de saklanmıştır.

DNA ekstraksiyonu için Chelex metodu, saponin lizis yöntemi, hızlı kaynatma yöntemi (rapid boiling) fenol-kloroform ekstraksiyon metodu gibi yöntemlerin yanı sıra Wizard TM Plus Minipres DNA saflaştırma sistemi, Isocode STIX PCR Template Preparation Dipstick yöntemi ve QIAamp DNA Blood Kit gibi ticari ekstraksiyon kitleri de kullanılmaktadır (85, 99, 100, 101). Bu çalışmada Filtre kağıtlarından DNA ekstraksiyonu için QIAamp DNA Mini Kit ve EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu için ise QIAamp DNA Blood Kit kullanılmıştır.

Kain ve ark. yaptıkları bir saha çalışmasında *P. vivax*'ı, PCR ile saptamaya çalışmışlardır. Bu çalışmada kan örnekleri, Whatman 3M filtre kâğıtlarına alınmış, Chelex-100 metodu ile ekstrakte edilmiş ve circumsporozoit gen bölgesini hedefleyen primerler kullanılmıştır. Sonuçlar mikroskopi ile karşılaştırıldığında mikroskobik olarak *P. vivax* olan 119 örneğin 108 tanesi PCR ile pozitif olarak bulunmuştur (97). Sethabutr ve ark. yaptıkları benzer bir çalışmada Chelex-100 metodunu kullanmışlardır. Çalışmada mikroskobik olarak

*P. falciparum* olan 103 örneğin 96 tanesini ve mikroskopik olarak negatif olan 155 örneğin 10 tanesini PCR ile pozitif olarak bulunmuştur (102).

Tham ve ark., genusa spesifik primerler ile tür bazında *P. falciparum* ve *P. vivax*'ın mitokondrial *coxI* genine spesifik primerleri kullanarak PCR sonuçlarını mikroskopi ile karşılaştırmışlardır. Tham ve ark. bu yöntemin mikrolitrede 4 *Plasmodium*'u saptayabildiğini, yöntemin en büyük avantajlarından birinin, örneğin çok az bir iş gücü ile hazırlanabilmesi olduğunu, kan emdirilmiş filtre kâğıtlarının oda sıcaklığında 3 yıl süreyle saklanabildiğini farklı *Plasmodium* türlerini ve miks enfeksiyonları saptamada duyarlılığının yüksek olduğunu ve dezavantaj olarak yöntemin ParaSight-F ve ICT Malaria Pf testlerine oranla daha uzun zaman aldığını bildirmişlerdir (103).

Kimura ve ark. yaptıkları bir çalışmada, sıtma hastalarından alınan kan örneklerini, mikrotiter plate hibridizasyon yöntemi ile değerlendirmişler ve sonuçları mikroskopi ile karşılaştırmışlardır. Her iki yöntemin sonuçları birbirine çok yakın çıkmıştır. Bu çalışmada ayrıca antimalaryal tedavi alan bazı hastalarda PCR sonuçları ile parazit yoğunluğu karşılaştırılmış bunların arasında bir paralellik olduğu ve PCR'nin 10 parazit/µl parazit yoğunluğunda pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir. Dört *Plasmodium* türünde de yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları tespit edildiğinden, PCR'nin sıtmanın klinik olarak değerlendirilmesinde, geleneksel mikroskopiye büyük ölçüde destek sağlayacağı bildirilmiştir (88).

Özensoy ve ark. *Plasmodium*'ların tanınması ve identifikasyonunda nested PCR'nin etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada, Adana bölgesinde 37 sıtmalı kişinin kan örnekleri alınmış, kalın damla ve ince yayma kan preparatlarının yanında kan örnekleri filtre kâğıtlarına emdirilmiştir. *Plasmodium* genus spesifik



primerlerle PCR uygulanmış, elde edilen ürüne *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malaria* ve *P. ovale*'ye özgü primerlerle nested-PCR yapılmıştır. Çalışmada toplam 37 örnekten 33'ü *P. vivax* olarak belirlenirken diğer sıtma türlerine rastlanmamıştır (104).

Singh ve ark. Malezya'da nested PCR kullanarak yaptıkları bir çalışmada hastane ve kırsal kesim örneklerini incelemişler, sonuçları mikroskopi ile karşılaştırdıklarında nested PCR'nin duyarlılığını %97.4 olarak bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada *P. vivax* ve *P. falciparum*'un mikst infeksiyonlarının saptanmasında nested PCR'nin mikroskopiye oranla çok daha hassas olduğu bildirilmiştir (89).

Khoo ve ark. *P. falciparum*'un 18S rRNA gen bölgesini hedefleyerek nested PCR metodunu uygulamışlar ve sonuçları mikroskopi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada nested PCR'nin hassasiyetinin %100 olduğu bildirilmiştir (85).

Zakeri ve ark. İran'da yaptıkları çalışmalarında, nested PCR kullanarak 18S rRNA gen bölgesini hedefleyerek *P. falciparum* ve *P. vivax*'ı saptadıklarını, nested PCR'nin duyarlılığının mikroskopiye oranla daha yüksek olduğunu, özellikle miks infeksiyonların saptanmasında ve düşük parazitemili hastaların tanısında mikroskopiye oranla daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir (105).

Sıtmanın incelenmesinde Giemsa boyamasıyla hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesiyle Nested PCR'nin karşılaştırması sonucu nested PCR'nin duyarlılığının ve sıtma parazitlerini saptama yeteneğinin daha fazla olduğu bulunmuştur (106). Aslan ve ark. yapmış oldukları çalışmada nested PCR'nin duyarlılığı düşük bulunmuştur (107).

