Sıtmada Tedavi Sürecinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Takibi: *In Vivo* Model

The Follow-Up of Treatment Process of Malaria By Real-Time Polymerase Chain Reaction: In Vivo Model

İbrahim ÇAVUŞ(ID), Ahmet ÖZBİLGİN(ID), İbrahim Cüneyt BALTIOĞLU(ID)

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Turkey.

*Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: BAP 2016-166).

Makale Atfı: Çavuş İ, Özbilgin A, Baltioğlu İC. Sıtmada tedavi sürecinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile takibi: in vivo model. Mikrobiyol Bul 2021;55(4):603-616.

ÖZ

Sıtma tanısında ve tedavinin takibinde mikroskopik yöntem altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat doğru tanı ve tedavi takibi için mikroskopide deneyimli personel gerektiğinden farklı bir yöntemle tanıyı doğrulamak önem taşımaktadır. Çalışmamızda, sıtma tedavisinin takibinde mikroskopik yöntemlerin yanı sıra gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR)'nın kullanımının uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda her grupta beş adet erkek Balb/c farenin bulunduğu beş grup oluşturulmuştur. Her bir fare intraperitoneal (IP) olarak 10^7 /ml *Plasmodium berghei* parazitiyle enfekte edilmiştir. I, II ve III. grupta bulunan farelere sırasıyla bir gün, iki gün ve üç gün 50 mg/kg/gün klorokin tedavisi, parazitin verildiği günden iki gün sonra uygulanmıştır. IV. gruptaki farelere tedavi uygulanmamış, V. gruptaki farelere ise üç gün serum fizyolojik verilmiştir. Parazitemi durumu 21 gün boyunca farelerin kuyruk ucundan alınan kandan yapılan preparatların kontrolü ve rRT-PCR ile *Plasmodium*'a ait hedef gen bölgesinin varlığıyla kontrol edilmiştir. Üçüncü grup dışındaki gruplarda bulunan farelerin boyalı preparatları ve rRT-PCR sonuçları pozitif olarak saptanmıştır. Üçüncü gruptaki farelerin beşinci ve yedinci gündeki boyalı preparatlarında pozitiflik görülürken diğer preparatları negatif olarak değerlendirilmiştir. rRT-PCR sonuçlarında ise yedinci gün pozitiflik görülürken diğer günlerde parazite ait hedef gen bölgesi saptanamamıştır. Mikroskopi yöntemiyle rRT-PCR yöntemi karşılaştırıldığında her iki yöntemin de paralel sonuç verdiği görülmektedir. Mikroskopik inceleme yöntemi dışında rRT-PCR yönteminin sıtma tanısında ve tedavi sürecinde hastanın takibi açısından önemli olduğu ve birbirini destekleyen farklı yöntemlerin kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sıtma; mikroskopik inceleme; gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi; *Plasmodium berghei*; Türkiye.

ABSTRACT

Microscopic methods are accepted as the gold standard in the diagnosis of malaria and in the follow-up of treatment. However, as the microscopical methods require experienced personnel, it is important to confirm the diagnosis with a different method for accurate diagnosis and treatment follow-up. In our study, we aimed to investigate the utility of the use of real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (rRT-PCR), as well as microscopic methods for malaria treatment follow-up. In our study, we formed five groups each consisting of five male Balb/c mice. Each mouse was injected intraperitoneally with 10^7 /ml *Plasmodium berghei* parasites. After 48 hours following the injection, the mice in the first, second and third groups received 50 mg/kg/day of chloroquine treatment for one, two and three days, respectively. The fourth group was not treated and the fifth group of mice received saline for three days. The parasitemia was monitored for 21 days by blood smears prepared from the end of tail of the mice and searching the presence of the target gene region of the parasite by rRT-PCR. Both the blood smears and rRT-PCR results were positive for groups I, II, IV and V. Both blood smears and rRT-PCR results of mice in groups other than the third group were found to be positive. Blood smears of the mice in third group were found to be positive on the 5th and 7th days of the infection, and the subsequent preparations were evaluated as negative. rRT-PCR results showed positivity on day seven, but no presence of the target gene region of the parasite was detected on the other days. The comparison of microscopy and rRT-PCR methods, had shown parallel results. Apart from the microscopic examination method, it was concluded that the rRT-PCR method is important in the diagnosis of malaria and in the follow-up of the patient during the treatment process, and that different methods that support each other should be used.

