

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA YÖRESİNDE GÖRÜLEN SITMA
OLGULARININ TANISINDA KONVANSİYONEL
YÖNTEMLERLE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN
(PCR) KARŞILAŞTIRILMASI VE TÜR TAYİNİ**

Mehmet Fehmi YÜKSEL

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

ŞANLIURFA
2008

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA YÖRESİNDE GÖRÜLEN SİTMA
OLGULARININ TANISINDA KONVANSİYONEL
YÖNTEMLERLE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN
(PCR) KARŞILAŞTIRILMASI VE TÜR TAYİNİ**

Mehmet Fehmi YÜKSEL

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kurumu Başkanlığı tarafından 840 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2008

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarımın gerçekleŐmesinde beni destekleyen, yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecbesinden yararlandığım, titiz, disiplinli ve yenilikçi çalıŐmalarından dolayı yanında çalıŐmaktan onur duyduğım, hiçbir zaman özveri ve hoŐgörüsünü esirgemeyen değerli hocam, tez danıŐmanım sayın Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e, yine asistanlık eğitimim süresince bilgilerine baŐvurduĐım, deneyimlerinden çok Şey Ğrendiğim Anabilim Dalı BaŐkanımız sayın Prof. Dr. Sami TAŐÇI'ya ve Mikrobiyoloji asistanlığım süresince eğitimimde katkısı olan Anabilim Dalı Ğretim yesi sayın Doç. Dr. Mehmet BAYRAKTAR'a, her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili eŐim Zeynep, kızım Gülru Deniz ve aileme, tez çalıŐmam süresince laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini hissettiğim ve uyum içinde çalıŐtıĐım, her zaman yardım ve dostluklarını gördüğüm tüm arkadaŐlarıma en içten teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Şekiller Dizini	i
Tablolar Dizini	ii
Kısaltma ve Simgeler	iii
Özet	iv
Abstract	v
I.- Giriş	1
II.- Genel Bilgiler	3
-----A- Tarihçe.....	3
-----B- Epidemiyoloji.....	4
-----C- Morfoloji ve Evrimi.....	7
-----1- İnsandaki Evrim.....	7
-----2- Anofeldeki Evrim.....	8
-----3- Morfoloji.....	9
-----D- Klinik.....	12
-----E- Tanı.....	14
-----1- Mikroskopi.....	14
-----2- Floresan Boyama.....	15
-----3- Quantitative Buffy Coat (QBC) Yöntemi.....	16
-----4- Hızlı Tanısal Testler.....	17
-----a- OptiMAL Testi.....	17
-----b- ICT Malaria Testi.....	18
-----c- MAKROmed Rapid Malaria Testi.....	19
-----d- ParaSight-F Testi.....	19
-----e- SD Bioline Malaria Antigen testi.....	20
-----5- Moleküler Tanı Yöntemleri.....	21
-----a- Örneklerin Toplanması, Saklanması ve Taşınması.....	23
-----b- Ekstraksiyon Yöntemleri.....	24
-----c- Amplifikasyon Yöntemleri.....	25
III.- Gereç ve Yöntem	28
-----A- Hasta ve Örnekler.....	28
-----B- Kullanılan Yöntemler.....	28
-----1- Kalın Damla ve İnce Yayma Kan Preparasyonu.....	29
-----a- Gereçler.....	29
-----b- Reaktifler.....	29
-----c- Kalın Damla Kan Preparasyonu.....	29
-----d- İnce Yayma Kan Preparasyonu.....	30
-----e- Parazitolojik Değerlendirme.....	30
-----2- Hızlı Tanı Testi.....	31
-----3- Real Time PCR Yöntemi.....	31
-----a- Gereçler.....	31

	<u>Sayfa</u>
-----b- Reaktifler.....	31
-----c- Stok Solüsyonların Hazırlanması.....	32
-----d- DNA Ekstraksiyonu.....	32
-----e- Amplifikasyon.....	34
-----f- İstatistik Analizler.....	34
IV.- Bulgular.....	36
-----A- Örnekler.....	36
-----B- Mikroskopi Bulguları.....	38
-----C- Hızlı Tamı Testi Bulguları.....	38
-----D- Real-Time PCR Bulguları.....	38
-----E- Epidemiyolojik Veriler.....	39
V.- Tartışma ve Sonuç.....	41
VI.- Kaynak	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil-1. Türkiye Sıtma Haritası.....	6
Şekil-2. <i>Plasmodium</i> 'ların İnsanlardaki ve Dişi Anofeldeki Evrimi.....	9
Şekil-3. <i>Plasmodium</i> Türlerinin Mikroskopik Görünümleri.....	11
Şekil-4. Akridin Oranj ile Boyanmış <i>P. falciparum</i> Trofozoitlerinin Floresan Mikroskopik Görünümleri.....	16
Şekil-5. OptiMAL Testin Çalışma Mekanizması.....	18
Şekil-6. ICT Malaria Testinin Çalışma Mekanizması.....	19
Şekil-7. ParaSight-F Testinin Çalışma Mekanizması.....	20
Şekil-8. PCR'in Mekanizması.....	27
Şekil-9. <i>Plasmodium</i> Genus Spesifik Primerlerle Oluşan Grafikler.....	39
Şekil-10. <i>P.vivax</i> Spesifik Primerlerle Oluşan Grafikler.....	40

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo-I. Paraziteminin Klinikle İlişkisi.....	15
Tablo-II. Hızlı Tanısal Testlerin Karşılaştırılması.....	21
Tablo-III. Sıtma Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması.....	23
Tablo-IV. Hasta Bilgileri ve Uygulanan Testlerin Sonuçları	36-37
Tablo-V. Testlerin İstatistiksel Sonuçları.....	38
Tablo-VI. Hastaların Epidemiyolojik Verilerinin Mikroskopi, Hızlı Tanı Testi ve PCR ile Karşılaştırılması.....	41
Tablo-VII. Yurtdışı Kaynaklı Sıtma Vakalarının Parazit Türüne Göre Dağılımı.....	42
Tablo-VIII. Arai ve Ark.'nın Yaptıkları Çalışmanın Sonuçları.....	47
Tablo-IX. Tham ve Ark.'nın Yaptıkları Çalışmanın Sonuçları.....	48
Tablo-X. Farklı Hedef Gen Bölgelerinin Karşılaştırılması.....	50

KISALTMA VE SİMGELER

PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Real Time PCR
D.S.Ö.	Dünya Sağlık Örgütü
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
QBC	Quantitative Buffy Coat
G6PDH	Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation, Yaygın Damar İçi Pıhtılaşması
DDT	Dikloro Difenol Trikloroethan
GAP	Güneydoğu Anadolu Projesi
pLDH	<i>Plasmodium</i> Laktat Dehidrogenaz
bp	baz pair
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
HRP-II	Histidine Rich Protein-II, Histidinden Zengin Protein-II
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPD	Pozitif Prediktif Değer
NPD	Negatif Prediktif Değer
CI	Confidence Interval
Ark.	Arkadaşları
°C	Santigrat Derece
RESA	Ring infected Erythrocyte Surface Antigen
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DHFR-TS	Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase
MSA-1	Merozoite Surface Antigen-1
MSA-2	Merozoite Surface Antigen-2
MSP-1	Merozoite Surface Protein-1
MSP-2	Merozoite Surface Protein-2
CS	Circumsporozoite
CSP	Circumsporozoite Protein
AMA-1	Apical Membrane Antigen-1
Pvs25	<i>Plasmodium vivax</i> Surface Protein 25
Pvs28	<i>Plasmodium vivax</i> Surface Protein 28
TRAP	Thrombospondin-Related Anonymous Protein
DBP	Duffy Binding Protein
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mM	Milimolar
pH	Asidite

I- GİRİŞ

Sıtma eski çağlardan beri tanınan ve günümüzde tropikal bölgelerdeki gelişmekte olan ülkelerde yılda 300-500 milyon kişide görülen bir hastalıktır. Bu hastaların 2-3 milyonunun öldüğü ve bulaşıcı enfeksiyon hastalıkları arasında sıtma nedeni ile ölümün 6 ile 8. sırada yer aldığı belirtilmiştir (1-7).

Ülkemizde 2007 yılı verilerine göre 358 sıtma olgusu Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaş Daire Başkanlığı kayıtlarında bulunmaktadır. Ancak, Güneydoğu Anadolu bölgesinde bu sayının çok daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalara göre, *P.vivax* sıtmasına yakalanmış bir hasta, nöbetleri esnasında tanısı konsa dahi, ortalama bir ay kadar çalışamaz durumda kaldığı bildirilmektedir. Bu da büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu gelir kaybı dışında da Sağlık Bakanlığı'nın yılda 3 milyon YTL'ye varan sıtma savaş bütçesini, belediyelerin, turistik tesislerin ve halkın sivrisineklerle yaptıkları mücadele masraflarını da dikkate alırsak, sıtmanın ülkemize yıllık 15-20 milyon YTL civarında bir ekonomik kayba neden olduğu söylenebilir (8,9).

Sıtmada geleneksel tanı, ince yayma ve kalın damla preparatların incelenmesi ile konulmaktadır ve bu altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, bununla beraber bu yöntemin çeşitli dezavantajları bilinmektedir. Paraziteminin az olduğu dönemlerde periferik yayma incelemesi başarısız kalmaktadır. Geleneksel yöntemle tanı konulabilmesi için çok sayıda mikroskopik alan incelenmesi gerekmekte, bu da oldukça zahmetli olmakta, zaman kaybına neden olmakta ve deneyimli personele ihtiyaç duyulmaktadır. Parazitin türü, mikroskopistin ihmali, kan yaymalarının hazırlanması ve boyanması sırasında yapılan hatalar bazen geleneksel tanı yöntemlerinin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle pek çok araştırma laboratuvarı sıtma tanısında alternatif yöntemler geliştirmeye çalışmaktadır. Bunlardan birisi de moleküler tanı yöntemleridir (9).

Bu tez çalışmasındaki amacımız, moleküler tanı yöntemlerinden Real-Time PCR'ın sıtma hastalığı tanısında yerini araştırmak ve sonuçlarımızı periferik yayma ve hızlı tanı testleri ile karşılaştırmaktır. Konvansiyonel tanı yöntemlerinin yetersiz olduğu durumlarda moleküler tanı yöntemlerinin yararlı olabileceğine inanıyoruz. Ayrıca bu çalışmayla da, sıtma

ile ilgili epidemiyolojik veriler de ÷lkemizin hizmetine sunulacaktır. Bu verilerin sıtma ile savaşa katkıda bulunacağını dñřñnñyoruz.

Ayrıca bu tez çalışmasının sıtmaya karşı yapılan aşı çalışmalarına ve ilaç direnci ile ilgili çalışmalara katkıda bulunacağını dñřñnñyoruz.

II. GENEL BİLGİLER

A. TARİHÇE

Sıtma, dünya tarihine diğer enfeksiyonlara oranla daha fazla damgasını vurmuş bir hastalıktır. Savaşların sonuçlarına, nüfusların değişmesine, dünyadaki farklı ülkelerin büyümelerine ve gelişmelerine etki etmiştir (10). Sıtma insanlık tarihinin ilk yazılı kayıtlarında yer alan hastalıklardan biridir. Hintli ve Mısırlı doktorlar, yaklaşık 3500 yıl kadar önce sıtmanın belirtilerini tanımlamışlardır. Mısırlılar, hastalıkla ilişkili olarak sivrisineklerin önemini kavramışlardır (11). Sıtmanın Mezopotamya, Eti ve Grek uygarlıklarının çökmesine neden olan en önemli etmen olduğu kabul edilmektedir. Hipokrat, her gün gelen, üçüncü ve dördüncü gün gelen ateşleri tarif etmiştir. İsa'dan önce ikinci yüzyılda yaşayan Kapadokya'lı Arete de batakliklarla dalak büyümesi arasındaki ilişkiye dikkati çekmiştir. Jacquier, 1743'de sıtma için malaria (kötü hava) adını kullanmış ve ateşli hastalıkların batakliklardan yükselen kötü havanın solunması ile oluştuğunu ortaya atmıştır. Giovanni Maria Lancisi, 1707'de sivrisineklerin sokarak, ısırarak kötü etkenleri kanımıza enjekte ederek sıtmayı bulaştırdığını, Juan Lopez adında bir Cizvit papazı da, kınakınanın sıtma tedavisinde etkili olduğunu bildirmiştir (9).

1880 yılında Laveran adında bir Fransız doktor, ilk defa ışık mikroskobu kullanarak sıtmalı hastaların kan örneklerinde etkeni saptamıştır. Daha sonra bu örnekleri metilen mavisi ile boyamış ama memnun edici bir sonuç alamamıştır (12). Laveran, bu bulgusunu 23 Kasım 1880'de Paris'teki "Academie de Medicini" toplantısında bildirmiş ve bu parazite o zamanlar *Oscillaria malariae* adını vermiştir. Meckel, 1847'de yuvarlak veya iğ şeklinde ve içinde düzensiz boya taneleri bulunan protoplazma kitlelerini görmüş, Francis Delafield, 1872'de sıtmada en sabit bulgunun kanda kara veya kırmızı ufak boya parçacıklarının bulunması olduğunu bildirmiştir (9). St. Petersburg'da Dimitri Romanowsky, 1891 yılında eozin Y ve metilen mavisini karıştırarak enfekte eritrositlerde parazitin sitoplazmasının mavi ve kromatin yapısının kırmızı renkte boyandığını gözlemlemiştir (12).

Marchiafava ve Agelo Celi, parazite *Plasmodium* adını vermişler; Alber Freeman ise 1882'de sıtmanın insanlara sivrisineklerin sokması ile bulaştığını bildirmiştir. Camillo Golgi, 1886'da eritrositler içindeki şizogoniye tarif ederek sıtma nöbetlerinin merozoitlerin kana dökülmesi aşamasında meydana geldiğini, gün aşırı ve üç günde bir gelen iki çeşit sıtma hastalığının bulunduğunu göstermiştir. Bu hastalığa neden olan etkenlere sırasıyla 1889'da *Plasmodium var. tertiana* ve 1890'da *Plasmodium var. quartana* adlarını vermiştir. Fritz Richard Schaudinn, 1902'de sporozoitlerin doğrudan doğruya eritrositlere girişini gördüğünü bildirmiştir. Fakat zamanla bunun doğruluğu üzerinde kuşkular oluşmuş ve 1948'de karaciğerde bir eritrosit öncesi şizogoni döneminin olduğu ispat edilmiştir (9).

Ülkemizde ilk ele alınan büyük sağlık problemi sıtmadır. Şubat 1925'de Ankara'da, Mayıs ayında Adana'da ve Temmuz ayında da Aydın'da, İstanbul Bakteriyolojihanesinde yetiştirilen elemanlarla sıtma savaşı çalışmaları başlamıştır. Belki de en önemlisi, 26 Mayıs 1926'da "Etibbanın sıtma enstitülerinde staj mecburiyeti hakkında kanun" ve 13 Mayıs 1926'da "Sıtma Mücadelesi Kanunu" yayınlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü ve UNICEF ile yapılan işbirliği ile 1957 yılından itibaren, ülkemizden sıtmanın eradikasyonu çalışmalarına başlanmıştır (9).

B. EPİDEMIYOLOJİ

İnsanlarda hastalık yapan dört *Plasmodium* türünden *P. vivax* ve *P. falciparum*, sıtma enfeksiyonlarının %95'inden, özellikle *P. vivax* tüm sıtma enfeksiyonlarının %80'inden sorumludur. *P. vivax*, dünyada geniş bir yayılım gösterir; tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde, *P. falciparum* ise genel olarak tropikal bölgelerde görülür. *P. malariae*'nin dağılımı sporadiktir. *P. ovale* ise daha çok Batı Afrika ve bazı Güney Pasifik adalarında görülür (10).