Bu tez çalışmasında da, Snounou ve ark. nın (87) geliştirdikleri *Plasmodium* genus ve türe spesifik, 18S small-subunit ribozomal RNA (ssrRNA) gen bölgesini hedefleyen oligonükleotidler kullanılarak nested PCR yapılmıştır. *P. vivax*'ın genotiplemesinde en çok kullanılan hedef bölge olan circumsporozoit gen bölgesine özgü primerler kullanılarak ta nested PCR yapılmıştır. Amplifiye edilen gen bölgesine PCR-RFLP analizi uygulanarak *P. vivax*'ın önemli varyantlarının (VK210 ve VK247) ayrımı yapılmıştır. Mikroskopik tanıyla çalışmaya katılanların %7.2'sinde *Plasmodium* saptanmışken nested PCR ile %9.8'inde *Plasmodium* saptanmıştır. Mikroskopik bakıyla *Plasmodium*'un saptanamamasının nedeni örneklerin parazitemi düzeylerinin düşük olması olabilir. Bu çalışmanın sonuçları, Aslan'ın sonuçlarının aksine diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. Nested PCR'nin mikroskopik tanıya göre duyarlılığı %100, özgüllüğü %97.2, pozitif prediktif değeri %73.3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, *Plasmodium* genus spesifik primerlerle nested PCR uygulanmış, elde edilen ürüne *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malaria* ve *P. ovale*'ye özgü primerlerle nested-PCR yapılmıştır. *Plasmodium* türe özgü spesifik primerler kullanılarak yapılan nested PCR sonucu *Plasmodium* saptanan 15 örnekten 14'ü *P. vivax* olarak tanımlanmıştır. Bir örnek, genus spesifik primerle *Plasmodium* spp. olarak saptanmasına rağmen ikinci yapılan türe spesifik primerlerin kullanıldığı nested PCR ile 4 *Plasmodium* türünden herhangi biri olarak tanımlanamamıştır. Söz konusu bu örnek mikroskopik bakıyla *P. vivax* olarak tanımlanmıştır. Bu örneğin PCR ile negatif çıkmasının nedeni, lama yayılan kandan DNA ekstraksiyonu yapılması olabilir ya da bu örnek, 4 *Plasmodium* türünden başka bir türe ait olabilir.

Dünyada yapılan farklı PCR çalışmalarında, farklı gen bölgeleri incelenmiş ve bunlar mikroskopi ile karşılaştırılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Farklı hedef bölgelerinin karşılaştırılması (59)

Hedef gen	Tanımlanan tür	Duyarlılık (PCR) %	Duyarlılık (mikroskopi) %	Yanlış negatif (PCR) %	Yanlış pozitif (PCR) %
Tekrarlayan 21-bp ünite	<i>P.falciparum</i>	88	60	7	21
Circumsporozoid geni	<i>P.falciparum</i>	98	100	2	Veri yok
Circumsporozoid geni	<i>P.vivax</i>	96	92	2	4
Pf155/RESA	<i>P.falciparum</i>	100	66	0	21
18S rRNA	<i>P.falciparum</i>	93	77	5	16
	<i>P.vivax</i>				
	<i>P.malaria</i>				
	<i>P.ovale</i>				
DHFR-TS	<i>P.falciparum</i>	100	100	0	0

*RESA: ring-infected erythrocyte surface antigen*  
*DHFR-TS, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase*

Kawamoto ve ark. Güney Vietnam’da *P. ovale*’yi saptamak için 18S rRNA gen bölgesini hedefleyerek yaptıkları çalışmalarında 18S rRNA gen bölgesinde ortaya çıkabilecek mutasyon ve delesyonların PCR sonuçlarını etkileyebileceğini bildirmişlerdir (94).

Koltaş ve ark. benzer bir çalışmayı Çukurova bölgesinde uygulamışlar, mikroskopi ile PCR’yi karşılaştırmışlardır. Mikroskobik incelemede *P. vivax* sıtma tanısı konan 50 ve sıtma olmadığı saptanan 10 kişiden (kontrol grubu) alınan kan örnekleri filtre kağıdına emdirilmiş ve toplanan örneklerden elde edilen DNA, *P. vivax* circumsporozoit (CS) genomuna ait Pv5 ve Pv6 oligonükleotid primerleri ile amplifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ürün %0.8’lik

agaroz-jel elektroforezinde yürütüldükten sonra *P. vivax* CS genomunun Pv5 ve Pv6 primerlerine ait 700 baz çiftlik DNA bantları değerlendirilmiştir. 50 pozitif örneğin %40'ı PCR ile pozitif olarak tespit edilmiştir (108).

Zeyrek ve ark.'ları Şanlıurfa'da yaptıkları çalışmada, *P. vivax*'ın merozoite surface protein-1'in 19-kd C-terminal bölgesine (PvMSP119) karşı oluşan antikorları ELISA kullanarak araştırmışlardır. *P. vivax* ile meydana gelen 82 sıtma hastası arasında seropozitifliğin %85 olduğunu belirlemişlerdir. IgM pozitifliği %69.5, IgG pozitifliği %53.6 ve IgA pozitifliği %7.3 olarak tespit edilmiştir (109).

Sıtma açısından PCR, başlıca iki konuda büyük bir açığı kapatmıştır. Bunlar *P. falciparum*'un mutasyon nedeni ile gösterdiği ilaç dirençlerinin belirlenmesi ve *P. vivax*'a karşı aşı çalışmalarında büyük umutlar bağlanan circumsporozoite proteinin farklı olduğu bazı varyant formların saptanmasıdır (110). PCR'nin düşük parazit yükü bulunan kronik ve sıklıkla asemptomatik olan enfeksiyonların tanısındaki önemli değeri ortadadır (89). Sıtma parazitlerinin saptanmasında duyarlı PCR uygulaması sıtma enfeksiyonu hakkındaki bilgileri genişletir ve sıtmanın kontrol ve tedavisinde uygulanan ilkelere değişikliği gerektirir. Örneğin, mikst enfeksiyonlar, geleneksel tanı yöntemi olan mikroskopiye göre PCR ile daha sık saptanır (63, 89). PCR bazlı çalışmalar genetik çeşitliliğin tanımlanmasına olanak sağladığından sıtma epidemiyolojisi için daha fazla veri sağlayacaktır. Sıtma cinsine özgü rPLU3 ve RPLU4 primerlerinin kullanılmasıyla her örnekte 1-10 parazit genomu saptanabilir (65)

Aynı *Plasmodium* türlerinin farklı alt tiplerinin, enfeksiyon kliniği, rekrudesens özelliği, immünolojik çapraz reaksiyon, ilaç direnci ve çeşitli

vektörlerle bulaşma özellikleri gibi faktörlerle değiştiği bilinmektedir. Parazit popülasyonunun yoğunluğu ile immünolojik, patolojik ve epidemiyolojik faktörler arasındaki ilişkinin iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu amaçla *Plasmodium* türlerinin alt tiplerinin araştırılması amacıyla moleküler yöntemler kullanılarak (PCR, PCR-RFLP, DNA sekans analizi vs) genotiplendirme çalışmaları yapılmaktadır. Genotiplendirme için parazitin farklı gen bölgeleri kullanılmaktadır. En yaygın olarak CSP, MSP1-C terminal, EBA-175, MSP1, MSP2, MSP3 ve GLURP gibi proteinler kullanılmaktadır (25, 111).