Keywords: Malaria; microscopy; real time polymerase chain reaction; *Plasmodium berghei*; Turkey.

GİRİŞ

Sıtma, enfekte dişi Anofel cinsi sivrisineklerin kan emmesiyle insanlara bulaşan, ölüme ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan paraziter bir hastalıktır. İnsanlarda enfeksiyona neden olan sıtma etkenleri; *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*'nin yanı sıra son yıllarda bildirilen *Plasmodium knowlesi* türleridir¹.

Dünya Bankası, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Birleşmiş Milletler Çocuk Fonu [United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF)]'nin 2005 yılında yayımladığı Dünya Sıtma Raporu'nda ilaç direncinin sıtma enfeksiyonunun kontrolünde büyük bir sorun olduğu, bu nedenle birçok ülkenin sıtma ile savaşta ilaç politikalarını değiştirerek yeni antimalaryal ilaçlara ve kombinasyonlara yöneldiği bildirilmektedir².

DSÖ'nün 2017 yılında hazırladığı raporunda 2010 yılından beri dünya genelinde sıtma olgu insidansında azalma izlenmesine karşın, 2014 yılından bu yana düşüş hızının durduğu ve bazı bölgelerde bu durumun tersine döndüğü bildirilmiştir³. DSÖ'nün 2019 yılında hazırladığı son raporunda 2018 yılında yaklaşık 228 milyon, 2010 yılında 251 milyon ve 2017 yılında 231 milyon sıtma olgusu bildirilmiştir⁴. Dünya genelinde bu enfeksiyondan 2010 yılında 585 bin kişinin, 2017 yılında 416 bin kişinin ve 2018 yılında 405 bin kişinin öldüğü ve bu ölümlerin yaklaşık %85'inin Afrika bölgesi ve Hindistan'ın içerisinde olduğu 20 ülkede yoğunlaştığı rapor edilmiştir⁴.

Ülkemizde 2013 yılında 34 ve 2014 yılında beş yerli sıtma olgusu görüldüğü, 2015 yılından bu yana yerli sıtma olgusu görülmediği bildirilmiştir⁴. Ülkemizde görülen yerli sıtma olgularının büyük çoğunluğunun Güneydoğu Anadolu bölgemizle sınırlı olduğu

görülmektedir. Sağlık Bakanlığının etkin ve başarılı sıtma savaş politikaları sonucu ülkemizde 2015 yılından bu yana yerli sıtma olgusu bildirilmemiştir⁴⁻⁶.

Sıtmanın endemik olduğu Afrika ve Uzak Doğu ülkelerine çalışmak için giden vatandaşlarımız ile ülkemizin coğrafik konumunun göç yolu üzerinde yer alması nedeniyle her yıl farklı ülkelere (Sudan, Yemen, Afganistan, Irak, Yemen, Gana, Mali, Hindistan, vb.) ülkemize düzensiz göçmen girişleri sonucunda *P.vivax* ve *P.falciparum* başta olmak üzere *Plasmodium* ile enfekte yurt dışı kaynaklı olgular görülmektedir.

Ülkemizdeki yurt dışı kaynaklı sıtma olgu sayılarını incelediğimizde 1998-2009 yılları arasında 588, 2016 yılında 209, 2017 yılında 214 yurt dışı kaynaklı sıtma olgusu gözlemlendiği bildirilmiştir⁴. Yurt dışı kaynaklı olgularda ilaç direnci, uygun ilaç dozunun verilememesi, ilaçların düzensiz ve eksik kullanılması, kusma veya kullanılan ilacın farmokinetik yetersizliği gibi durumlara bağlı olarak ülkemizde bu kişilerin hastalıklarının tekrar nüks etme ihtimali olabileceği bildirilmiştir⁷⁻⁹.

Sıtma tedavisinde önerilen ilaçlar klorokin, primakin, kinin, meflokin, artemisin ve türevleri; doksisisiklin, tetrasiklin ve klindamisinidir⁷. Ülkemizde görülen sıtma olguları yurt dışı kaynaklı olup tedavileri parazitin alındığı ülkedeki ilaç direnç durumu göz önüne alınarak düzenlenmektedir^{5,10-11}. Tedavi tamamlandıktan sonra olgulardan mutlaka kontrol kanı alınarak sıtma yönünden hem mikroskopi hem de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kontrol edilmesi gerekmektedir¹².