Genel olarak sıtma, yaş, cins, ırk ayırımı yapmayan ve duyarlı olan herkesi tutan bir hastalıktır. Ancak *P. ovale*'ye karşı yalnızca Batı Afrika ve Pasifik yerlileri duyarlı olup diğer ırkların bu türe karşı doğal direnci olduğu bilinmektedir. Afrika yerlileri, diğer ırklara oranla *P. falciparum*'a daha duyarlıdır, *P. vivax*'a karşı daha dirençlidir. İmmun sistemi bozuk olan

kişiler kötü prognoz açısından en başta gelen riskli grubu oluşturmaktadır. Bunları çocuklar ve gebeler izlemektedir (9).

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 °C'nin üzerinde seyretmesi gerekir. Çünkü parazit, bu sıcaklığın altında anofelin vücudundaki evrimini tamamlayamaz (6). 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 (9).

İnsanda hastalık oluşturan dört *Plasmodium* türü için insan hem ara konak hem de rezervuar konaktır. Hem son konak hem de vektörü ise dişi *Anopheles* sivrisinekleridir. Yurdumuzda sıtma vektörlüğü yönünden en önemli *Anopheles* türleri *Anopheles sacharovi* ve *A. superpictus*'dur. *Plasmodium* türleri, insanlara dişi anofel kan emerken bulaştığı gibi kan ve doku nakli, konjenital ve kontamine enjektörlerin kullanılması ile de bulaşabilir. Gebelik esnasında sıtma geçiren kadınların yaklaşık %1'nin bebeklerinde konjenital sıtma görülmektedir (6,13). 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, G6PDH enzim eksikliği ve Akdeniz anemisi olanlar sıtmayı daha ağır geçirmektedirler (9,13).

Sıtma riski açısından Türkiye dört bölgeye ayrılmakta olup, bu bölgeler Şekil-1'deki harita da görülmektedir. Birinci derecede riskli bölge Güney ve Güneydoğu Anadolu illerimizden oluşmaktadır. İkinci derecede riskli bölge ise, Akdeniz, Ege ve Marmara, üçüncü bölge İç Anadolu, dördüncü bölge ise Karadeniz ve Kuzeydoğu Anadolu bölgelerindeki illerden oluşmaktadır (14).

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 bölgesinde daha fazladır (14).



Şekil-1. Türkiye Sıtma Haritası

STRATA II: Genellikle, Akdeniz'in Anamur Burnu'ndan batıda kalan bölgesi, Ege Bölgesi ile Marmara ve Trakya illerinden oluşur. Bu bölgede, yerleşim birimi bazında ve zaman zaman olgular görülmez hale gelir. Ancak, parazit geldiği zaman yerli bulaş yaparak olgu sayıları gerek yerleşim birimi gerekse bölge boyutunda epidemiler yapar. Diğer bir anlatımla, bu bölge sıtma açısından sık sık epidemiler görülen bölgedir (14).

STRATA III: Genellikle İç Anadolu illerinden oluşur. Bu bölgede, bölge boyutunda, il boyutunda epidemiler görülmez. Ancak insanların başka bölgelerde enfekte olması ve

buraya paraziti getirmesi halinde yer yer yerli bulaş oluşur. Bölge boyutunda ve il boyutunda olmasa bile yerleşim birimi boyutunda lokal epidemiler görülebilir (14).

STRATA IV: Karadeniz ve Kuzeydoğu Anadolu illerini kapsar. Bu bölgede yerli bulaş görülmesi çok enderdir. Ancak hariçten gelen sporadik olgular görülebilir (14).

C. MORFOLOJİ ve EVRİMİ

1- İNSANDAKİ EVRİM

Sıtmanın vektörü dişi anofel, insandan kan emerken tükrük bezlerinde bulunan sporozitler insanın kanına geçer. Kana geçen sporozitler yaklaşık yarım saat içinde karaciğer parankim hücrelerine (hepatosit) gider ve burada pre-eritrositik dönem (**primer ekzo-eritrositik dönem**) başlar (6,10,13). Sporozitlerin karaciğer parankim hücrelerine girmesinde, sporozit yüzeyinde bulunan circumsporozoite proteinin (CSP) önemli bir rolü vardır. Sporozitlerin yüzeylerinde bulunan CSP, immundominant bir antijen olup, bütün *Plasmodium* türleri tarafından pre-hepatik sporozit döneminde oluşturulur ve yapısı hepsinde birbirine benzer. Karaciğer parankim hücreleri, CSP'yi tanıyarak sporozitleri içlerine alırlar (15). Hepatosit içine giren sporozit, yuvarlak veya oval bir şekil alır ve tekrar tekrar 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. Sporozitlerin bir kısmı ise karaciğer parankim hücrelerinde latent bir şekilde yaşamaya devam ederler (**sekonder ekzo-eritrositer şizogoni**). Bu latent haldeki sporozitlere 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.malariae*'da görülmez (9,10,13,16,17,18).

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 (9).

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 yapısını da boyalarla boyanmayan büyük bir vakuol, bu vakuolü çevreleyen az miktarda sitoplazma ve halka şeklindeki ince sitoplazmanın inceldiği tarafta da çekirdek bulunur. Bu görünüm taşlı bir yüzüğe benzer. Boyalı preparatlarda sitoplazma mavi, çekirdek ise parlak kırmızı renkte boyanır (6,10,13). Genç trofozoitlerden daha sonra sırasıyla ameboid yapıdaki olgun trofozoit, bunun nükleusunun parçalanmaya başlamasıyla genç şizont ve bundan da olgun şizont gelişir. Olgun şizont içinde 12-24 tane merozoit vardır. Daha sonra eritrositler parçalanır ve merozoitler eritrositlerden kana dökülürler. Eritrositlerde geçen bu döneme *eritrositer şizogoni* adı verilir (9,10). 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 merozoitlerden şizont gelişmez, bunun yerine dişi ve erkek gametositler gelişir (10).

2- ANOFELDEKİ EVRİM

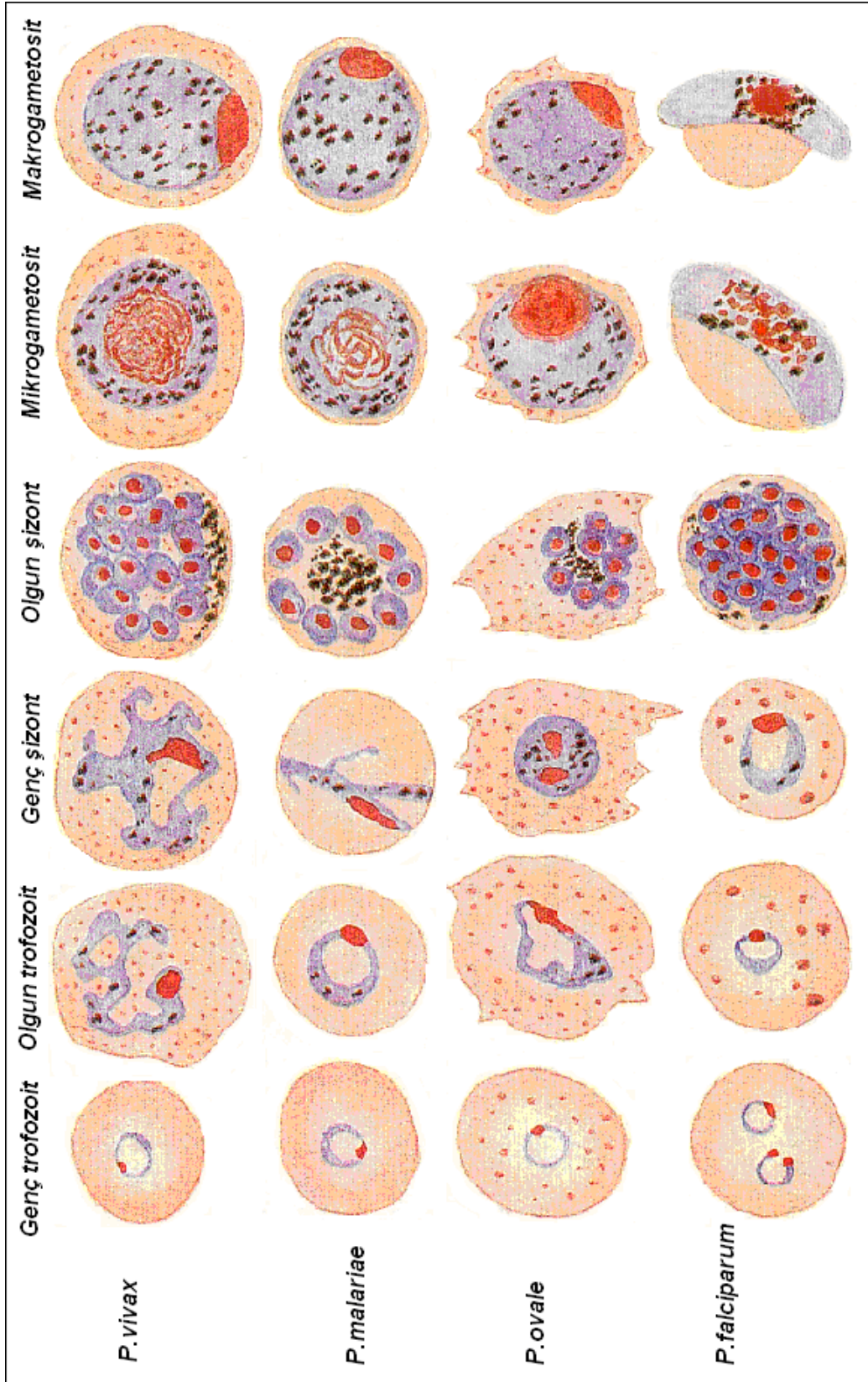
Anopheles cinsi dişi sivrisinekler, sıtmal hastalardan kan emerken bunların kanlarından makrogametosit (dişi) ve mikrogametositleri (erkek) alırlar. Bunlar sivrisineğin midesinde makrogamet ve mikrogamete dönüşür. Mikrogametositlerden mikrogamet oluşumu eksflajellasyon ile olur. Daha sonra makrogamet içindeki nükleus, yüzeye yaklaşır ve burada bir çıkıntı oluşturur. Bu çıkıntıya mikrogamet penetre olur ve böylece döllenme başlar. Döllenen 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 sporozoitler hemosöle ve buradan da sivrisineğin tükürük bezlerine yerleşir. Dişi anofel, beslenmek için insanlardan kan emerken bu sporozoitleri de insanlara

Plasmodium falciparum, her yaşıta eritrositleri enfekte eder. Enfekte eritrositler normal büyüklüktedir. Eritrosit içinde Maurer lekeleri görülür. Periferik kanda sadece halka ve gametosit formu görülür. Genç trofozoit formu küçüktür. Eritrositin ancak 1/5'ini kaplar. Birden fazla nukleus ve bir eritrosit içinde birden fazla halka formuna sık olarak rastlanılır. Gametositleri karakteristik olarak muz şeklindedir. Mikrogametositler, makrogametositlere oranla daha açık mavi renktedir. Periferik kanda olgun trofozoit, genç şizont ve olgun şizont formlarına rastlanılmaz. Çünkü bunların gelişimi iç organların kapillerlerinde olur. Yalnızca olgun trofozoitlere şiddetli enfeksiyonların seyri sırasında rastlanılır (7,9,10,20).

Plasmodium ovale'de genç eritrositleri enfekte eder; enfekte eritrositler normalden daha büyüktür. Eritrositlerin kenarları çentiklidir. Schüffner granülleri görülür ve bunlar *P.vivax*'da görülenlere oranla daha büyük ve koyudur. Halka formu *P.vivax*'a benzer ama ondan daha büyüktür. Olgun trofozoitlerde vakuol görülmez. Olgun şizont içinde 8–12 tane merozoit bulunur. Gametositleri, *P.vivax*'a benzer ama daha küçüktür (9,10)

Plasmodium malariae, olgun eritrositleri enfekte eder. Diğerlerinden farklı olarak enfekte eritrositler normal büyüklükte veya normalden daha küçüktür. Olgun şizontlarda 12'den fazla merozoit, rozet şeklinde dizilmiştir. Gametositleri, *P.vivax*'a benzemekle beraber pigmentleri daha kaba ve koyudur (7,9,10,20).

İnsanlarda hastalık oluşturan dört *Plasmodium* türünün değişik evrelerdeki mikroskopik görünimleri Şekil-3'te gösterilmiştir (10).



Şekil-3. *Plasmodium* Türlerinin Mikroskopik Görünümleri (10)

D- KLİNİK

Hastalar, enfekte dişi anofelin sokmasından sonra, bir hafta veya biraz daha fazla süreyle asemptomatiklerdir. 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 (10). Şizogoni sonucunda kana dökülen merozoitler, pigment ve eritrosit artıkları, aktive makrofajlardan tümör nekroz faktör salgılanmasına neden olmaktadır (6,13).

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 (10). Ateş 39–41 °C'ye kadar yükselir, beraberinde baş ağrısı vardır (6). Birkaç saat sonra hastada şiddetli bir terleme olur ve terlemeyle beraber vücut sıcaklığı normale veya normalin biraz altına düşer (10). Terleme dönemi 2-3 saat kadar sürer. Bu süre sonunda hasta yorgun düşüp uykuya dalar (13).

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 fragilitesinin artması ve eritrosit üretiminin kemik iliği tarafından baskılanması bulunmaktadır (10).

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 (10).

Plasmodium falciparum sıtması tropikal bölgelerde görülür ve klorokin direncine sık rastlanılır (54). 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, 48 saatte bir gelmeye başlar. 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 (10). *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 (6,9). *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 (9,10,21).

Serebral sıtma, *P.falciparum* enfeksiyonunda serebral mikrosirkülasyonun engellenmesine bağlı olarak gelişir; en ciddi komplikasyonudur. Çok yüksek ateşle seyrederek (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 da 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 (9,10,13,22).

Plasmodium ovale, tertiana sıtması etkenidir. *P.ovale* sıtması, *P.vivax* sıtmasına klinik olarak çok benzemektedir, fakat daha hafif seyrederek, relapslar sık görülmez ve 6–10 nöbetten sonra kendiliğinden düzelir. Nöbetler 48 saatte bir gelir, daha ani başlarsa da daha kısa sürer (9,10).

Plasmodium 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 glomerülo nefropati) 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 (9).

E- TANI

Tedavilerindeki farklılıklar nedeniyle *Plasmodium* türlerinin doğru olarak tanımlanması önemlidir. *P.falciparum* enfeksiyonları çok kısa sürede fatal olabilmekte, *P.vivax* ve *P.ovale* hipnozoidleri karaciğer hücrelerinde latent olarak kalabilmekte ve relapsların oluşmasına neden olmaktadır. Tedavi olmamış kişilerde gametositlerin görülmesi aktif enfeksiyonu, tedavi görmüşlerde ise persistan enfeksiyonu gösterir. Persistan enfeksiyonun başarılı bir tedaviden sonra da görülebileceği unutulmamalıdır (23).

Son yıllarda sıtma enfeksiyonlarının saptanmasında daha fazla duyarlılığa ve özgüllüğe sahip alternatif tanı metodları geliştirilmiştir. Bunlar arasında akrinin oranj ile boyanmış sıtma parazitlerinin floresan mikroskopla incelenmesi, türe özgül parazit antijenlerini saptayan immunolojik dipstick testleri ve moleküler testler bulunmaktadır (24).

1- Mikroskopi

Sıtma tanısında kalın damla ve ince yayma kan örneklerinin mikroskopla incelenmesi altın standart olarak kabul edilmektedir. Parazitlerin ışık mikroskopunda görülebilmesi için Giemsa ile boyanması gerekmektedir. Bu yöntem ucuz ve basit olmakla birlikte, iş yükü açısından zahmetlidir. Kalın damla, ince yaymaya oranla daha duyarlıdır (24).