Contamin ve ark. PCR'nin sıtma aşısı çalışmalarında araştırılan MSA-1, MSA-2, CSP ve yüksek polimorfik S antijeni gibi genlerin genetik farklılıklarını araştırmada başarı ile kullanıldığını bildirmişlerdir (112).

Cui ve ark. bugün *Plasmodium*'ların aşısı çalışmalarında denenen antijenler arasında CSP, MSP-1, AMA-1, Pvs25, Pvs28, TRAP ve DBP bulunduğunu, bu antijenlerin çoğunun polimorfik özellikte olduğunu ve insanlarda immun yanıt oluşturduklarını, Bu polimorfik özellikteki antijenlerden yapılan aşuların çeşitli allelik varyasyonları taşıyan parazitlere karşı daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (113).

*P. vivax*, dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde endemiktir ve *P. vivax* circumsporozoite proteini dünyanın her yerinde bulunmaktadır ve etkin tanısı çok önemlidir. *P. vivax* sıtma çeşitleri, ilaç direncine ve kontrol ölçümlerinin yetersiz kalmalarına neden olabilen vektör tercihi, semptomların şiddeti ve ilaç tepkisi gibi farklı karakteristik özellikler gösterebilirler (114).

*P. vivax*'ın genotipleme için en yaygın kullanılan gen bölgesi olarak circumsporozoit protein (CSP) kullanılmıştır. *P. vivax* circumsporozoit proteini

(Pvcsp) rekombinant sıtma aşı çalışmalarının başlıca hedefidir. Pvcsp'nin amino asit sekansının, PCR-RFLP ile her biri tekrarlayan karakteristik tandemler içeren, VK210 ve VK247 olmak üzere iki önemli tipe genotiplendirilmiştir (76).

*P. vivax* CS genotiplerinin prevalansının ve dünyadaki dağılımını belirlemek için Tayland, Meksika, Papua Yeni Gine, Peru, Afganistan (Pakistan), Hindistan ve Batı Afrika olmak üzere farklı yedi bölgeden sıtmalı 243 bireyden filtre kağıtlarına kan alınmıştır. Yedi bölgede VK247 CS genotipinin baskın olduğu, Tayland'da %83, Papua Yeni Gine'de %90, Meksika'da %9, diğer bölgelerde ise VK247 CS genotipinin VK210 CS genotipiyle eşit dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada *P.vivax* VK247 genotipinin yaygın bir şekilde dağılım gösterdiği, prevalansının ise coğrafik olarak farklılık gösterdiği belirtilmiştir (92).

Zeyrek ve ark. Şanlıurfa'da yaptıkları çalışmada, 88 sıtma hastasının kan örneklerini nested PCR ile dört farklı *Plasmodium* türü için ayrı primerler kullanarak tiplendirmiş ve 88 hastanın tümünü *P. vivax* olarak tanımlamışlardır. Bunların DNA örneklerinden 58'inde *P. vivax* Pvcsp amplifiye edilmiş ve amplifiye edilen gen bölgesine PCR-RFLP analizi uygulanmış, örneklerin %65.5'i VK210, %34.5'i VK247 olarak tanımlanmıştır. İzolatların hiçbirinde karışık tipe rastlanılmamıştır (115).

Azerbaycan'da yapılan bir çalışmada 36 *P. vivax* izolatının tümünün VK210 olduğu bildirilmiştir (116).

İran'da, CSP geninin araştırıldığı bir çalışmada, iki tip izolatın (VK210 ve VK247) bulunduğu ve İran'ın güneydoğu bölgelerinden elde edilen izolatların çoğunlukla VK247 olduğu; kuzeyinde sadece bir izolatın VK247 olduğu

bildirilmiştir. Aynı çalışmada, örneklerin %75'nin VK210, %17.5'nin VK247 ve %12'sinin karışık tip olduğu bildirilmiştir (117).

Enfektif sporozoitlerin CSP'si, sıtma rekombinant aşularının gelişimi için ana hedef olduğu bildirilmiştir (118, 119, 120). *P. vivax* VK210 ve VK247 genotip prevalanslarının coğrafik dağılımlarının direkt olarak vektörlerin dağılımlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (121).

Bu tez çalışmasında, *P. vivax*'ın genotiplendirilmesi için circumsporozoite protein (CSP) kullanılmıştır. Bu gen bölgesinin seçilme nedenleri şunlardır:

- 1.** Sıtma endemik bölgelerde sıtma türlerinin ve polimorfizmin belirlenmesinde en sık kullanılan gen *P. vivax* circumsporozoite proteindir. Bu çalışma da sıtma türlerinin ve polimorfizmin belirlenmesinde *P. vivax* circumsporozoite protein kullanılmıştır. Bu çalışma, aynı zamanda temel epidemiyolojik verileri sağlayacak, deneysel aşı çalışmaları ve saha çalışmaları için faydalı olacaktır.
- 2.** CSP, *P. vivax* aşı adayıdır. CSP bazlı aşı deneme çalışmaları Türkiye'de önemli olabilir.
- 3.** *P. vivax* suşlarının ilaç direnci göstermeye başlaması önemli bir sorundur. İn vitro *P. vivax* kültürleri mevcut değildir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, sıtma endemik bölgelerde invivo ilaç etkinlik çalışmalarında gözlenen re-enfeksiyon (başarılı tedavi) ve rekrudesensi (tedavi başarısızlığı) ayırt etmede Pvcsp'nin uygun bir genetik belirteç olup olmadığını değerlendirmede yardımcı olacaktır.

Amplifiye edilen gen bölgesine PCR-RFLP analizi uygulanmış ve örneklerin %14.3'ü VK210 ve %85.7'si VK247 olarak tanımlanmıştır. İki genotip, farklı türlerdeki anofel vektörlerin, VK210 ve VK247 varyantlarla meydana gelen enfeksiyona duyarlılıklarıyla ilişkili olabilir. Bu iki genotipin

bölgedeki dağılımı, bölgedeki iklim farklılıkları, yükseklik ve sıtma endemik bir bölgeye özgü vektör anofellerin türleriyle ilişkili olabilir.

Hastalar ve epidemiyolojik koşullarının analizi yapıldığında hepsinin tarım işçisi olduğu görülmüştür. Sıtma olgularının %61.54'ünün üşüme, titreme, terleme ve baş ağrısı gibi sıtmaya özgü semptomlara sahip olduğu, %23.07'sinin herhangi bir şikayetinin olmadığı ve %15.39'unun ise halsizlik, yorgunluk ve bulantı-kusma gibi şikayetlerinin olduğu belirlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen bireylerin %31.8'inin geçmişte sıtma ilacı Primakin ve Klorokin kullandığı, % 68.2'sinin ilaç kullanmadığı saptanmıştır.

*Plasmodium* pozitif olguların yaş ortalamaları  $25.92 \pm 15.46$ ; cinsiyet dağılımı 7 kız (%46.7), 8 erkek (%53.3) olarak bulunmuştur. *Plasmodium* pozitifliği ile olguların yaşları ve cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ( $p > 0.05$ ).

Sıtma kontrolündeki temel problem ilaç direncindeki yaygınlıktır. *P. falciparum*'da görülen yaygın ilaç direncinin toplumda oluşturduğu sıkıntıların aynısının *P. vivax*'da da ortaya çıkmaması için *P. vivax*'ın ilaç dirençli suşlarının erken aşamada saptanması gerekmektedir. *P. falciparum*'da görülen anti-folat ilaç direncindeki nokta mutasyonların saptanması hızlı moleküler tanı metodlarıyla mümkün olmaktadır. *P. vivax*'da klorokin ve primakin direncinin saptanabilmesi için önce hedef proteinlerin keşfedilmesi beklenmektedir.

*P. vivax*'ın in vitro kültürü kolay olmadığı için ilaç direncinin saptanabilmesi in vivo çalışmalara bağlıdır. Fakat özellikle endemik bölgelerde yapılan in vivo çalışmalarda ortaya çıkabilecek relaps ve reinfeksiyonların



birbirinden ayırt edilememesi bu çalışmalar açısından sorun oluşturmaktadır. Bu ilaç direnci probleminin, PCR ile genotiplendirmenin geliştirilmesi ile çözülebileceğine inanılmaktadır (112). Bu çalışmanın da ilaç direnç çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Nested PCR, mikroskopi ile karşılaştırıldığında maliyetinin yüksek olduğu, uzun zaman aldığı, deneyimli personel, uygun bir laboratuvar, özenli ve dikkatli çalışmayı gerektirdiği görülmüştür. Ancak paraziteminin düşük olduğu durumlarda mikroskopi ile yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuç verme sonucu insanların gereksiz yere ilaç almasının önlenmesine olanak sağladığından tanıda nested PCR'nin kullanılmasının duyarlılığı arttıracığı sonucuna varılmıştır. Nested PCR ile sıtma parazit türlerinin doğru tanısı ve doğru tedavisi sıtmalı bireylerin sayısını azaltacaktır. Böylece, sıtma enfeksiyonunun bir bölgeden başka bir bölgeye yayılma riski azalacaktır. Sıtma türlerinin gerçek insidanslarını belirlemede yararlı olacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmanın düşük parazitemili sıtma olgularının tanısında, miks enfeksiyonların saptanmasında, *Plasmodium vivax*'a karşı yapılan aşı çalışmalarında (CSP bazlı) , ilaç direnci ile ilgili çalışmalarda, in vivo ilaç etkinliği çalışmalarında yararlı olacağı düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Özcel MA. Sıtma. 2. Baskı, İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:16, 1999.
2. Brown WH. Basic Clinical Parasitology. Fourth Edition, New York: Appleton Century Crofts, 1975.
3. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. 2. Baskı, Sivas: yayınevi, 2002.
4. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A Large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 2004; 363: 1017-24.
5. Markel EK, John DT. Medical Parasitology. Fifth Edition, Landon: Saunders Company, 1999: 90-102.
6. Özcel MA. Sıtma Epidemiyolojisi. Ed: Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları. Bölüm II. Kan ve Dokularda Görülen Protozoon Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 22. İzmir, 2007: 79-140.
7. World Malaria Report 2011. [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/index.html/05.05.2012](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html/05.05.2012).
8. Malaria Map of the World. (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.html/28.12.2010>).
9. World Malaria Report 2009. [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/index.html/05.05.2012](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html/05.05.2012).
10. Özbilgin A, Topluoğlu S, Es S, et al. Malaria in Turkey: Successful control and strategies for achieving elimination. Acta Tropica 2011; 120: 15-23.
11. Alten, B, Kampen, H, Fontenille, D. In: Takken, W., Knols, B.G.J. (Eds.), Malaria in Southern Europe: Resurgence from the past? Emerging Pests and Vector-Borne Diseases in Europe. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands: 2007: 35–58.
12. Akdur R. Sıtma Temel Bilgiler. Ankara: Palme yayınları, 2004.
13. <http://www.saglik.gov.tr/SSDB/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF404F9755767D76FFD46405743274FF07/> 01.01.2012.
14. GAP son durum 2010. <http://www.gap.gov.tr/gap/gap-son-durum/> 06.03.2012
15. DSİ Genel Müdürlüğü. [www.dsi.gov.tr/22.02.2012](http://www.dsi.gov.tr/22.02.2012)
16. Benek, S. Şanlıurfa İlinin Tarımsal Yapısı, Sorunları ve Çözüm Önerileri. Coğrafi Bilimler Dergisi 2006;4 (1): 67-91.
17. Zeyrek FY, Tachibana S, Yuksel F, Doni N, et al. Limited polymorphism of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene in isolates from Turkey. Am J Trop Med Hyg 2010; 83: 1230-7. [CrossRef]
18. Özcel MA. Sıtmanın önemi, korunma ve sıtma savaşı. Özcel MA. Ed. Sıtma, Malaria. 2. Baskı, İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, Ege Üniversitesi Basımevi 1999: 237-273.