Kalın damla incelemesinde, standart olarak her preparat için en az 30–50 alan olmak üzere 500 alana kadar inceleme yapılmalıdır. Düzenli olarak 100–200 alan incelendiğinde bile atlanan olguların olabileceği örneklerin tekrar incelenmesi veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmiştir (25). Orijinal kalın damla metodunun duyarlılığı %80-90'dır. Giemsa ile boyanmış kalın damla örnekleri parazitin görülmesini sağlarken, ince yaymaların incelenmesi türlerin tanımlanmasında yarar sağlamaktadır. Kalın damlada 100 alanın taranması ile 0,25 µl kan incelenirken, ince yaymada 0,005 µl kan incelenir. Bununla beraber

kalın damlanın Giemsa ile boyanması sırasında parazitlerin %60-80'ni eksilebilmektedir. Teorik olarak kalın damlada *Plasmodium*'ların saptanabilmesi için bir μl 'de en az 5-20 parazitin bulunması gerekmektedir. Mikroskopi ile dört *Plasmodium* türünün tamamı saptanabilmekte, parazit sayısı belirlenebilmekte ve prognostik faktörler ortaya çıkarılabilmektedir. Kalın damla metodunda negatif sonuç rapor edilmeden önce en az 200 alanın incelenmesi gerekmektedir. Çünkü 100 alanın incelenmesinde bile olguların %20'si atlanabilmektedir (23). Paraziteminin klinik tablo ile ilişkisi Tablo-I'de özetlenmiştir.

Tablo-I. Paraziteminin Klinikle İlişkisi (23)

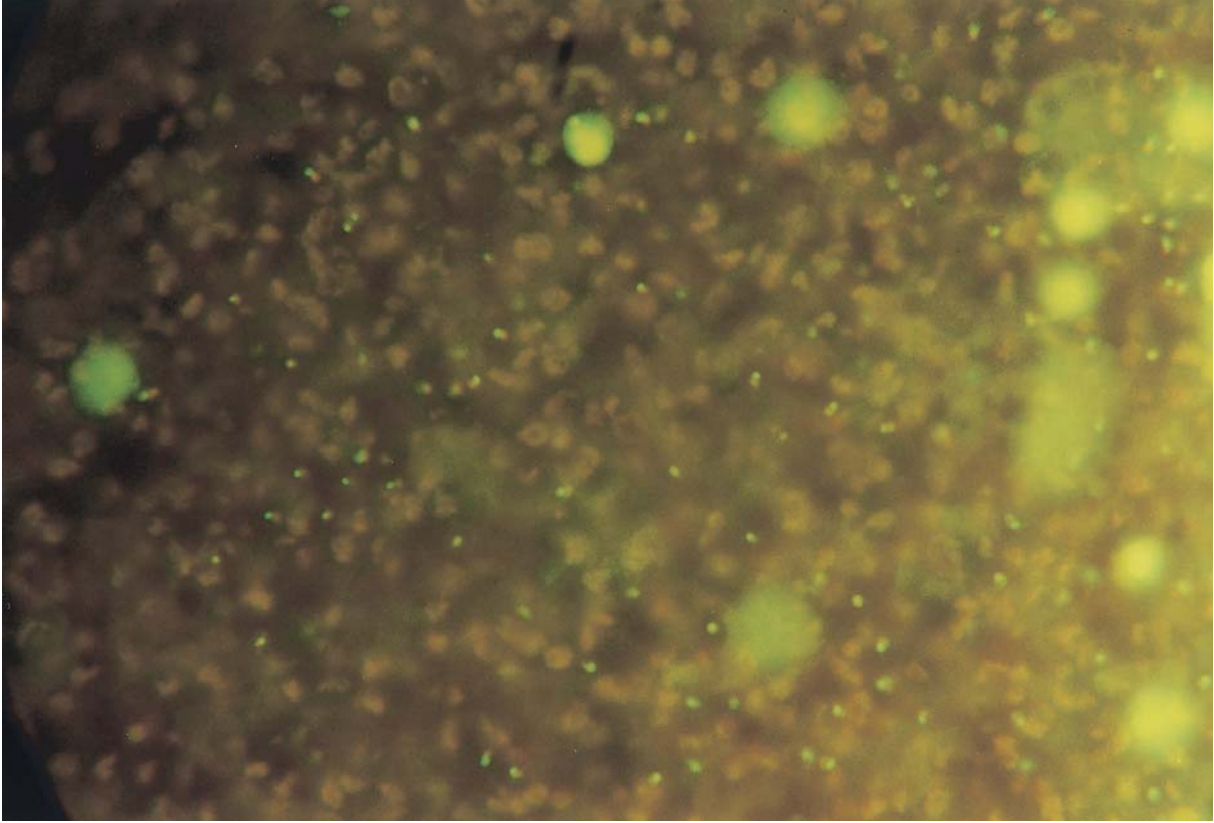
Parazitemi	Parazit/ μl	Açıklama
%0,0001-0,0004	5-20	Kalın damlanın duyarlılığı
%0,002	100	Sıtma mevsiminde hastalarda bu seviyenin altında semptom görülebilir
%0,2	10000	Bu seviyenin üstünde immunolojik semptomlar görülmektedir
%2	100000	<i>P.vivax</i> ve <i>P.ovale</i> için maksimum parazitemi
%2-5	100000-250000	Hiperparazitemi/şiddetli sıtma, mortalite artışı
%10	500000	Transfüzyon gereksinimi, yüksek mortalite

2- Floresan Boyama

Olgun eritrositler normalde DNA içermezler ancak *Plasmodium*'ların yapısında DNA bulunur. Bu DNA'nın floresan boyalarla (sıklıkla akrinin oranj) boyanması ile parazitler saptanabilmektedir. Lamların akrinin oranj ile boyanması özel ekipmanlar gerektirmekle beraber boyama maliyeti düşüktür. Fakat preparatların uzman kişiler tarafından değerlendirilmesi gerekmektedir, özellikle Howell-Jolly cisimcikleri gözden kaçırılmamalıdır (23).

Kawamoto, akrinin oranj ile boyanmış ince yayma preparatları floresan mikroskopi ile incelemiş, klasik kalın damla ile karşılaştırdığında bunun daha az duyarlılığa sahip olduğunu

belirtmiştir (26). Bununla beraber floresan mikroskobinin daha duyarlı olduğunu savunan otörler de bulunmaktadır (23).



Şekil-4. Akridin Oranj ile Boyanmış *P. falciparum* Trofozoitlerinin Floresan Mikroskopik Görünümleri (27).

3- Quantitative Buffy Coat (QBC) Yöntemi

Quantitative Buffy Coat (QBC) yöntemi, sıtma tanısında kalın damla yöntemine oranla daha büyük hacimde kanın görüntülenmesini sağlayan yüksek duyarlılıkta bir yöntemdir. QBC yöntemi ile parazit bulunan hücreler kan tüpünün dar bölgesine yoğunlaştırılır ve tüplerde santrifüj edilmiş kanda eritrositler 10 ile 30 saniye arasında incelenebilir. QBC sıtma saptama tüpleri, akridin oranj boyası, potasyum okzalat, heparin ve EDTA gibi antikoagülanlar ile kaplanmıştır. Akridin oranj boyası parazitlerin DNA'sını boyar. Sıtma paraziti içeren eritrositler, parazitsiz eritrositlere oranla daha hafif olduklarından santrifüj edildiklerinde eritrositlerin üstünde granülositlerin hemen altında yoğunlaşırlar. Floresan mikroskobu ile incelendiğinde, floresan olmayan kan hücreleri arasında parazitler parlak ışık kümesi şeklinde görülürler. İncelemede tüpün en üstünde bulunan trombositler portakal sarısı renginde, ortadaki lenfositler ve monositler yeşil renkte, bunun altında bulunan

granülositler ise sarı renkte görünürler. En altta da eritrositlerin bulunduğu kırmızı tabaka vardır. Bu tabakada floresan veren enfekte eritrositler, enfekte olmamış eritrositlerin arasından ayırt edilir. Ağır sıtmalı bir hastada tüm eritrositlerin %2'den azı *Plasmodium* içerir. Böyle küçük oranı saptayan klasik kalın damla yöntemi son derece yetenekli kalifiye elemanları gerektirir. Çünkü pozitif bir sonucu saptamak için 300'e yakın alan, negatif bir sonucu saptamak için 100 alan taramak gerekir ve her preparatı incelemek 10 dakika alabilir. QBC yönteminde bu süre bir dakikadan azdır. Ayrıca QBC yüksek duyarlılığa sahiptir. Kalın damla yönteminde 0,1-0,25 µl kan ile 100 alan taranabilirken, bir QBC tüpü bu hacmin 500 katını içermektedir (28).

Mikroskopi referans standart kabul edilerek yapılan bir çalışmada QBC tekniği ile ParaSight-F testi karşılaştırılmış, ParaSight-F testinin duyarlılığı %90-97, özgüllüğü %99 olarak bulunmuş buna karşılık QBC tekniğinin duyarlılığı %88-98, özgüllüğü ise %58-90 olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber parazit yoğunluğunun az olduğu durumlarda QBC tekniğinin ve konvansiyonel mikroskobinin duyarlılığı ParaSight-F testine oranla daha düşük olduğu görülmüştür (29).

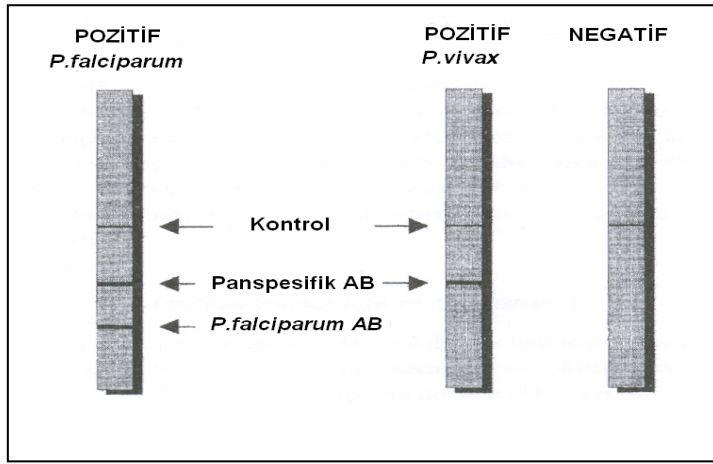
4- Hızlı Tanısal Testler

a) OptiMAL test

Laktat dehidrogenaz (pLDH), *Plasmodium*'ların hücre içi spesifik metabolik bir enzimidir. OptiMAL test, bu pLDH'a karşı elde edilen monoklonal antikorların nitroselüloz kağıt üzerine kaplanması ile oluşturulmuş bir dipstick testidir. Türe özgü pLDH kullanarak insanda sıtma yapan dört *Plasmodium* türünün 10 dakikadan kısa bir sürede bu yöntemle saptanması mümkündür. Bunun yanında pLDH sadece canlı parazitler tarafından sentez edildiği için, bu testin canlı organizma ile ölü organizma ayrımını sağlayan bir özelliği de bulunmaktadır (9).

Parmak ucundan alınan bir damla kan test kiti içinde bulunan reagent A ile karıştırılır ve buna test stripi batırılarak 8 dakika beklenir. Daha sonra strip reagent B ile yıkandıktan sonra incelenir (30). Strip üzerinde türe özgü pLDH'a spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmış bölgelerde koyu renkli bantların ortaya çıkması ile *Plasmodium* türleri saptanabilmektedir (31).

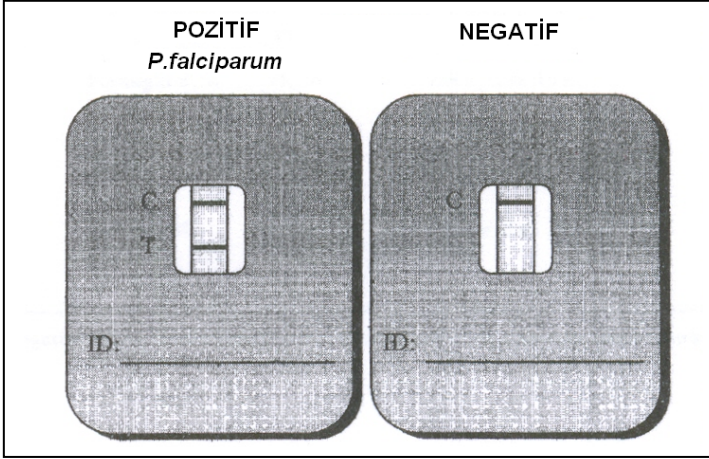
Palmer ve arkadaşları 202 sıtma şüpheli hastanın kanlarını Giemsa ile boyanmış kalın damla ve OptiMAL test metodları ile incelemişlerdir. Hastaların %48'i kalın damla ile %45'i OptiMAL test ile pozitif bulunmuştur. OptiMAL test ile pozitif bulunanların %82'si *P.vivax*, %19'u *P.falciparum* çıkmıştır. Kalın damla ile pozitif olanların ise %82'i *P.vivax*, %18'i *P.falciparum* çıkmıştır. Bununla beraber parazit yoğunluğunun 100 parazit/ μ l'den az olduğu kişilerde OptiMAL test negatif çıkmıştır (31). Şekil-5'te OptiMAL testin çalışma mekanizması görülmektedir.



Şekil-5. OptiMAL Testin Çalışma Mekanizması (23).

b) ICT Malaria testi

ICT Malaria testi, Şekil-6'da görüldüğü gibi immunokromotografik tekniğe dayanan iki yüzeyi nitroselüloz membranla kaplı küçük bir kart şeklinde bir sistemdir (9,32). *P.falciparum*'un spesifik histidinden zengin protein-II (Histidine Rich Protein, HRP-II) antijeni ve panmalarial antijen saptanır. Panmalarial antijen ile *P.falciparum* ve *P.vivax* saptanır. Nadiren de olsa *P.ovale* saptanabilmektedir ama *P.malariae* şimdiye kadar saptanamamıştır. ICT Malaria Pf/Pv testinin *P.falciparum* için duyarlılığı %95,5 ve özgüllüğü %89,8, *P.vivax* için duyarlılık %75 ve özgüllük %94,8 olarak bulunmuştur (33). Araz ve ark. yaptıkları çalışmada ICT testi kullanmışlar ve mikroskopi ile karşılaştırdıklarında testin özgüllüğünü %100, duyarlılığını %85,7 olarak bulmuşlardır (32).



Şekil-6. ICT Malaria Testinin Çalışma Mekanizması (23).

c) MAKROmed Rapid Malaria Testi

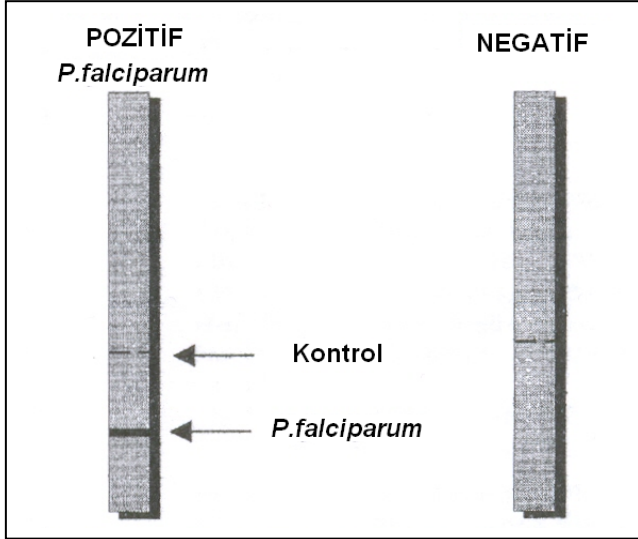
MAKROmed testi ile kanda bulunan *P.falciparum* spesifik HRP-II antijeni immunokromatografik olarak saptanabilmektedir. Test klinik belirtilerin başlamasından 9-12 gün sonra olumlu sonuç verir. PCR ile karşılaştırıldığında testin duyarlılığı %95 ve özgüllüğü %94'den fazladır (34). Richardson ve ark. yaptıkları bir çalışmada MAKROmed rapid malarya testini, PCR ile karşılaştırdıklarında duyarlılığını %97 ve özgüllüğünü %96 olarak bulmuşlardır (35). Bu testte test tüpü içinde yer alan tampon solüsyonu içine 5 µl kan damlatılmış çubuk daldırılıp bir süre bekletildiğinde pozitif örneklerde çift, negatif örneklerde tek bir bant oluşmaktadır (9).

d) ParaSight-F Testi

Bu testin sıtmanın endemik olarak görüldüğü bölgelerde yüksek bir duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir (36). *P.falciparum*'un kanda bulunan aseksüel kan formları ve gametositler tarafından salgılanan HRP-2'yi tanımaya dayalı hızlı bir antijen tespit yöntemidir. Şekil-7'de görüldüğü gibi nitroselüloz kağıda bağlanan HRP-2'ye spesifik monoklonal antikorlarla kanda bulunan *P.falciparum* HRP-2 antijeninin yakalanması hedeflenmiştir (9).