19. Lynne S. Garcia, David A. Bruckner. Diagnostic Medical Parasitology. Third Edition. ASM Pres, Washington, 1997.
20. Tahar R, Ringwald P, Basco LK. Heterogeneity in the circumsporozoite protein gene of *Plasmodium malariae* isolates from sub-Saharan Africa. Molecular and Biochemical Parasitology. 1998; 92:71-78.
21. Ferreira MU, da Silva Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2004;11(6):987-995.
22. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT. Malaria. Lancet 2005;365:1487–1498.
23. Weatherall DJ, Miller LH., Baruch DI., Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ. Malaria and the red cell. Hematology. 2002; 35-57.
24. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. 1995. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. baskı Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları:15
25. Yıldız Zeyrek F: Sıtma. (Korkmaz M, Ok ÜZ (Eds): Parazitolojide Laboratuvar. pp.329, Türkiye Parazitoloji Derneği. Yayın No:23. 2011.
26. Henning L, Felger I, Beck HP. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. Acta Tropica. 1999;72(2):149-155.
27. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. Critical Care. 2003, 7:315-323.
28. Konemann EW. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Five Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
29. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi, 1999.
30. Özcel M A. GAP ve parazit hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 11, Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1993:29-52.
31. Özcel M A. Güneydoğu Anadolu Projesini Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği, Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1995: 31-56.
32. Guidelines for the treatment of malaria/World Health Organization. WHO/HTM/MAL/2006: 1108.
33. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. (Editors). Dacie and Lewis Practical Haematology. 10th Edn. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2005.
34. [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures\\_Html/28.12.2010](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures_Html/28.12.2010).
35. Gilles HM. Epidemiology of Malaria. Chapter in Essential Malariology. Gilles&Warrel (eds). Edward, Arnold Publ. 1993: 124-129,
36. Kawamoto F, Billingsley PF. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy. Parasitol Today 1992; 8: 69-71.
37. Trager W, Living together. The biology of animal parasitism. Newyork, N. Y: Plenum Press; 1986.

38. Hollingdale, MR. Is culture of the entire *Plasmodium* cycle in vitro, now a reality? *Parasitol Today* 1992; 8:223.
39. Ponnudurai T. Plasmodiidae: Erythrocytic stages. Taylor AER and JR Baker, editors. In vitro methods for parasitic cultivation. New York, NY: Academic Pres. 1987:153-179.
40. Mazier D, Beaudom.RL, Mellouk S et al. Complete development of hepatic stages of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Science* 1985; 227: 440-2.
41. Calvo-Calle JM, Moreno A, Eling WMC et al.. In vitro development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* in human cell lines. *Exp Parasitol* 1994; 79:362-73.
42. Kamasuta C, Pavanand K, Chantakulkij C, et al. Complete developraent of the liver stage of *Plasmodium falciparum* in a humanhepatoma line. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 607-11.
43. Mazier D, Collins WE, Mellouk S, Procell PM, et al. *Plasmodium ovale*: in vitro development of hepatic stages. *Exp Parasitol* 1987; 64: 393-400.
44. Millet P, Collins WE, Fisk TL, Nguyen-Dinh P. In vitro cultivation of exoerythrocytic stages of the human malaria parasite *Plasmodium malariae*. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 470-3.
45. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continous culture. *Science* 1976; 193: 673-5.
46. Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium* Spp. *Clin Microbiol Reviews* 2002: 355-64.
47. Divo AA, Geary TG, Davis NL, Jensen JB. Nutritional requirenents of *Plasmodium falciparum* in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuons growth. *J. Protozool* 1984; 32: 59-64.
48. Geary TG, Divo AA, Bonanni LC, Jensen JB. Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. III. Further observations on essential nutrients and antimetaboljtes. *J. Protozool* 1985; 32: 608-13.
49. Read M, JE Hyde. Simple in vitro cultivation of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* (erythrocytic stages) suitable for largescale preparations. Hyde JE, editor. *Methods in molecular biology, Protocols in molecular parasitology*. Totowa N. J: Humana Press, Inc; 1993; I21: 43-55.
50. Jensen MD, Conley M, Helstowski LD. Culture of *Plasmodium falciparum*: the role of pH, glucose, and lactate. *J Parasitol* 1983; 69: 1060-7.
51. Brockelman CR, Tan-ariya P, Laovanitch R. Observation on complete schizo gony of *Plasmodium vivax* in vitro. *J Protozool* 1985; 32: 76-83.
52. [http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/serology.html/](http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/serology.html/) 04.03.2012.
53. Zeyrek. FY, Babaoglu A, Demirel S, Erdoğan DD, et al. Analysis of Naturally Acquired Antibody Responses to the 19-kd C-Tenninal Region of Merozoite Surface Protein-1 of *Plasmodium vivax* from Individuals in Şanlıurfa, Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2008; 78: 729-32.

54. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:66-78.
55. Singh, et al. Field and laboratory comparative evaluation of rapid malaria diagnostic tests versus traditional and molecular techniques in India *Malaria Journal* 2010; 9: 191.
56. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Results of WHO products testing of malaria RDTs: Round 1. 2008.
57. The use of rapid diagnostic tests Roll Back Malaria, WHO Regional Office for the Western Pacific and UNDP/World Bank WHO/UNICEF Special Programme for Research. and Training in Tropical Diseases. Geneva: 2004.
58. Playford EG, Walker J. Evaluation of the ICT Pf/Pv and the Optimal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travelers. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4166-71.
59. Weiss J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8(1): 113-130.
60. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*. 1997; 27(10): 1135-1145.
61. Cropley IM, Lockwood DN, Mack D, Pasvol G, Davidson RN. Rapid diagnosis of *falciparum malaria* by using the ParaSight F test in travelers returning to the United Kingdom: prospective study. *BMJ*. 2000; 321 (7259): 484-485.
62. Schneider P, Wolters L, Schoone G, Schallig H, Sillekens P, Hermsen R, Sauerwein R. Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol*; 2005; 43: 402-405.
63. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Dorosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* , 1993; 61:315-320.
64. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H. Moleküler Parazitoloji. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, 2009: 215-223
65. Snounou G, Singh B. Nested Polymerase Chain Reaction Analysis of *Plasmodium* Parasites. Doolan DL, editör. *Malaria Methods and Protocols*. Towata, New Jersey: Human Pres; 2002: 189-203.
66. Bourniquel AA, Bickle TA, Complex restriction enzymes: NTP-driven molecular motors. *Biochimie* 2002; 84: 1047–1059.
67. Murray NE. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 412–434.
68. Pingoud A, Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 3705–3727.
69. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 269–270

70. Kong H, Roemer SE, Waite-Rees PA, Benner JS, Wilson GG, Nwankwo DO. Characterization of BcgI, a new kind of restriction-modification system. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 683–690.
71. Wilson GG. Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 2539–2566.
72. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem.* 1997; 43: 2021–2038.
73. Kant JA. DNA restriction enzymes and RFLPs in medicine. *Methods Biochem Anal.* 1996; 36: 129–149.
74. Bardakcı F, Yenidünya AF. Moleküler Biyoloji . Yıldırım A, Bardakcı F, Karataş M, Tanyolaç (eds). Nükleik Asit Analiz Teknikleri : Bölüm 13. 1. basım, Ankara: 2007: 519–550.
75. Rebase. The Restriction Enzyme Database <http://rebase.neb.com/rebase/enz/> 03.03.2012.
76. Imwong M, Pukrittayakamee S, Grüner AC, Renia L, et al. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using Pvcs and Pvmsp I. *Malaria journal* 2005; 4: 1-13.
77. Farcas GA, Zhong KJ, Mazzulli T, Kain KC. Evaluation of the Real-Art Malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *J Clin Microbiol*, 2004; 42: 636-638.
78. <http://www.sb.gov.tr/TR/belge/1-13438/saglik-istatistikleri-yilligi-2010.html/> 02.03.2012
79. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 609-12.
80. Craig MH, Sharp BL. Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1997; 91: 279-282.
81. Hanscheid T, Grobusch M.P. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitology.* 2002;18(9):395-398.
82. Hanscheid T. Diagnosis of malaria; a review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical and Laboratory Hematology* 1999; 21: 235-245.
83. Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5: 485-95.
84. Çeber K, Alahverdiyev A, İbrahimov H. *Plasmodium*ların hızlı tanısında modifiye Quantitative Buffy Coat (QBC) yönteminin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 2001; 25: 330-341.
85. Khoo A, Furuta T, Abdullah NR, Bah NA, et al. Nested polymerase chain reaction for detection of *Plasmodium falciparum* infection in Malaysia. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*1996; 90 (1): 40-41.

86. Cox-Singh J, Mahayet S, Abdullah MS, Singh B. Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using simple sampling and DNA extraction. *International Journal for Parasitology*. 1997; 27: (2) 1575-1577.
87. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993; 58 (2) : 283-292.
88. Kamwendo DD, Dzinjalama FK, Snounou G, Kanjala MC, Mhango CG, Molyneux ME, Rogerson SJ. *Plasmodium falciparum*: PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental, and cord blood of pregnant Malawian women and their infants. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 96 (2): 145-149.
89. Singh B, Cox-Singh J, Miller AO, Abdullah MS, et al. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996; 90 (5): 519-521.
90. Coleman RE, Maneechai N, Rachaphaew N, Kumpitak C, et al. Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in western Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 67(2):141-144.
91. Ohrt C, Purnomo, Sutamihardja MA, Tang D, Kain KC. Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials. *Journal of Infectious Diseases*. 2002; 186 (4): 540-546.
92. Kain KC, Brown AE, Webster HK, Wirtz RA, et al. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30 (7): 1863-1866.
93. Barker RHJr, Suebsaeng L, Rooney W, Wirth DF. Detection of *Plasmodium falciparum* infection in human patients: a comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989; 41 (3):266-272.
94. Kawamoto F, Miyake H, Kaneko O, Kimura M, et al. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34 (9):2287-2289.
95. Arai M, Mizukoshi C, Kubochi F, Kakutani T, Wataya Y. Detection of *Plasmodium falciparum* in human blood by a nested polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994; 51 (5): 617-626.
96. Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Arai M, Kawai S, Yamane A, Wataya Y. Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33 (9): 2342-2346.

97. Kain KC, Brown AE, Mirabelli L., Webster HK. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *Journal of Infectious Diseases*. 1993; 168 (5): 1323-1326.
98. Farnert A, Arez AP, Correia AT, Bjorkman A, Snounou G, do Rosario V. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 93 (1): 50-53.
99. Kain K.C, Keystone J, Franke ED., Lanar DE. Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. *Journal of Infectious Diseases*. 1991; 164 (1): 208-210.
100. de Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C, de Micco P. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Research in Microbiology*. 1992; 143 (8): 785-790.
101. Xainli J, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, et al. Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *Journal of Immunology*. 2002; 169 (6): 3200-3207.
102. Sethabutr O, Brown AE, Panyim S, Kain KC, et al. Detection of *Plasmodium falciparum* by polymerase chain reaction in a field study. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992; 166 (1): 145-148.
103. Tham JM, Lee SH, Tan TM, Ting RC, Kara UA. Detection and Determination Species of Malaria Parasites by PCR: Comparison with Microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria Pf Tests in a Clinical Environment. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37 (5): 1269-1273.
104. Özensoy S, Pinherio L, Alkan MZ, Özbek Y, et al. Enfeksiyonlarının Nested Polimerase Chain Reaction (PCR) ile İdentifikasyonu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1995; 19 (2):181-187.
105. Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria Parasites by Nested PCR in South-eastern, Iran: Evidence of Highly Mixed Infections in Chahbahar District. *Malaria Journal*. 2002; 1-2.
106. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, et al. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. *American Society for Microbiology Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44 (3): 1087-1089.
107. Aslan G, Seyrek A, Kocagöz T, Ulukanlıgil M, et al. The Diagnosis of Malaria and Identificatin of *Plasmodium* Species by Polymerase Chain Reaction in Turkey. *Parasitology International* 2007; 56: 217-220.
108. Koltaş IS, Özcan K, Serin MS, Köksal F, Aksungur P. Çukurova Bölgesinde *P.vivax* Sıtma Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Kullanılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1999; 23 (2): 119-121.
109. Zeyrek FY, Babaoğlu A, Demirel S, Erdoğan DD, Ak M, Korkmaz M, Çoban C. Analysis of Naturally Acquired Antibody Responses to the 19-kd C-Terminal Region of Merozoite