Humar ve ark. 151 ateşli hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ParaSight-F testini, PCR ile karşılaştırdıklarında ParaSight-F testinin duyarlılığını %88 ve özgüllüğünü %97 bulmuşlardır. Testin duyarlılığı parazit yükünün 50 parazit/µl'den az olan hastalarda %40,

50–100 parazit/ μ l olanlarda %89, 100 parazit/ μ l'den fazla olanlarda ise %93 olarak bulunmuşlardır (37).



Şekil-7. ParaSight-F Testinin Çalışma Mekanizması (23).

Cropley ve ark. ateş ve sıtmanın endemik olduğu bölgelere seyahat hikâyesi olan 160 kişiyi ParaSight-F testi ve mikroskopi ile incelemişlerdir. Bu 160 kişinin 45 tanesinde bu iki yönetime göre *P.falciparum* saptamışlardır. Tek başına mikroskopi ile 42 ve yine tek başına ParaSight-F testi ile 42 olgu *P.falciparum* olarak saptanmıştır (38).

e) SD Bioline Malaria Antigen testi

Plasmodium falciparum'a spesifik HRP-II monoklonal antikor ve diğer türlerdeki pLDH poliklonal antikorlar içeren çift zonlu bir kaset testtir.

Sei Won Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada bu testin duyarlılığı %96,4, özgüllüğü %99,6 olarak tespit edilmiştir (39).

Parazit yükünün az olduğu durumlarda (100 parazit/ μ l'nin altında) hızlı tanısal testlerin duyarlılığının düşük olduğu gösterilmiştir. İspanyol hastanelerinde kullanımı hızla artan hızlı testlerin duyarlılık ve özgüllükleri PCR ile karşılaştırıldığında, referans laboratuvarlarda PCR'a dayalı testlerin bulunması gerekliliği ortaya çıkmış, yurt dışından geri dönen turistlerin ve göçmenlerin kontrolünde ilk etapta hızlı tanısal testlerin yardımcı

olabileceği ama bu ve diğer çalışmaların sonuçlarında PCR teknolojisi ile konfirme edilebilen daha duyarlı laboratuvarların geliştirilmesine ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (40).

Tablo-II. Hızlı Tanısal Testlerin Karşılaştırılması (23)

Metod	Bölge	Standart	Duyarlılık	Kaynak
Parasight®-F	Venezuela	Kalın damla	%87	Carballo & Ache 1996
	Kanada	PCR	%88	Humar ve ark. 1997
	Sri Lanka	Kalın damla	%90	Kodisinghe ve ark 1997
	Zimbabve	Kalın damla	%93	Mharakurwa & Shiff 1997
	Hindistan	Kalın damla	%93	Singh, Singh & Sharma 1997
ICT Malaria Pf®	Güney Afrika	Kalın damla	%99	Durrheim ve ark 1998
	Hindistan	Kalın damla	%100	Singh, Valecha & Sharma 1997
	Solomon Adaları	Kalın damla	%100	Garcia ve ark. 1996
OptiMal®	Honduras	Kalın damla	Tümünde %93 Pf %88 Pv %94	Palmer ve ark. 1998

5- 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 tanısal test olarak moleküler yöntemlerin kullanılmasında büyük yarar vardır (41).

Franzen ve ark. ilk defa 1984 yılında sıtma tanısında kullanılan DNA hibridizasyon yöntemini bildirmişlerdir. *P.falciparum*'un genomik DNA'sını görüntülemek için fosfat ile işaretli proplar kullanmışlar, *P.falciparum* genomik DNA'sında birbiri ile sıkı sıkıya hibride olmuş iki DNA fragmanını pBR322 plazmid vektörüne klonlamışlardır. Daha sonra bu bölgelerden birini *HindIII* 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 (42).

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 propları tespit edilmiş olup, bunların RNA içerisinde çok fazla sayıdaki tekrarları nedeniyle yüksek bir duyarlılığa sahip oldukları gösterilmiştir (9). *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 proplar kullanıldığında 10–50 parazit varlığında bile *Plasmodium*'ların 4 türünün ayrımı yapılabilmektedir (41).

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 PCR yöntemleri geliştirmişlerdir (43). 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 (9).

Tablo-III. Sıtma Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması (23).

Metod	Işık mikroskopisi	QBC [®]	Antijen saptanması		PCR
			HRP-2	pLDH	
<i>Duyarlılık</i>	+++	++/+++	++/+++	++/+++	++++
<i>Uzman ihtiyacı</i>	+++	++/+++	<i>Yok</i>	<i>Yok</i>	++++
<i>Ek ekipman</i>	+ / ++	+++	<i>Yok</i>	<i>Yok</i>	++++
<i>Test süresi</i>	<i>Yavaş</i>	<i>Değişken</i>	<i>Hızlı</i>	<i>Hızlı</i>	<i>Çok yavaş</i>
<i>Otomasyon</i>	<i>Uygun değil</i>	++	++	++	+++
<i>Tür tanımlama</i>	+++	+ / ++	<i>Pf</i>	<i>Pf&Pv</i>	++++
<i>Tekrarlanabilirlik</i>	+++	+++	- / +	++ (?)	+++
<i>Parazit sayısının hesaplanması</i>	+++	++	<i>Yok</i>	<i>Yok</i>	<i>Yok</i>
<i>Maliyet/Test (ABD Doları)</i>	<i>0.03</i>	<i>1.7-4.0</i>	<i>5-10</i>	<i>3</i>	<i>>3</i>

a) Örneklerin Toplanması, Saklanması ve Taşınması

Plasmodium'ların PCR ile tanısı için kan örnekleri filtre kâğıtlarına, phosphate-buffered saline (PBS) içeren tüplere veya ethylene-diamine-tetraacetic acid'li (EDTA) tüplere alınabilir. Bugün için özellikle kullanım kolaylığı nedeniyle filtre kâğıtları tercih edilmektedir. Filtre kâğıdı olarak en sık Whatman 3M kullanılmaktadır. Bu şekilde kan örneklerinin toplanmasının başlıca iki avantajı vardır; birisi filtre kâğıtlarına alınan kan örnekleri oda ısısında uzun süre saklanabilmesi, diğeri ise filtre kâğıtları plastik kaplar içinde rahatlıkla bir yerden diğere taşınabilmesidir. Filtre kâğıdı kan örnekleri için parmak ucundan alınan veya intravenöz yolla alınan kan tercih edilir, 20 veya 25 µl kan örneğinin alınması bu yöntem için yeterli olmaktadır (44,45,46).

Kan örneklerinin toplanmasında ikinci bir yöntem örneklerin PBS içeren mikrosantrifüj tüplerine alınmasıdır. Tüplerde genelde 150 µl PBS bulunur. Bakteri ve funguslarla kontaminasyonu engellemek için 10 ünite/ml nistatin ve 25 µg/ml gentamisin ilave edilir. Bu yöntem için parmak ucundan 10 µl kan alınması yeterlidir. Örnekler yedi gün +4 °C'de saklanabilir (44,45,46). Bunlardan başka örnekler EDTA'lı tüplerde alınabilir, bunun için beş mililitre venöz kan alınır. Saklamak için değişik kaynaklarda farklı görüşler bulunmaktadır. Buna göre +4 °C, -20 °C'de saklanabileceği gibi -70 °C'de veya likit nitrojen ile dondurularak saklanabileceği de ifade edilmektedir (47,48,49,50).

Kan örneklerini toplama yöntemleri (antikoagülanlı, kültür ortamı, filtre kâğıdı) ve saklama şekilleri (ısı, zaman) yapılacak PCR'in etkinliğini etkilemektedir. PCR, sitrat ve EDTA'dan etkilenmez iken heparin ile kısmen inhibe olmaktadır. Bu inhibisyon heparinazın optimal konsantrasyonda kullanılması ile geri dönmektedir. Dondurulmuş örneklerin çözüldükten sonra tekrar dondurulması ve tekrar çözülmesi durumunda ilk kullanıma oranla 10 kat daha az duyarlılıkta PCR sonuçları ortaya çıkmaktadır (51).

b) Ekstraksiyon Yöntemleri

Plasmodium'ların PCR ile tanısında birçok ekstraksiyon metodu olmakla beraber içlerinde en sık kullanılanlar şunlardır;

Chelex metodu. Chelex 100, polivalan metal iyonlarına yüksek affinite gösteren şelat oluşturan bir reçinedir. Chelex 100, DNA'nın parçalanmasını engellemekte ve alkali ortamda kaynatıldığında hücrenin parçalanarak DNA'nın açığa çıkmasını sağlamaktadır (52). Bu yöntemde kan emdirilmiş filtre kâğıtları kesilerek küçük parçalara ayrılır ve mikrosantrifüj tüpüne konur. Üzerine alınan kanın 10 misli miktarda 100 °C'de ısıtılmış %5 Chelex 100 solüsyonundan ilave edilir. Örnek 30 saniye vortekslenip ardından da 10 dakika kaynatıldığında DNA açığa çıkar. Daha sonra 12000 g'de (Devirde) 1,5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınır. Örnek tekrar 1,5 dakika 12000 g'de santrifüj edildikten sonra 5-40 µl süpernatant PCR için kullanılır (53).

Saponin lizis yöntemi. 500 µl kan örneği eppendorf tüplere alınır ve 8 µl %10'luk saponin eklenir. Örnek vortekslenildikten sonra 10 dakika 10000 g'de santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır. Dipte kalan çökelti 1 ml PBS ile sulandırılıp vortekslenir ve 5

dakika 10000 g'de santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırır ve dipte kalan kısım PCR için kullanılır (47).

Hızlı kaynatma yöntemi (Rapid Boiling). 10 µl kan örneğine buzda soğutulmuş 500 µl 5 mM sodyum fosfat buffer ilave edilir, vortekslenir ve 14000 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra örnek 2 defa yıkanır. 50 µl distile su ilave edildikten sonra 10 dakika süreyle kaynatılır. Örnek 14000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra 5 µl süpernatant PCR için kullanılır (54).

Fenol-kloroform ekstraksiyon metodu (54)

Ayrıca Plasmodium DNA ekstraksiyonunda kullanılan ticari ekstraksiyon kitleri de bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır;

-WizardTM Plus Minipres DNA saflaştırma sistemi (54)

-Isocode STIX PCR Template Preperation Dipstick yöntemi (54)

-QIAamp DNA Blood Kit (55). Henning ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Isocode STIX ve Hızlı Kaynatma metodlarını, QIAamp DNA ve fenol-kloroform ekstraksiyon metodu ile karşılaştırmışlar ve Isocode STIX ve Hızlı Kaynatma metotlarının PCR'ın duyarlılığını artırdığını bildirmişlerdir (54).

c) Amplifikasyon Yöntemleri

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR, nükleik asidlerin 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'da 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.

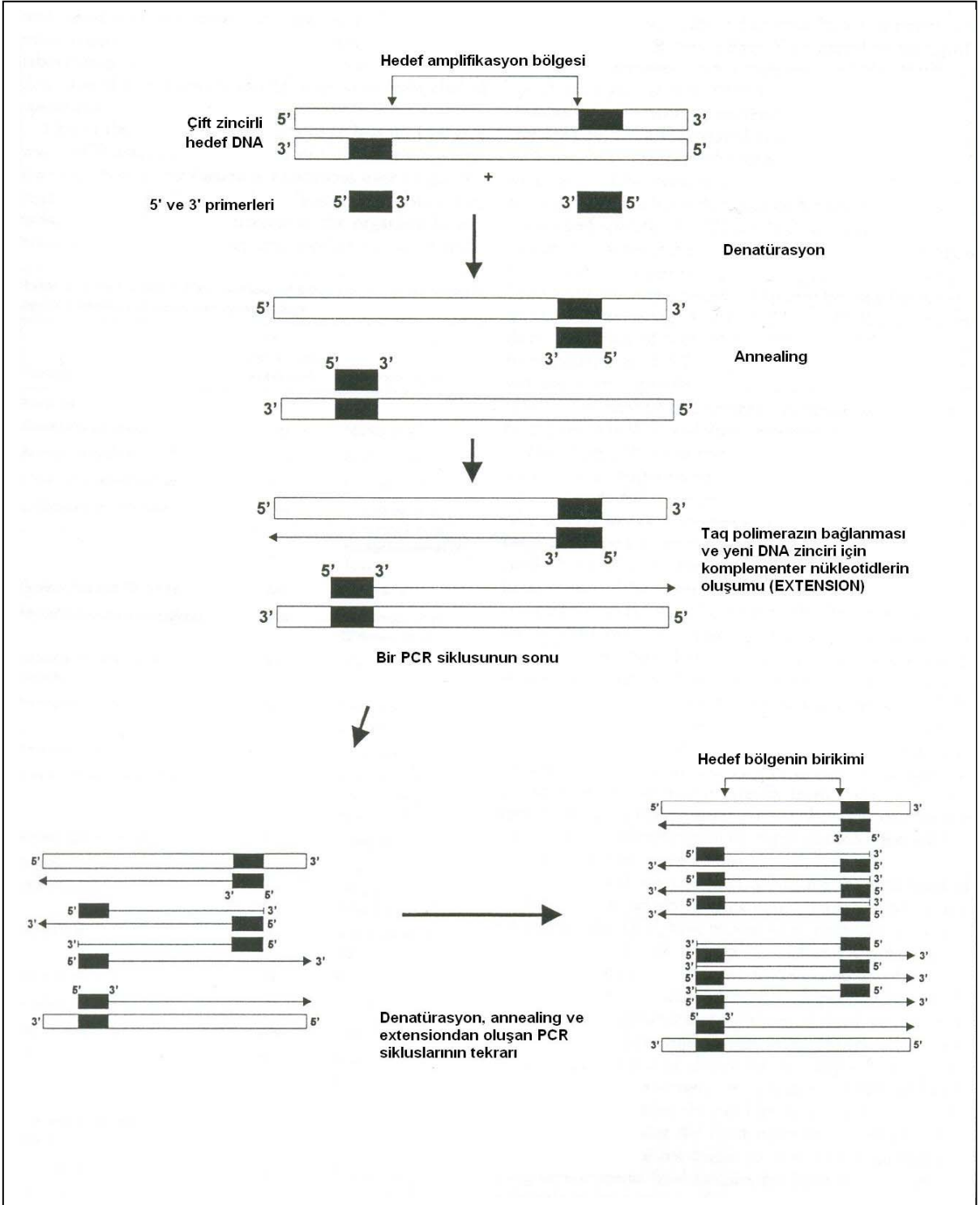
1) Denatürasyon. Çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA steril olmak zorunda değildir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (94–96 °C’de birkaç dakika). Bu süreçte enzimler çalışmaz.

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. 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 (56,57). PCR’in mekanizması Şekil-8’de gösterilmiştir.

Bugün için Plasmodium’ların tanısında normal PCR’a ilaveten nested PCR, semi-nested PCR, multipleks PCR ve real-time PCR metodları da başarıyla kullanılmaktadır.



Şekil-8. PCR'ın Mekanizması (58)

III. GEREÇ ve YÖNTEM

A- HASTA VE ÖRNEKLER

Haziran 2007 ile Ekim 2007 tarihleri arasında Siverek Sıtma Savaş Merkezi'ne gelen sıtma şüphesi olan 64 kişinin parmak ucu ve venöz kan örnekleri alınmıştır.

Parmak ucu kan örneklerinden, kalın damla ve ince yayma kan preparatları hazırlanarak oda ısısında plastik kaplarda saklanmıştır. Hızlı tanı testi ve Real-Time PCR çalışmalarında kullanılmak üzere, EDTA'lı hemogram tüplerine alınan 5 ml venöz kan örnekleri testler uygulanana kadar -20 °C de saklanmıştır. Yayma kan preparatları Giemsa boyası ile boyanıp ışık mikroskopunda X1000 büyütmede incelenmiştir.

Çalışmaya alınan her kişi için bir "Hasta Takip Formu" düzenlenmiş ve adı-soyadı, yaşı, cinsiyeti, mesleği, gebelik durumu, ateşli hastalık veya sıtma hikâyesi, sıtma tedavisi görüp görmediği, ailede göçer işçi durumu gibi kişisel bilgiler sorulmuştur.

Çalışma grubuna alınan tüm bireyler, Harran Üniversitesi Etik Kurulu'nun "Bilgilendirilmiş Olur Formu"nu doldurup imzalaması ile çalışmaya dâhil edilmişlerdir. Çalışma, Şanlıurfa Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü'nün resmi onay, izin ve bilgisi dâhilinde gerçekleştirilmiştir.

B- KULLANILAN YÖNTEMLER

Sıtma şüpheli hastalarda *Plasmodium spp.* tanısı için kalın damla ve ince yayma kan preparasyonları, hızlı tanı testi ve Real-Time PCR teknikleri kullanılmıştır.

1- Kalın Damla ve İnce Yayma Kan Preparasyonu:

Kullanılan malzemeler ve yöntemin uygulanışı aşağıda verilmiştir:

a) Gereçler

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

b) Reaktifler

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

c) Kalın Damla Kan Preparasyonu

1. Hastanın parmak ucu alkollü pamuk ile temizlendikten sonra lanset ile delindi, temiz bir lama temas ettirilerek bir damla kan alındı.
2. Başka bir lamın kenarı ile alınan kandamlası dairesel hareketler yapılarak yaklaşık 2 cm çapında yuvarlak bir alana yayıldı.
3. Preparat havada kurutuldu, tespit edilmedi.
4. Mezura 10 ml distile su kondu ve bunun üzerine her 1 ml distile su için 1 damla oranına göre 10 damla ticari Giemsa boyası ilave edildi. Mezur, dairesel hareketler yapılarak hafifçe karıştırıldı.
5. Hazırlanan Giemsa boyası preparat üzerine döküldü ve 20 dakika süreyle beklendi.
6. Lam üzerindeki boya döküldü, lam musluk suyu ile yıkandı ve havada kurutuldu.
7. Kuruyan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile ışık mikroskobunda incelendi.
8. İnceleme yaparken en az 200 sahaya bakıldı.

d) İnce Yayma Kan Preparasyonu

1. Hastanın parmak ucu alkollü pamuk ile temizlendikten sonra lanset ile delindi, temiz bir lama temas ettirilerek lamın kenarından 1 cm mesafede orta bir noktaya bir damla kan alındı.
2. Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında kandamlası işaret parmağının bulunduğu tarafta olacak şekilde tutuldu.
3. Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan bir lamel, kandamlasının ön kısmına işaret parmağına bakan 45°'lik bir açı yapacak şekilde temas ettirildi.
4. Kanın lamelin iki köşesine yayılması için kısa bir süre beklendi ve açı korunarak sol tarafa doğru sürüldü.
5. Preparat havada kurutuldu.
6. Preparatın üzerine metil alkol döküldü ve 2–3 dakika beklenecek şekilde tespit edildi.
7. Mezura 10 ml distile su konuldu ve bunun üzerine her 1 ml distile su için 1 damla oranına göre 10 damla ticari Giemsa boyası ilave edildi. Mezur, dairesel hareketler yapılarak hafifçe karıştırıldı.
8. Hazırlanan Giemsa boyası preparat üzerine döküldü ve 20 dakika süreyle beklendi.
9. Lam üzerindeki boya döküldü, lam musluk suyu ile yıkandı ve havada kurutuldu.
10. Kuruyan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektif ile ışık mikroskopunda incelendi.
11. İnceleme yaparken en az 200 sahaya bakıldı.

e) Parazitolojik Değerlendirme

Parazitemi düzeyi (Aseksüel parazit sayısı/ μ L kan), kalın ve ince yayma preparatlar incelenerek aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır (59).

$$\text{Parazitemi } (\mu\text{L başına}) = \text{parazit sayısı} \times 8000 / \text{lökosit sayısı}$$

2- Hızlı Tanı Testi

SD Malaria Antigen *P.f/Pan* kaset testler kullanıldı. EDTA'lı tüplere alınmış kanlar oda ısısına getirildi. 5 µl kan örnek kuyucuğuna damlatıldı. Dilüent kuyucuğuna 4 damla dilüent damlatıldı. 20-30 dakika oda ısısında beklendikten sonra sonuçlar yorumlandı.

3- Real-Time PCR Yöntemi.

Kullanılan malzemeler ve yöntemin uygulanışı aşağıda verilmiştir:

a) Gereçler

Sıcak Su Banyosu Cihazı (Nüve BS402)

Amplifikasyon Cihazı (LightCycler 1,5, Roche, Almanya)

Vorteks Cihazı (IKA Yellowline TTS2, USA)

Otomatik pipetler,(1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)

Muhtelif pipet ucu

Eppendorf santrifüjü (VWR Galaxy 16DH, USA)

Eppendorf tüpleri

Eppendorf sporu

b) Reaktifler

DNA ekstraksiyon kiti (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN)

Master Mix (Light Cycler DNA Master SYBR Green I, ROCHE)

PBS Solusyonu

%96 Etil Alkol

Primerler;

-*Plasmodium* genus spesifik primerler (IDT Integrated DNA Technologies, Belçika)

Primer 1; rPLU 1 (5'-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3')

Primer 2; rPLU 5 (5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3')

-*P. vivax*'a spesifik primerler (Integrated DNA Technologies, Belçika)

Primer 3; rVIV 1 (5'-CGCTTCCTTAATCCACATAACTGATAC-3')

Primer 4; rVIV 2 (5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3')

c) Stok Solüsyonların Hazırlanması

PBS:

K₂HPO₄ 2.4 gr

NaH₂PO₄ 0.44 gr

NaCl 17 gr

pH: 7.2 olacak şekilde distile suyla 2000 ml'ye tamamlandı.

d) DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu, ticari olarak sağlanan QIAamp DNA Blood Mini Kit ile yapıldı.

- Tam kan örnekleri oda ısısına getirildi.
- Su banyosu 56 °C'ye getirildi.
- Buffer AVE oda sıcaklığına getirildi.
- Buffer AW1 ve AW2 protokole göre hazırlandı.
- Buffer AL içindeki kristallenmeyi gidermek amacıyla 56 °C'de inkübe edildi.

- Tüm santrifüj basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
1. 1,5 ml'lik ependorf tüplerine 800 µl PBS konuldu.
 2. Bunun üzerine 400 µl tam kan örneği ilave edilerek vorteksle karıştırıldı.
 3. Tüpler 8000 devirde 4 dakika santrifüj edildi.
 4. Alttaki pellete değdirilmeyecek şekilde üstteki sıvı pipetle çekildi.
 5. Üzerine 800 µl PBS konuldu ve vorteksle karıştırıldı.
 6. Tüpler 8000 devirde 4 dakika santrifüj edildi.
 7. Alttaki pellete değdirilmeyecek şekilde üstteki sıvı pipetle çekildi.
 8. Üzerine 200 µl PBS konuldu.
 9. Üzerine 20µl Proteinase K eklendi ve vorteksle karıştırıldı.
 10. Üzerine 200 µl Buffer AL eklendi.
 11. Su banyosunda, 56 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
 12. Tüpler vorteksle hafifçe karıştırıldıktan sonra üzerine, moleküler çalışmalarda kullanılan, %96'luk etil alkolden 200 µl eklendi ve karıştırıldı.
 13. Ependorf tüplerdeki karışım spin kolona aktarıldı, 6000 devirde 1 dk. santrifüj edildi.
 14. Spin kolonun yerleştiği tüp atılarak, spin kolon 2 ml'lik temiz collection tüpe yerleştirildi.
 15. Üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenerek 6000 devirde 1 dk. santrifüj edildi.
 16. Spin kolonun yerleştiği tüp atılarak, spin kolon 2 ml'lik temiz collection tüpe yerleştirildi ve üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenerek 13.000 devirde 5 dk. santrifüj edildi.
 17. Spin kolonun yerleştiği tüp atılarak, spin kolon 2 ml'lik temiz collection tüpe yerleştirildi 13.000 devirde 1 dk. santrifüj edildi.
 18. Spin kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpe yerleştirildi, üzerine 200 µl Buffer AE eklenerek 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
 19. 6000 devirde 1,5 dk. santrifüj edildikten sonra kolonlar atıldı.
 20. Ependorf tüplerin dibinde kalan karışım amplifikasyon için kullanılacak olan DNA'dır.
 21. DNA örnekleri çalışılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

e) Amplifikasyon

Genus spesifik primerlerin kullanıldığı amplifikasyon için aşağıdaki şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. Her bir örnek için;

Distile su	12,4 µl
MgCl ₂	1,6 µl
Primer 1 (10 µmol)	1 µl
Primer 2 (10 µmol)	1 µl
DNA Master SYBR Gren I	2 µl

Hazırlanan 18 µl PCR karışımına 2 µl ekstrakte edilmiş DNA ilave edilerek “LightCycler 1,5” amplifikasyon cihazına yerleştirildi.

PCR çalışma protokolü uygulandı;

Denatürasyon	95 °C	30 saniye	} 45 siklus
Bağlanma (Annealing)	56°C	10 saniye	
Uzama (Extension)	72°C	1 dk.	

Daha sonra sırasıyla *P.vivax*’a spesifik primerler kullanılarak ekstrakte edilmiş DNA amplifikasyona alındı. Amplifikasyon için PCR karışımı, bir önceki karışım gibi hazırlandı, aynı miktarda ekstrakte edilmiş DNA ilave edildi ve aynı PCR döngüleri uygulandı.

f) İstatistik Analizler

Veriler SPSS 11.5 paket programı ile değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizlerde Ki Kare testi kullanılmıştır. P değeri 0.05’in üstü anlamlı kabul edilmiştir.

Uygulanan üç ayrı tanı yönteminden herhangi birinde pozitif bulunan kişiler, hasta olarak değerlendirilmiş ve hesaplamalar buna göre yapılmıştır. Testlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) ve kappa indeksleri hesaplanmıştır. Kappa İndeksi, testler arasındaki uyum gücünü göstermektedir. Değeri 0 ile 1 arasında değişmektedir. Kappa indeksi 0.70 ve üzeri olduğunda o testin uyumunun yeterli olduğu düşünülür.

IV. BULGULAR

A. ÖRNEKLER

Haziran-Ekim 2007 tarihleri arasında, Siverek Sıtma Savaş Merkezi'ne gelen sıtma şüpheli 64 kişinin kan örnekleri sıtma enfeksiyonu yönünden incelendi. Tablo-IV'te, çalışmaya katılan tüm bireylerin cinsiyeti, yaşları, mikroskopi, hızlı tanı testi ve Real-Time PCR sonuçları ile parazit sayıları gösterilmektedir.

Tablo-IV. Hasta Bilgileri ve Uygulanan Testlerin Sonuçları

Örnek No	Cins	Yaş	Mikroskopi	Parazit Sayısı	Hızlı Tanı Testi	RT-PCR
01	E	40	N	0	N	N
02	E	3	P	2240	P	P
03	E	55	N	0	N	N
04	K	18	P	4800	P	P
05	E	29	P	1760	P	P
06	E	7	P	19840	P	P
07	E	43	N	0	N	N
08	K	25	N	0	N	N
09	E	36	P	960	P	P
10	E	34	N	0	N	N
11	E	34	N	0	N	N
12	E	9	N	0	N	N
13	E	40	P	480	P	P
14	E	27	N	0	N	N
15	K	10	P	6240	P	P
16	E	41	P	10080	P	P
17	E	26	P	5760	P	P
18	K	30	N	0	N	N
19	E	9	P	640	P	P
20	K	14	P	2120	P	P
21	K	1	N	0	N	N
22	E	40	P	480	P	P
23	K	5	P	4160	P	P
24	K	18	P	8320	P	P

25	K	11	P	1440	P	P
26	E	9	N	0	N	N
27	E	6	P	3360	P	P
28	E	30	P	2720	P	P
29	E	7	P	14720	P	P
30	E	6	P	8160	P	P
31	K	70	N	0	N	N
32	K	20	N	0	N	P
33	E	11	N	0	N	N
34	K	3	N	0	N	N
35	E	3	N	0	N	N
36	K	7	N	0	N	N
37	E	10	N	0	N	P
38	K	4	N	0	N	N
39	E	39	N	0	N	N
40	E	8	N	0	N	N
41	K	35	N	0	N	P
42	E	3	N	0	N	N
43	K	19	P	7680	P	P
44	E	5	N	0	N	N
45	K	25	P	5120	P	P
46	K	19	P	5920	P	P
47	E	2	P	2080	P	P
48	E	5	P	24960	P	P
49	K	57	N	0	N	N
50	E	1	N	0	N	N
51	K	25	N	0	N	N
52	E	61	N	0	N	N
53	E	29	N	0	N	N
54	K	27	N	0	N	N
55	E	7	P	6560	P	P
56	E	37	N	0	N	N
57	K	34	N	0	N	N
58	E	10	N	0	N	N
59	E	8	N	0	N	N
60	E	6	N	0	N	N
61	E	4	N	0	N	N
62	K	2	N	0	N	N
63	E	24	N	0	N	N
64	K	20	N	0	N	N

Tablo-IV. Hasta Bilgileri ve Uygulanan Testlerin Sonuçları (Devamı)

B- MİKROSKOBİ BULGULARI

Çalışmaya katılan 64 kişinin periferik kan yaymaları Giemsa boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Örneklerin 25'inde *P. vivax* saptandı, 39 örnekte *Plasmodium* türü saptanmadı.

C- HIZLI TANI TESTİ BULGULARI

Çalışmaya katılan 64 kişinin tam kan örnekleri, hızlı tanı testi kullanılarak sıtma yönünden incelendi. Örneklerin tamamı *P.falciparum* yönünden negatif bulunurken, 25 tanesi *Plasmodium* spp. yönünden pozitif bulundu.

D- REAL-TİME PCR BULGULARI

Sıtma şüphesi olan 64 kişinin tam kan örneklerinden, genomik DNA'ları elde edildi. Genus spesifik primerler kullanılarak Real-Time PCR ile amplifiye edildi ve sonuçlar değerlendirildi. Mikroskobisi pozitif olan 25 örneğin tamamı ve mikroskobisi negatif olan 39 örnekten 3 tane olmak üzere toplam 28 örnekte *Plasmodium* cinsi saptandı, 36 örnek negatif sonuç verdi. Takiben, tüm örneklere *P.vivax* spesifik primer kullanılarak aynı şekilde Real-Time PCR yöntemi uygulandı. Burada da, daha önceden genus spesifik primer ile pozitif bulunan 28 örneğin tamamının *P. vivax* olduğu görüldü. Şekil-9'da genus spesifik primerler, Şekil-10'da *P.vivax*'a spesifik primerler ile yapılan Real-Time PCR'nin grafikleri görülmektedir.