- Surface Protein-1 of *Plasmodium vivax* from Individuals in Sanliurfa, Turkey. Am J Trop. Med. Hyg 2008; 78 (5): 729-732.
110. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevi. Ankara, 2001.
111. Snounou G. Genotyping of *Plasmodium* spp. Malaria Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine 2002; 72: 103-106.
112. Contamin H, Fandeur T, Bonnefoy S, Skouri F, et al. PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33 (4): 944-951.
113. Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. Trends in Parasitology 2003; 19 (5): 220-226.
114. Gopinath R, Wongsrichanalai C, Córdón-rosales C, Mirabelli L, et al. Failure to detect a *Plasmodium vivax*-like malaria parasite in globally collected blood samples. J Infect Dis 1994; 170: 1630–1633.
115. Zeyrek FY, Yüksel MF, Özkan AT, Dağcı H, Snounou G. Şanlıurfa *Plasmodium vivax* Suşlarının PCR ile Tiplendirilmesi ve Circumsporozoit Protein (CSP) Gen Farklılıkları. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özetleri. 2008; s.128.
116. Leclerc M, Menegon M, Cligny A, Noyer J. et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates from Azerbaijan. Malaria Journal 2004; 3:40.
117. Zakeri S, Mehrizi AA, Dijadid ND, Snounou G. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. Tropical Medicine and International Health 2006; 11: 729-737.
118. Qari SH, Shi YP, Goldman IF et al. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. The Lancet 1993; 341, 780–783.
119. Gonzales JM, Hurtado S, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Variants of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96:709–712.
120. Herrera S, Corradim G, Arévalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. Trends Parasitol 2007; 122–127.
121. Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernandez JE, Nettel JA et al. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. Am J Trop Med Hyg 2000; 62:122-127.

## 8. EKLER

### Hasta takip formu

Örnek Numarası:

Örneğin Alındığı Tarih :

Örneğin Alındığı Merkez:

Adı Soyadı :

İmza:

Cinsiyeti: Erkek

Kadın

Kan Grubu:

Eğitimi :

Mesleği :

Gebelik Durumu: Var

Yok

Yaşı:

Ailede Göçer İşçi Durumu: Var

Yok

Ateşli Hastalık veya Sıtma öyküsü: Var

Yok

Ailesinde Sıtma Öyküsü: Var

Yok

Kronik hastalık öyküsü (Diabet, Kanser, Kalp Hst. vb.): Var

Yok

Klinik Belirtiler: Ateş:

Terleme:

Titreme:

Baş ağrısı:

Bulantı, Kusma

Halsizlik, Yorgunluk

Karaciğer, Dalak Büyüklüğü

Diğer Şikayetler:

Sıtma Tedavisi:  Görmemiş

Halen Görüyor

Görmüş (Tarih)

Kullandığı Sıtma İlaçları:

Direk Mikroskopi Sonucu:  Negatif

Pozitif

Evinin yakınlarında akarsu veya açıkta kanalizasyonun geçme durumu: Var

Yok

Ailesinde mevsimlik ve tarım işçisinin bulunması: Var

Yok

Başka ile seyahat öyküsü:  Evet (Gidilen şehir)

Hayır

Yurt dışına seyahat öyküsü:  Evet (Gidilen ülke)

Hayır

Tuvalet yeri:  Ev içi

Ev dışı

Yaşanılan ev tipi:  Yerleşik

Çadır

Adres (Köyü, Mezrası, Mahalle, Sokak, Kapı Numarası vs. belirtilecek.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı soyadı:</b>	Nebiye YENTÜR DONİ
<b>Doğum Yeri:</b>	Elazığ
<b>Medeni Durumu:</b>	Evli ve 2 çocuk sahibi
<b>Yabancı Dil:</b>	İngilizce, Almanca

### Öğrenim Durumu

1977-1982	Elazığ Cumhuriyet İlkokulu
1982-1986	Elazığ Anadolu Lisesi (Ortaokul)
1986-1989	Elazığ Anadolu Lisesi (Lise)
1995-1997	Fırat Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu (Ön Lisans)
2000-2005	Harran Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu ( Lisans)
2006-2008	Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans-Tıbbi Mikrobiyoloji)
2009	Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Tıbbi Mikrobiyoloji, Doktora devam ediyor)

### Görevler

1997-2000	Fırat Üniversitesi Fırat Üniversitesi Tıp Merkezi (Sağlık Teknikeri)
2000-2007	Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi (Sağlık Teknikeri)
2007-	Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu (Öğretim Görevlisi)
2011-2012	Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuar Teknikleri Program Başkanı
2012	Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Müdür Yardımcısı

### Yayınlar

**Yüksek Lisans Tezi:** Bağırsak Parazitlerinin 0–6 Yaş Arası Çocuklarda Fiziksel, Mental ve Nöromotor Gelişim Üzerine Etkileri (**Danışman: Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK**)