Tablo-V'te de görüldüğü gibi Real-Time PCR'in duyarlılığı ve özgüllüğü %100 bulunurken, mikroskobinin ve hızlı tanı testinin duyarlılığı %89.3, özgüllükleri %100 bulunmuştur.

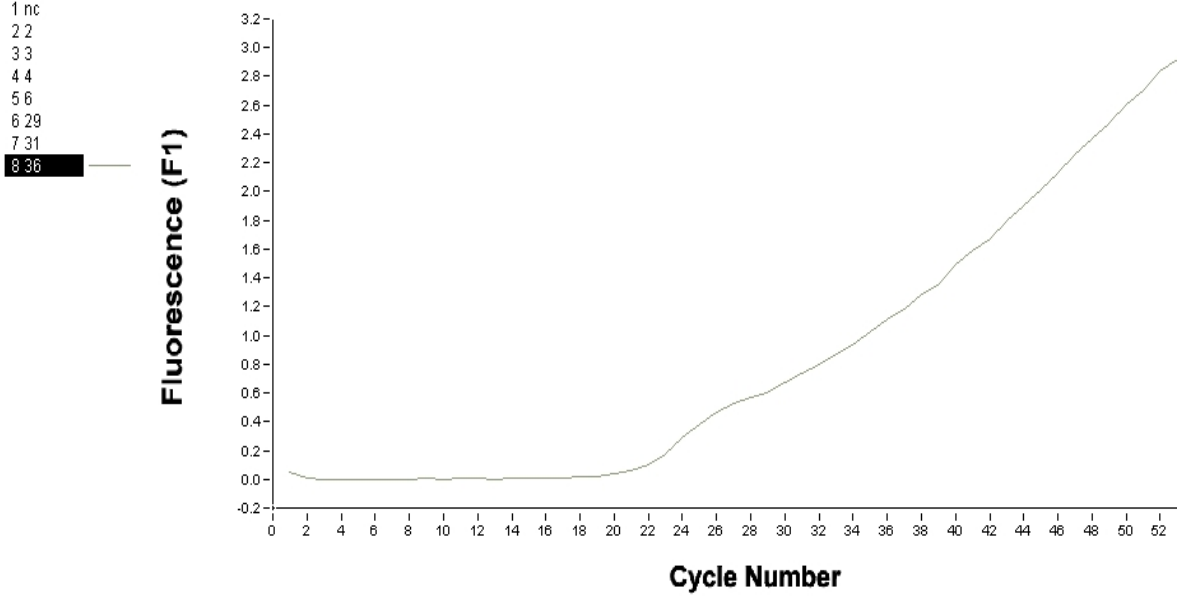
Tablo-V. Testlerin İstatistiksel Sonuçları

Testin Adı	Duyarlılığı (%95 CI)	Özgüllüğü (%95 CI)	PPD (%95 CI)	NPD (%95 CI)	Kappa İndeksi
Mikroskobi	%89.3 (70.7-100)	%100 (82.5-100)	%100 (80.9-100)	%92.3 (75.2-100)	0.904
Hızlı Tanı Testi	%89.3 (70.7-100)	%100 (82.5-100)	%100 (80.9-100)	%92.3 (75.2-100)	0.902
Real-Time PCR	%100 (81.4-100)	%100 (82.5-100)	%100 (81.4-100)	%100 (82.5-100)	1

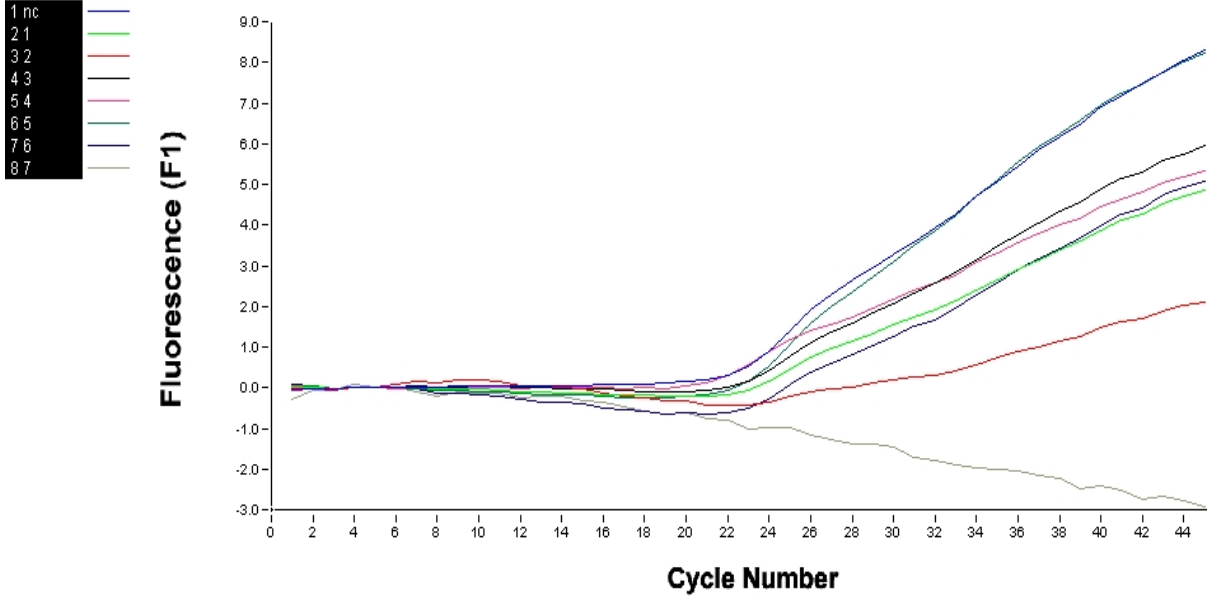
PPD : Pozitif Prediktif Değer

NPD : Negatif Prediktif Değer
CI : Confidence İnterval

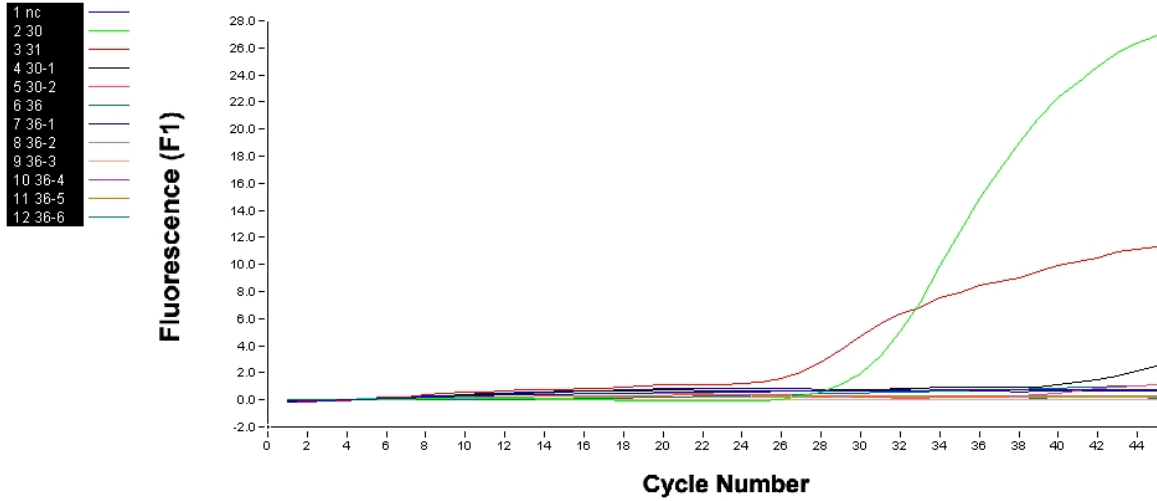
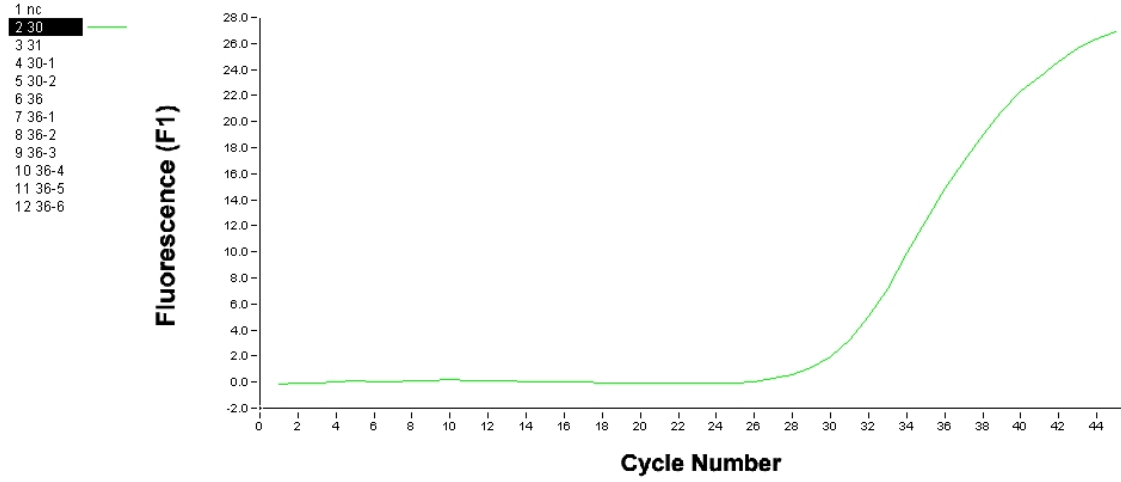
File: C:\LightCycler3\Users\Admin\Data\plasmodium sp 28032008.ABT Program: pcr Run By: Admin
Run Date: Mar 28, 2008 09:39 Print Date: 2008



File: C:\LightCycler3\Users\Admin\Data\plasmodium sp 30042008.ABT Program: pcr Run By: Admin
Run Date: Apr 30, 2008 14:13 Print Date: 2008



Şekil-9. *Plasmodium* Genus Spesifik Primerlerle Oluşan Grafikler



Şekil-10. *P.vivax* Spesifik Primerlerle Oluşan Grafikler

E- EPİDEMİYOLOJİK VERİLER

Çalışmaya alınan 64 kişinin, yaş, cinsiyet, geçmişte ateşli hastalık veya sıtma hikâyesi olup olmadığı, önceden sıtma tedavisi görüp görmediği, ailesinde geçmişte ateşli hastalık veya sıtma hikayesi olup olmadığı, ailede göçer işçi olup olmadığı gibi kişisel ve ailesel verileri incelendi.

Çalışmaya katılanların 24'ü kadın (%37.5), 40'ı erkekti (%62.5).

Yaş ortalaması 20.3±16.6 olarak hesaplandı (yaş aralığı:1-70).

Parazit yoğunluğu, Mean±SD= 6024±6051 parazit/μL olarak hesaplandı, min-max (480-24960 parazit/μL).

Parazit sayısı ile yaş ve cinsiyet arasında ilişki bulunamadı (p>0.05).

Daha önce sıtma geçirmiş olanlarla parazit sayısı arasında ilişki bulunamadı (p=0.505).

Geçmişte sıtma tedavisi görenlerle parazit sayısı arasında ilişki bulunamadı (p=0.528).

Tablo-VI'te Hastaların epidemiyolojik verileri tanı yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Tablo-VI. Hastaların Epidemiyolojik Verilerinin Mikroskopi, Hızlı Tanı Testi ve PCR ile Karşılaştırılması

Olgu grubu tanımlayıcıları		Mikroskobisi pozitif hastalar (25 hasta)	Hızlı tanı testi (Kaset test) pozitif hastalar (25 hasta)	PCR pozitif hastalar (28 hasta)
Yaş	0-17 yaş	13 (%52)	13 (%52)	14 (%50)
	18-27 yaş	5 (%10)	5 (%10)	6 (%21)
	28-37 yaş	3 (%12)	3 (%12)	4 (%14)
	38-57 yaş	3 (%12)	3 (%12)	3 (%11)
	58 ve üstü yaş	1 (%4)	1 (%4)	1 (%4)
Cinsiyet	Kadın	16 hasta (%64)	16 hasta (%64)	18 (%64)
	Erkek	9 hasta (%36)	9 hasta (%36)	10 (%36)
Demografik özellikler	Geçmişte sıtma hikâyesi bulunan	6 (%24)	6 (%24)	9 (%32)
	Geçmişte sıtma tedavisi gören	5 (%20)	5 (%20)	8 (%25)
	Ailesinde göçer işçi bulunan	3 (%12)	3 (%12)	6 (%21)

V. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sıtma, *Plasmodium* cinsine ait tek hücreli, hücre içi parazitler tarafından oluşturulan enfeksiyöz bir hastalıktır. İnsanda sıtma etkeni olan *Plasmodium* türleri; *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* ve *P.falciparum*'dur. Ülkemizdeki sıtma etkeni *P.vivax*'tır. *P.falciparum* ise mortaliteye sebep olan türdür (8).

Günümüzde sıtma tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bildirimi mecburi hastalıklardandır. Sıtma halen dünyada yaygın bir hastalıktır. D.S.Ö. tarafından 100 ülkede sıtmanın endemik olduğu kabul edilmektedir. 2 milyar 400 milyon kişi sıtma riski altında yaşamaktadır. Yıllık sıtma insidansı 300–500 milyon olarak tahmin edilmekte ve bunların % 90'ı Afrika kıtasındadır. Her yıl 1 milyon 100 bin ila 2 milyon 700 bin kişi sıtmadan ölmektedir (8).

1955 yılında D.S.Ö.'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 vakası 1970'te 1.263'e düşmüştür. Zamanın hükümetinin sıtmanın ülkemizden eradike edildiği yönündeki açıklaması ile dış yardımlar kesilmiş, teşkilat yapısı küçültülmüş ve bu rehabet sonucu 1971'den başlayarak sıtma vakaları tekrar artmış, 1977'de Çukurova'da ciddi bir sıtma epidemisi olmuş ve vaka sayısı 115.512'ye yükselmiştir. İkinci büyük epidemi ise 1994 yılında Güneydoğu Anadolu bölgesinde olmuş ve vaka sayısı 84.345 olmuştur.1996 yılından itibaren sıtma insidansında düşüş izlenmeye başlanmıştır.2007 yılında 775.502 kişinin kanları alınarak 358 vaka tespit edilmiştir ki bu sonuç son 35 yılın en düşük rakamıdır (8).

Ülkemizde sıtma olgularının çoğunluğu yerli ya da intikal olgu olarak sınıflandırılmaktadır. Olgu sınıflandırılması yıllara göre ele alındığında yerli olgu oranı artmaktadır. 1980'li yıllarda yerli olgular toplam olguların %60'ını, intikal olgular %27'sini oluştururken, 1998 yılında yerli olgular %83, intikal olgular %17 olarak saptanmıştır.

Bunun nedeni, son yıllarda GAP'ın devreye girmesi ile 1980'li yıllarda Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden Çukurova-Amik Ovası Bölgesi'ne tarım alanında çalışmak için göçer işçilerin bu bölgeye daha az gelmeleridir. Türkiye'de saptanan olgular *P.vivax* etkenine bağlı olarak gelişen olgulardır. Ancak 1993-1998 yılları arasında dış kaynaklı olmak üzere 85 *P.falciparum*, dört *P.malariae* ve bir *P.ovale* olgusu saptanmıştır. Bu olguların büyük bir bölümünü Afrika ve Uzakdoğu ülkelerinden gelen kişiler oluşturmaktadır (60).

Tablo-VII. Yurtdışı Kaynaklı Sıtma Vakalarının Parazit Türüne Göre Dağılımı, 2002-2007 (8)

YIL	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P.malariae</i>	<i>P.ovale</i>	<i>P.v/P.f</i>	TOPLAM
2002	25	12	3			40
2003	27	12			1	40
2004	37	13				50
2005	16	32				48
2006	16	29				45
2007	16	29				45

Halen sıtma tanısında kalın damla ve ince yayma kan örneklerinin mikroskopla incelenmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (61). Bununla beraber Craig ve ark. mikroskobinin sıtma tanısında altın standart olamayacağını, düşük parazitemili olgularda ve miks infeksiyonlarda paraziti saptayamadığını, mikroskopi sonuçlarının yorumlanmasında belirsizlik olduğunu ve preperasyon hazırlama prosedürlerinde uyumsuzluk olduğunu bildirmişlerdir (25). Hemme ve ark. Thai-Myanmar sınırında yaptıkları çalışmalarında, hastalardan alınan kan örneklerini 10 farklı laboratuvarda mikroskopi ile incelemişler ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Çalışmada, laboratuvarlar arasında özgüllük oranlarının %93,5 ile %98,3, duyarlılığın ise %92,6 ile %96,6 arasında değiştiği bildirilmiştir (62).

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 (23). Aynı araştırmacı başka bir yayınında mikrolitrede 100'den fazla parazit varsa hızlı tanısal testlerin duyarlılığının %90'nın üzerine çıktığını, oysa PCR'in mikrolitrede

beş parazitin altındaki parazitemi değerlerinde bile pozitif sonuç verebildiğini ifade etmiştir (63).

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 (63).

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 laboratuarlarda uzman mikroskopistler tarafından değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Ama deneyimli mikroskopistler bile hala türlerin tanımlanmasında hatalar yapmakta ve mikst enfeksiyonları atlamaktadırlar (64).

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 büyütme ışık mikroskopunda, laboratuvarda ise 20 dakika süreyle x1000 büyütme ışık mikroskopunda incelenmiştir. μl 'de 5000'den fazla parazit bulunduğu *P.vivax* ve *P.falciparum*'u pozitif saptama oranları laboratuvar ve saha şartlarında aynı iken, μl '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 (65).

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 (23,28,66).

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'ın *Plasmodium*'ların tanısındaki duyarlılığı arttırılmıştır (48). *Plasmodium*'ların tanısında PCR, başlıca rutin tanı ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. PCR, epidemiyolojik çalışmalarda mikroskobinin kalite kontrolünün değerlendirilmesinde mükemmel bir tekniktir (67). Bununla beraber sıtmanın önemli bir sağlık problemi olduğu birçok ülkede PCR'ın tanıda kullanılmasına sıcak bakılmamaktadır. Bu bölgelerdeki yüksek bulaş ve maddi problemler PCR'ın tanısal 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 tanısal 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 (63).

PCR için kan örnekleri filtre kâğıtlarına emdirilmekte veya EDTA'lı, PBS'li, sitratlı ve heparinli tüplere alınmaktadır (43,45,49,53,68-76). 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 (72,77,78). Heparinli tüplere toplanan kan örneklerinde yaşanan en önemli problem ise PCR'ın heparin ile inhibe olmasıdır (51). 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 (44,45,46). 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 (67). Bu tez çalışmasında, PCR çalışması için kan örnekleri 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™ Plus Minipres DNA saflaştırma sistemi, Isocode STIX PCR Template Preparation Dipstick yöntemi ve QIAamp DNA Blood Kit gibi ticari ekstraksiyon kitleri de kullanılmaktadır (47,53-55,79-81). Tez çalışmasında QIAamp DNA Blood Kiti kullanıldı.

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 mikroskopik olarak *P.vivax* olan 119 örneğin 108 tanesi PCR ile pozitif olarak bulunmuştur (44). Sethabutr ve ark. yaptıkları benzer bir çalışmada Chelex-100 metodunu kullanmışlardır. Çalışmada mikroskopik olarak *P.falciparum* olan 103 örneğin 96 tanesini ve mikroskopik olarak negatif olan 155 örneğin 10 tanesini PCR ile pozitif olarak bulunmuştur (75).

Patsoula ve ark. multipleks PCR kullanarak yaptıkları bir çalışmada *P.falciparum* ve *P.vivax*'ı kan örneklerinden saptamış ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Çalışmada kan örnekleri hem EDTA'lı tüplere hem de Whatman 3M filtre kâğıtlarına alınmıştır. Filtre kâğıtlarından DNA ekstraksiyonu, Chelex 100 kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada small-subunit rRNA gen bölgesi hedeflenmiş ve genus spesifik primer PL3, *P.vivax* için olan spesifik primer PL4 ve *P.falciparum* spesifik primer PL5 kullanılmıştır. Çalışmada 124 hastanın kan örnekleri incelenmiş ve PCR ile 53 örnek *P.falciparum* ve 3 örnek de *P.vivax* olarak tanımlanmıştır. Multipleks PCR'ı nested ve semi-nested PCR ile karşılaştırdıklarında, multipleks PCR'ın nested PCR'dan daha hızlı olduğunu, duyarlılık ve özgüllük oranlarının da daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Yine multipleks PCR'ın mikroskobiden daha duyarlı olduğu ifade edilmiştir. Çünkü bu çalışmada mikroskobinin atladığı iki örnek PCR ile pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmada multipleks PCR'ın *P.vivax* ve *P.falciparum* miks enfeksiyonlarını mikroskobiden daha iyi saptadığı, bununla beraber mikroskobinin daha basit ve ucuz olduğu ama sıtma tanısında deneyimli mikroskobist gerektiği bildirilmiştir (82).

Henning ve ark. yaptıkları bir çalışmada, Isocode STIX ve Hızlı Kaynatma metodlarını, QIAamp DNA ve fenol-kloroform ekstraksiyon metodu ile karşılaştırmışlar ve

Isocode STIX ve Hızlı Kaynatma metodlarının PCR'in duyarlılığını artırdığını bildirmişlerdir (54).

Halen *Plasmodium*'ların moleküler tanısında konvansiyonel PCR'in yanı sıra nested PCR, seminested PCR, multiplex PCR ve Real-Time PCR başarıyla kullanılmaktadır (55,66,83,84,85,86,87,88). Bu tez çalışmasında da *Plasmodium*'ların genus düzeyinde ve *P.vivax*'ın tür düzeyinde saptanabilmesi için Real Time PCR tekniği kullanılmıştır.

Snounou ve ark. kırsal kesimden toplanan kan örneklerinden dört *Plasmodium* türünü PCR ile tanımlamışlardır. Bu çalışmada PCR ile spesifik oligonükleotit primerler kullanılarak türe özgül 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'in *Plasmodium* karma enfeksiyonlarını yüksek bir oranda saptayabildiğini bildirmişlerdir (43).

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'in 10 parazit/µl parazit yoğunluğunda pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir. Dört *Plasmodium* türünde de yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları tespit edildiğinden, PCR'in sıtmanın klinik olarak değerlendirilmesinde, geleneksel mikroskopiye büyük ölçüde destek sağlayacağı bildirilmiştir (48).

Özensoy ve ark. *Plasmodium*'ların tanınması ve identifikasyonunda nested PCR'in 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 (89).

Singh ve ark. Malezya’da nested PCR kullanarak yaptıkları bir çalışmada hastane ve kırsal kesim örneklerini incelemişler, sonuçları mikroskopi ile karşılaştırdıklarında nested PCR’ın duyarlılığını %97.4 olarak bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada *P.vivax* ve *P.falciparum*’un miks infeksiyonlarının saptanmasında nested PCR’ın mikroskopiye oranla çok daha hassas olduğu bildirilmiştir (67).

Arai ve ark. *P.falciparum*’u saptamak için, nested PCR kullanarak yaptıkları çalışmalarında, kan örneklerini PBS içeren tüplerde topladıktan sonra saponin lizis yöntemi ile DNA ekstraksiyonu yapmışlar ve dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) gen bölgesini hedefleyen olgonükleotid primerler kullanarak amplifikasyon yapmışlardır. Sonuçlar mikroskopi ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları Tablo-VIII’da görülmektedir (77).

Tablo-VIII. Arai ve Ark.’nın Yaptıkları Çalışmanın Sonuçları (77)

		İnce yayma kan mikroskobisi		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Nested PCR	Pozitif	9 (9)	0 (0)	9 (9)
	Negatif	0 (0)	92 (91)	92 (91)
	Toplam	9 (9)	92 (91)	101 (102)
		Kalın damla kan mikroskobisi		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Nested PCR	Pozitif	6 (6)	3 (3)	9 (9)
	Negatif	16 (16)	76 (75)	92 (91)
	Toplam	22 (22)	79 (78)	101 (102)

Khoo ve ark. *P.falciparum*’un 18S rRNA gen bölgesini hedefleyerek nested PCR metodunu uygulamışlar ve sonuçları mikroskopi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada nested PCR’ın hassasiyetinin %100 olduğu bildirilmiştir (90).

Zakeri ve ark. İran’da yaptıkları çalışmalarında, nested PCR kullanarak 18S rRNA gen bölgesini hedefleyerek *P.falciparum* ve *P.vivax*’ı saptadıklarını, nested PCR’in duyarlılığının mikroskopiye oranla daha yüksek olduğunu, özellikle miks enfeksiyonların saptanmasında ve düşük parazitemili hastaların tanısında mikroskopiye oranla daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir (91).

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. Bu çalışmada 52 hastanın kanını incelemişlerdir. Sonuçlar daha sonra mikroskopi, ParaSight-F ve ICT Malaria Pf testleri ile karşılaştırılmıştır (92). Sonuçlar Tablo-IX’da görülmektedir.

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 (92).

Tablo-IX. Tham ve Ark.’nın Yaptıkları Çalışmanın Sonuçları (92)

	Mikroskopi	PCR			ParaSight-F	ICT Malaria Pf
		Cins	Pf	Pv		
<i>P.falciparum</i>	16	16	16	0	13	16
<i>P.vivax</i>	34	34	0	34	9	1
<i>Toplam</i>	50	50	16	34	22	17

Padley ve ark. EDTA’lı tüplerde topladıkları kan örneklerini QIAamp DNA Mini kit kullanarak ekstrakte etmişler ve dört *Plasmodium* türü için genus spesifik primer ve *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* için tür spesifik primerler kullanarak multiplex PCR yöntemini denemişlerdir. PCR karışımı için ticari bir kit (HotStarTaq Master Mix Kit =

QIAGEN) kullanılmıştır. Çalışmalarında mikroskopisi pozitif 32 hasta örneğini incelemişlerdir. PCR ile 21 örneği *P.falciparum*, 4 örneği *P.malariae*, 3 örneği *P.vivax* ve 4 örneği de *P.ovale* olarak tanımlamışlar, miks enfeksiyona rastlanılmamıştır. Çalışmada bu metodun nested veya seminested PCR'a oranla daha hızlı olduğu, çapraz kontaminasyon riskinin daha düşük olduğu ve periferik kan yaymasında saptanamayacak seviyedeki düşük parazitemi olgularında bile *Plasmodium*'ları saptayabildiği bildirilmiştir (73).

Kho ve ark. yaptıkları bir çalışmada 260 örnekte multiplex PCR kullanarak *Plasmodium*'ların 18S rRNA geninde bulunan *P.falciparum*'un 1451-bp DNA fragmanını ve *P.vivax*'ın 833-bp'lik DNA fragmanını amplifiye etmişler ve elde ettikleri sonuçları mikroskopi ile karşılaştırmışlar. Bu çalışmada kan örnekleri EDTA'lı tüplerde toplanmış, DNA ekstraksiyonu için QIAamp DNA kiti kullanılmıştır. Çalışmada genus spesifik bölgenin tanınması için forward universal primer (UF), tür spesifik bölgeler için revers primerler (*P.falciparum* için FR ve *P.vivax* için VR) kullanılmıştır. Çalışmada multiplex PCR'ın mikroskopi kadar ve hatta daha iyi olduğu, mikroskobinin pozitif bulunduğu tüm örnekleri PCR'ında pozitif bulunduğunu, ilaveten PCR'ın mikroskobinin atladığı mikst infeksiyonları saptayabildiği bildirilmiştir. Multiplex PCR'ın 0,1 parazit/μl yoğunluğundaki parazit yükünü bile saptayabildiği bulunmuş, klinik örneklerden *P.falciparum* ve *P.vivax*'ın saptanmasında multiplex PCR'ın hassas, özgül ve hızlı bir tanı metodu olduğu bildirilmiştir (55).

Hermesen ve ark. Real Time PCR kullandıkları çalışmalarında kan örneklerini filtre kağıtlarında toplamışlar 18S rRNA gen bölgesini hedefleyen primerlerle *P.falciparum*'u saptamışlar, Real-Time PCR'ın, *Plasmodium* türlerinin saptanmasında oldukça hassas ve duyarlı bir tanı yöntemi olduğunu, bu yöntemin anti-malaryal ilaç direncinin olduğu düşük parazitemili hastalarda ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir (85).

Kain ve ark. mikroskopisi pozitif olan hastalardan aldıkları kan örneklerinde CSP gen bölgesini amplifiye ettikleri çalışmalarında *P.vivax*'ı genotiplendirmesi sonrası testin duyarlılığını %95,2 olarak bulmuşlardır (45). Kimura ve ark. çalışmalarında 18S rRNA ve dihidrofolat redüktaz timidilat sentetaz (DHFR-TS)gen bölgelerini mikrotiter plate hibridizasyon yöntemi ile amplifiye etmişler, yöntemin zahmetli ve deneyimli laboratuvar personeli gerektirdiğinden hastanelerde rutin tanı ve çok geniş epidemiyolojik çalışmalarda uygun olmadığını bildirmişlerdir (78).

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

Tablo-X. Farklı Hedef Gen Bölgelerinin Karşılaştırılması (41)

Hedef gen	Tanımlanan tür	Duyarlılık (PCR) %	Duyarlılık (Mikroskopi) %
<i>Tekrarlayan 21-bp ünite</i>	<i>P.falciparum</i>	88	60
<i>Circumsporozoit geni</i>	<i>P.falciparum</i>	98	100
	<i>P.vivax</i>	96	92
<i>Pf155/RESA</i>	<i>P.falciparum</i>	100	66
<i>18S rRNA</i>	<i>P.falciparum</i>	93	77
<i>DHFR-TS</i>	<i>P.falciparum</i>	100	100

RESA, Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen

DHFR-TS, Dihydro Folate Reductase-Thymidylate Synthase

Bu tez çalışmasında klinik olarak sıtma şüphesi olan 64 kişinin kalın damla, ince yayma sonuçları, hızlı tanı testi sonuçları ve Real-Time PCR sonuçları karşılaştırılmıştır. Mikroskopik inceleme sonucunda, 64 kişiden 25’nin ince yaymalarında *P.vivax* görüldü. Hızlı tanı testi ile çalışılan 64 örneğin 25’inde *Plasmodium* spp. tespit edildi. Tüm örnekler, genus spesifik primerler kullanılarak Real-Time PCR ile incelendi, 64 örneğin 28 tanesi *Plasmodium* cinsi olarak tanımlandı. Daha sonra *P.vivax* spesifik primerler kullanılarak yapılan çalışmada saptanan 28 örneğin *P.vivax* olduğu görüldü. Real-Time PCR’in duyarlılığı ve özgüllüğü %100 bulunurken, mikroskopinin ve hızlı tanı testinin duyarlılıkları %89.3, özgüllükleri %100 bulunmuştur.

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 (72).

Koltaş ve ark. benzer bir çalışmayı Çukurova bölgesinde uygulamışlar, mikroskopi ile PCR'ı 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 20 tanesi (%40) PCR ile pozitif olarak tespit edilmiştir (93).

Ozbilge ve ark. Şanlıurfa'da yaptıkları çalışmada, kompetitif ELISA testi ile *Plasmodium*'ların dört türüne karşı oluşan IgG leri araştırmışlardır. Mikroskopi sonuçlarını standart olarak kullandıklarında, Pan Malaria IgG CELISA (Cellabs) testinin duyarlılığını %83, özgüllüğünü %85 olarak tespit etmişlerdir (94).