**Article in the International Referee Journals / Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar :**

- 1- YILDIZ ZEYREK F, TACHIBANA S, YUKSEL F, DONİ N, PALACPAC N, ARISUe N, HORII T, COBAN C, TANABE K. ‘Limited polymorphism of the *Plasmodium vivax* msp1 gene (pvmsp1) in isolates from Turkey’ Am. J. Trop. Med. Hyg, 83(6), 2010, pp. 1230–1237.
- 2- KORUK İ,ŞİMŞEK Z, KORUK S, DONİ N, GÜRSES G. ‘Children health status of migratory and seasonal farmworkers in Şanlıurfa’ Child Care Health Dev, 2010 Nov; 36 (6): 888-94.
- 3- ŞİMŞEK Z, KORUK İ, YENTÜR DONİ N. An Operational Study on Implementation of Mobile Primary Healthcare Services for Seasonal Migratory Farmworkers. Matern Child Health Journal. 2012, s: 10995-

**Article in the National Referee Journals/Ulusal Hakemli Dergilerdeki Yayınlar**

- 1- **YENTÜR DONİ N, ŞİMŞEK Z, GÜRSES G, ÖZER M. S.** Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğrencilerinin Öz-Etkililik-Yeterlik Düzeyleri Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, Cilt:4, Sayı:12 (2009).

**Poster Presentation in the International Conferences and Symposiums / Uluslararası Konferans ve Sempozyumlarda Sunulan Poster Bildiri**

- 1- **KORUK İ, ŞİMŞEK Z, KORUK S, DONİ N, GÜRSES G.** Children health status of migratory and seasonal farmworkers in Şanlıurfa’ 12. Dünya Halk Sağlığı Kongresi 27 Nisan- 1 Mayıs 2009 İstanbul.
- 2- **ŞİMŞEK Z, KORUK İ, KORUK S, GÜRSES G, DONİ N.** Prevalance of Staphylococcus aureus and Intestinal parasites among Food-handlers in Sanliurfa 12. Dünya Halk Sağlığı Kongresi 27 Nisan- 1 Mayıs 2009 İstanbul.

**Poster Presentation in the National Conferences and Symposiums / Ulusal Konferans ve Sempozyumlarda Sunulan Poster Bildiri**

- 1- **YENTÜR DONİ N, ŞİMŞEK Z, GÜRSES G, ÖZER M. S.** Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğrencilerinin Öz-Etkililik-Yeterlik Düzeyleri. (III. Ulusal Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulları Sempozyumu, Van, 2008)
- 2- **ÖZER M. S. , CEBECİ B, YENTÜR DONİ N, GÜRSES G.** Şanlıurfa İl Merkezinde Hizmet Veren Sağlık Kurumları İşveren/Yöneticilerinin Sağlık Teknikerlerini Değerlendirmeleri (III. Ulusal Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulları Sempozyumu, Van, 2008)
- 3- **YENTÜR DONİ N, YILDIZ ZEYREK F, GÜRSES G, TÜMER S, ŞİMŞEK Z.** Giardiasis ve Kriptosporidiasis Tanısında Antijen Tarama Yöntemleri ile Mikroskopik Bakımın Karşılaştırılması.17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu Program ve Özet Kitabı. S: 234. (4-10 Eylül 2011/KARS)
- 4- **YENTÜR DONİ N, YILDIZ ZEYREK F, ŞİMŞEK Z, GÜRSES G, KAYA M, ŞAHİN İ.** Bağırsak Parazitlerinin 0–6 Yaş Arası Çocuklarda Fiziksel, Mental ve Nöromotor Gelişim Üzerine Etkileri. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu Program ve Özet Kitabı. S:287. (4-10 Eylül 2011/KARS)
- 5- **GÜRSES G, YILDIZ ZEYREK F, YENTÜR DONİ N, TÜMER S, ŞİMŞEK Z.** ‘Şanlıurfa Çocuk Yuvası ve Çocuk Evlerinde Bağırsak Parazitleri Yaygınlığının İncelenmesi’. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu Program ve Özet Kitabı. S:285. (4-10 Eylül 2011/KARS).
- 6- **YENTÜR DONİ N, GÜRSES G, DİKME R.** Topraktan Bulaşan Nematodlar. I. Tarım Sağlığı ve Güvenliği Sempozyumu Çevresel ve Mesleki Riskler. S:247-249. 6-7 Nisan 2012/Şanlıurfa.
- 7- **GÜRSES G, YENTÜR DONİ N, DİKME R.** GAP Bölgesindeki Tehlike Schistosomiyazis. I. Tarım Sağlığı ve Güvenliği Sempozyumu Çevresel ve Mesleki Riskler. S: 282-284. 6-7 Nisan 2012/Şanlıurfa.

- 8- GÜRSES G, YENTÜR DONİ N, DİKME R. Leishmaniosis. I. Tarım Sağlığı ve Güvenliği Sempozyumu Çevresel ve Mesleki Riskler. S: 285-287. 6-7 Nisan 2012/Şanlıurfa.
- 9- GÜRSES G, TÜMER S, İDEMEN F, ÜNER İ, ÖZÇINAR H, YENTÜR DONİ N, YILDIZ ZEYREK F. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Kist Hidatik Şüphesiyle Başvuran Hastaların Değerlendirilmesi.6. Ulusal Hidatidoloji Kongresi/12-14 Eylül 2012/Gaziantep.

**Oral Presentation in the National Conferences and Symposiums/Ulusal Konferans ve Sempozyumlarda Sunulan Sözlü Bildiri**

- 1- YENTÜR DONİ N, GÜRSES G, DİKME R, ÖNCÜL M. GAP Bölgesinde Tarım İşçilerini Tehdit Eden Mikroorganizmalar. I. Tarım Sağlığı ve Güvenliği Sempozyumu Çevresel ve Mesleki Riskler. S: 200-204. 6-7 Nisan 2012/Şanlıurfa.
- 2- YENTÜR DONİ N, GÜRSES G, DİKME R, ŞİMŞEK Z, MURATOĞLU M. Şanlıurfa ilköğretim okulları 2010-2012 yılları kutanöz leishmaniasis aktif tarama sonuçları. 15.Ulusal Halk Sağlığı Kongresi 2-6 Ekim 2012/Bursa.