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 (95).

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 proteininin farklı olduğu bazı varyant formların saptanmasıdır (56). PCR'ın düşük parazit yükü bulunan kronik ve sıklıkla asemptomatik olan infeksiyonların tanısındaki önemli değeri ortadadır (67).

Contamin ve ark. PCR'ın sıtma aşı çalışmalarında araştırılan MSA-1, MSA-2, CSP ve yüksek polimorfik S antijeni gibi genlerin genetik farklılıklarını araştırmada başarı ile kullanıldığını bildirmişlerdir (70).

Cui ve ark. bugün *Plasmodium*'ların aşı 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 (96).

Plasmodium vivax circumsporozoit proteini (Pvcsp) rekombinant sıtma aşısı çalışmalarının başlıca hedefidir. Pvcsp'nin amino asit sekansının, her biri tekrarlayan karakteristik tandemler içeren, VK210 ve VK247 olmak üzere iki tip olduğu ortaya konmuştur. 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 (97).

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 bağımlıdır. Fakat özellikle endemik bölgelerde yapılan in vivo çalışmalarda ortaya çıkabilecek relaps ve reinfeksiyonların birbirinden ayırt edilememesi bu çalışmalar açısından sorun oluşturmaktadır. Bu ilaç direnci problemi, PCR ile genotiplendirmenin geliştirilmesi ile çözülebileceğine inanılmaktadır (96).

Sonuç olarak tez çalışmasında, sıtma şüphesi olanlarda *Plasmodium*'ları mikroskopi, hızlı tanı testleri ve moleküler yöntemleri (Real-Time PCR) kullanarak saptamak ve türü tanımlamak istedik. Söz konusu moleküler yöntemi, konvansiyonel yöntem ile kıyasladığımızda maliyetinin yüksek olduğu, deneyimli personel ve yüksek iş gücü gerektirdiği, paraziteminin düşük olduğu durumlarda mikroskopi ile yanlış negatif sonuç

verebilme nedeniyle tanıda moleküler yöntemlerin kullanılmasının duyarlılığı arttıracığı sonucuna varılmıştır. Halen sıtma tanısında mikroskobinin altın standart olduğu kabul edilmekle beraber, PCR'ın sıtma şüphesi olup, mikroskobisi negatif olan hastaların saptanmasında ve miks enfeksiyonların tanınmasında faydalı olabileceğine inanmaktayız.

VI- KAYNAKLAR

1. Akdur R. 1999. Sıtmanın Epidemiyolojisi. Sıtma (ed. Özcel MA.) Türkiye Parazitoloji Derneği Yay no:16 İzmir:51-74.
2. Atambay M, Karaman Ü, Yaşar S, Aycan ÖM, Daldal N. 2006. Malatya'da aktif süreyans ile saptanan sıtma vakaları Türkiye Parazit Derg, 30(2): 86-88.
3. Chernin J. 2001. Parasitology London, GBR: Taylor&Francis. E-library.
4. Krogstad DJ. 2000. *Plasmodium* Species (Malaria) (Eds.Mandel GL, Bennett EJ, Dolin R.). Mandell Douglas and Bennett's Principles and Practice Infection Disease 5th Edi. Vol: II, Churchill Livingstone USA:2817-2831
5. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayaski GS, Pfaller MA. 2002. Nematodes Chapter 77. Medikal Microbiology. Fourth Edition.
6. Saygı G, 2002. Temel Tıbbi Parazitoloji 2. Baskı. Sivas. s: 14-15.
7. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. 1995. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları :15 (5. baskı)
8. Erişim:<http://www.saglik.gov.tr/TR/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF05DF63DF09F5FDEC>, erişim tarihi; 14.04.2008)
9. Özcel M.A. Sıtma. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:16, İzmir,1999.)
10. Lynne S. Garcia, David A. Bruckner. Diagnostic Medical Parasitology. Third Edition. ASM Pres, Washington, 1997.
11. Blanc F., Blanc F.-P., Blanc-B. Geschichte der Tropfenmedizin. Band 5, Vaduz 1992, 2539-2579.
12. Fleischer B. Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of Plasmodia. Tropical Medicine and International Health. 2004; 9:755-756.
13. Markel E.K., John D.T., Krotoski W.A. Markel and Voge's Medical Parasitology. Eight Edition. W.B. Saunders Company, 1999.
14. Akdur R. Sıtma Eğitim Notları. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Cem Ofset Ltd. Şti. Ankara, 1997.
15. 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.
16. Ferreira M.U., da Silva Nunes M., Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2004;11(6):987-995
17. Greenwood B.M., Bojang K., Whitty C.J.M., Targett G.A.T. Malaria. Lancet 2005;365:1487-1498

18. Weatherall D.J., Miller L.H., Baruch D.I., Marsh K., Doumbo O.K., Casals-Pascual C., Roberts D.J. Malaria and the red cell. *Hematology*. 2002; 35-57
19. Erişim: <http://infek.med.ege.edu.tr/seminerler/sitma.ppt>. Sipahi OR, Ülkemizde Sıtmanın Durumu Tanı ve Sağaltımda Yenilikler.
20. Konemann E.W. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Five Edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1997.
21. Trampuz A., Jereb M., Muzlovic I., Prabhu R.M. Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*. 2003, 7:315-323
22. Ustağelebi ř. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitapevi. Ankara, 1999
23. Hanscheid T. Diagnosis of malaria; a review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical and Laboratory Haematology*. 1999; 21: 235-245.
24. Lee S.H., Kara U.A.K., Koay E., Lee M.A., Lam S., Teo D. New strategies for the diagnosis and screening of malaria. *International Journal of Hematology*. 2002; 76(1): 291-293.
25. Craig M.H., Sharp B.L. Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 91:279-282.
26. Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. *Lancet*. 1991; 337(8735):200-202.
27. Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan. 2002, s. 69
28. Çeber K., Alahverdiyev A., İbrahimov H. *Plasmodium*'ların hızlı tanısında modifiye Quantitative Buffy Coat (QBC) yönteminin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2001; 25: 330-341.
29. Lema O.E., Carter J.Y., Nagelkerke N., Wangai M.W., Kitenge P., Gikunda S.M., Arube P.A., Munafu C.G., Materu S.F., Adhiambo C.A., Mukunza H.K. Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60(2):177-182.
30. Erişim: <http://www.malariatest.com/index.html>, erişim tarihi; 05.04.2006.
31. Palmer C.J., Lindo J.F., Klaskala W.I., Quesada J.A., Kaminsky R., Baum M.K., Ager A.L. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(1):203-206.
32. Araz E., Tanyuksel M., Ardic N., Tabuk C. Performance of a commercial immunochromatographic test for the diagnosis of *vivax* malaria in Turkey. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94: 55-56.

33. Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Currie B.J., Anstey N.M. Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(8): 2412-2417.
34. Erişim: <http://www.users.iafrica.com/m/ma/makromed/id56.htm>, erişim tarihi; 08.03.2006.
35. Richardson D.C., Ciach M., Zhong K.J., Crandall I., Kain K.C. Evaluation of the Makromed dipstick assay versus PCR for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in returned travelers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(12):4528-4530.
36. Cropley I.M., Lockwood D.N., Mack D., Pasvol G., Davidson R.N. Rapid diagnosis of *falciparum* malaria by using the ParaSight F test in travellers returning to the United Kingdom: prospective study. *BMJ*. 2000; 321(7259):484-485.
37. Humar A., Ohrt C., Harrington M.A., Pillai D., Kain K.C. Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 56(1):44-48.
38. Cropley I.M., Lockwood D.N., Mack D., Pasvol G., Davidson R.N. Rapid diagnosis of *falciparum* malaria by using the ParaSight F test in travellers returning to the United Kingdom: prospective study. *BMJ*. 2000; 321(7259):484-485.
39. Lee S.O., Jeon K., Jeon B.R., Park I. Rapid Diagnosis of Vivax Malaria by the SD Bioline Malaria Antigen Test When Thrombocytopenia Is Present. *J Clin Microbiol*. 2008 March; 46(3): 939-942.
40. Rubio J.M., Buhigas I., Subirats M., Baquero M., Puente S., Benito A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(7):2736-2737.
41. Weiss J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8(1):113-130.
42. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*. 1997; 27(10):1135-1145.
43. Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. 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.
44. Kain K.C., Brown A.E., Mirabelli L., Webster H.K. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;168(5):1323-1326.

45. Kain K.C., Brown A.E., Webster H.K., Wirtz R.A., Keystone J.S., Rodriguez M.H., Kinahan J., Rowland M., Lanar D.E. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30(7):1863-1866.
46. Kain K.C., Lanar D.E. Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29(6):1171-1174.
47. Atambay M. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nun *Plasmodium* ve *Leishmania* modellerinde uygulanması üzerine deneysel araştırmalar. Doktora Tezi. İzmir, 1996.
48. Kamwendo D.D., Dzinjalama F.K., Snounou G., Kanjala M.C., Mhango C.G., Molyneux M.E., Rogerson S.J. *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.
49. Schoone G.J., Oskam L., Kroon N.C., Schallig H.D., Omar S.A. Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* in blood samples using quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(11):4072-4075.
50. Zhong K.J., Kain K.C. Evaluation of a colorimetric PCR-based assay to diagnose *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(2):339-341.
51. Farnert A., Arez A.P., Correia A.T., 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.
52. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991;10(4):506-13.
53. Kain K.C., Keystone J., Franke E.D., Lanar D.E. Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. *Journal of Infectious Diseases*. 1991; 164(1):208-210.
54. Henning L., Felger I., Beck H.P. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. *Acta Tropica*. 1999;72(2):149-155.
55. Kho W.G., Chung J.Y., Sim E.J., Kim M.Y., Kim D.W., Jongwutiwes S., Tanabe K. A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitology International*. 2003;52(3):229-236.
56. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevi. Ankara, 2001.
57. Telefoncu A., Küfrevioğlu Ö.İ., Pazarlıoğlu N. Biyoinformatik-1. İzmir, 2003
58. Louie M., Louie L., Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*. 2000;163(3):301-309.

59. Zeyrek F.Y., Kurcer M.A., Zeyrek D., Şimşek Z. Parasite Density and Serum Cytokine Levels in *Plasmodium vivax* Malaria in Turkey. *Parasite Immunology*. 2006, 28:201-207
60. Erişim: <http://www.ttb.org.tr/STED/sted0800/4.html>, erişim tarihi; 10.11.2007
61. Moody A.H., Chiodini P.L.: Methods for the detection of blood parasites. *Clinical and Laboratory Haematology*. 2000, 22:189-201.
62. Hemme F., Gay F. Internal quality control of the malaria microscopy diagnosis for 10 laboratories on the Thai-Myanmar border. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1998;29(3):529-536.
63. Hanscheid T., Grobusch M.P. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitology*. 2002;18(9):395-398.
64. Ohrt C., Purnomo, Sutamihardja M.A., Tang D., Kain K.C. Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(4):540-546.
65. Coleman R.E., Maneechai N., Rachaphaew N., Kumpitak C., Miller R.S., Soyseng V., Thimasarn K., Sattabongkot J. 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.
66. Moody A. Rapid diagnostic test for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15:66-78
67. Singh B., Cox-Singh J., Miller A.O., Abdullah M.S., Snounou G., Rahman H.A. 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.
68. Barker R.H. Jr, Suebsaeng L., Rooney W., Wirth D.F. 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
69. Brown A.E., Kain K.C., Pipithkul J., Webster H.K. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;86(6):609-612.
70. Contamin H., Fandeur T., Bonnefoy S., Skouri F., Ntoumi F., Mercereau-Puijalon O. PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(4):944-951.

71. Kain K.C., Kyle D.E., Wongsrichanalai C., Brown A.E., Webster H.K., Vanijanonta S., Looareesuwan S. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. *The Journal of Infectious Diseases*. 1994;170(6):1626-1630.
72. Kawamoto F., Miyake H., Kaneko O., Kimura M., Nguyen T.D., Liu Q., Zhou M., Le D.D., Kawai S., Isomura S., Wataya Y. 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.
73. Padley D., Moody A.H., Chiodini P.L., Saldanha J. Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2003; 97(2):131–137.
74. Seesod N., Lunderberg J., Hedrum A., Aslund L., Holder A., Thaithong S., Uhlen M. Immunomagnetic purification to facilitate DNA diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(10):2715-2719.
75. Sethabutr O., Brown A.E., Panyim S., Kain K.C., Webster H.K., Echeverria P. Detection of *Plasmodium falciparum* by polymerase chain reaction in a field study. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992;166(1):145-148.
76. Wataya Y., Arai M., Kubochi F., Mizukoshi C., Kakutani T., Ohta N., Ishii A. DNA diagnosis of *falciparum* malaria using a double PCR technique: a field trial in the Solomon Islands. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993;58(1):165-167.
77. 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.
78. Kimura M., Miyake H., Kim H.S., 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.
79. 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
80. Fridez F., Coquoz R. PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. *Forensic Science International*. 1996;78(2):103-110
81. Xainli J., Baisor M., Kastens W., Bockarie M., Adams J.H., King C.L. Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *Journal of Immunology*. 2002;169(6):3200-3207.

82. Patsoula E., Spanakos G., Sofianatou D., Parara M., Vakalis N.C. A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2003;97(1):15-21.
83. Cheesman S.J., de Roode J.C., Read A.F., Carter R. Real-time quantitative PCR for analysis of genetically mixed infections of malaria parasites: technique validation and applications. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003;131(2):83-91
84. Cox-Singh J., Mahayet S., Abdullah M.S., Singh B. Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using simple sampling and DNA extraction. *International Journal for Parasitology*. 1997;27(12):1575-1577.
85. Hermsen C.C., Telgt D.S., Linders E.H., van de Locht L.A., Eling W.M., Mensink E.J., Sauerwein R.W. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001; 118(2):247-251.
86. Polanco J.C., Rodriguez J.A., Corredor V., Patarroyo M.A. *Plasmodium vivax*: parasitemia determination by real-time quantitative PCR in Aotus monkeys. *Experimental Parasitology*. 2002;100(2):131-134.
87. Rubio J.M., Benito A., Berzosa P.J., Roche J., Puente S., Subirats M., Lopez-Velez R., Garcia L., Alvar J. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(10):3260-3264.
88. Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X.P., Jarra W., Pinheiro L., do Rosario V.E., Thaithong S., Brown K.N. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993;61(2):315-320.
89. Özensoy S., Pinherio L., Alkan M.Z., Özbek Y., Özcel M.A., Sonuncu G., Rosario E.V. *Plasmodium* Enfeksiyonlarının Nested Polimerase Chain Reaction (PCR) ile identifikasyonu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1995;19(2):181-187
90. Khoo A., Furuta T., Abdullah N.R., Bah N.A., Kojima S., Wah M.J. 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.
91. Zakeri S., Najafabadi S.T., Zare A., Djajid N.D. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. *Malaria Journal*. 2002;1:2.
92. Tham J.M., Lee S.H., Tan T.M., Ting R.C., Kara U.A. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf tests in a clinical environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(5):1269-1273.

93. Koltaş I.S., Özcan K., Serin M.S., Köksal F., Aksungur P. Çukurova Bölgesinde *P.vivax* Sıtma Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Kullanılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 1999;23(2):119-121
94. Ozbilge H., Kurcer MA., Dogan N, Zeyrek F. Comparison with the Pan Malaria IgG assays for malaria diagnosis and direct microscopy among suspected malaria patients in Sanliurfa. Tropical Doct. 2006 Jan;36(1):25-6.
95. Zeyrek F.Y., Babaoglu A., Demirel S., Erdogan D.D., Ak M., Korkmaz M., Coban 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., 78(5), 2008, 729-732
96. Cui L., Escalante A.A., Imwong M., Snounou G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. Trends in Parasitology. 2003;19(5):220-226.
97. Zeyrek F.Y., Yüksel M.F., Özkan A.T., 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