PCR gibi moleküler yöntemlerinin, enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılması, tanısal duyarlılığın artmasına ve daha önce tanı konulamayan birçok etkenin saptanarak hastaların tedavi edilmesine olanak sağlamıştır¹³⁻¹⁴. Sıtma tedavisinin takibinde mikroskopik yöntemlerin yanı sıra, tanı yöntemi olarak rRT-PCR'nin kullanımı ve uygunluğunun araştırılması insanların ölümüne yol açabilen sıtma tedavisinin takibi açısından büyük önem taşımaktadır. Tedavi sonrası kontrollerde mikroskopik yöntemlerle yapılan takibin yanı sıra rRT-PCR yöntemiyle parazit varlığının araştırılması, tedavi sırasında yaşanan aksamalara bağlı olarak hastanın eksik tedavi alması ve/veya direnç durumundaki parazitin tespit edilmesiyle tedavinin yeniden planlanması sağlanarak sıtmanın kontrolü ve etkin tedavisi sağlanmış olacaktır⁹.

Bu çalışmada, laboratuvar çalışmalarında memelilere en uygun sıtma modelinin etkeni olarak bildirilen kemirgen sıtma parazitlerinden *Plasmodium berghei* kullanılmış¹⁵, enfeksiyon sonrası tedavi takibi hem mikroskopik inceleme hem de rRT-PCR ile yapılarak yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 06/12/2016 ve Karar No: 77.637.435-074).

Deney Hayvanları ve Parazit Suşu

Çalışmamızda, American Type Culture Collection (ATCC)/Virginia/ABD'den temin edilen ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası sıvı azot tankında

saklanmakta olan kemirgen sıtma etkeni MRA-311 kodlu *P.berghei* suşu ve deney hayvanı olarak da 2-4 aylık, ortalama 20-25 g ağırlıkta erkek Balb/c fareler kullanıldı.

***Plasmodium berghei*'nin Pasajı ve Deney Hayvanı Enfeksiyonu**

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasında saklanan *P.berghei* suşu sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda çözündürüldü. 37°C'lik su banyosunda çözündürülen *P.berghei* suşu donör fareye intraperitoneal (IP) olarak verildi. Gün aşırı fare kuyruk ucundan kan alınarak ince yayma preparatları hazırlandı ve Giemsa boyası ile boyanarak parazitemi seviyesine bakıldı. Donör farenin parazitemi seviyesi %30 olduğunda kabin içerisinde farenin koltuk altı veni kesilerek %0.5 trisodyum sitrat içeren tüp içerisine 0.5 ml kan alındı¹⁶. Normal bir farede 1 ml kanda yaklaşık 6×10^9 eritrosit bulunmaktadır¹⁷. Alınan kan 10^7 /ml enfekte eritrosit içerecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltili. Seyreltilen kandan oluşturulan gruplarda bulunan her bir fareye 0.20 ml IP (Resim 1) olarak verildi¹⁷. Parazitemi yüzdesi, %parazitemi= (enfekte eritrosit sayısı/toplam eritrosit sayısı) x 100 olarak hesaplandı¹⁶.

Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda oluşturulan beş grubun her birinde 2-4 aylık, ortalama 20-25 g ağırlıkta, beş adet erkek Balb/c cinsi fare bulunmaktadır.

- I. Grup: Bir gün tedavi verilen (50 mg/kg/gün klorokin)
- II. Grup: İki gün tedavi verilen (50 mg/kg/gün klorokin)
- III. Grup: Üç gün tedavi verilen (50 mg/kg/gün klorokin) (Tam tedavi alan)
- IV. Grup: Tedavi almayan
- V. Grup: Serum fizyolojik verilen grup

Farelere sıtma tedavisi için gavaj yardımıyla 50 mg/kg/gün klorokin verildi (Resim 2)¹⁸. I. ve II. grupta yer alan fareler, sıtma tedavisini eksik alan grupları oluşturmaktayken III. grupta yer alan fareler, sıtma tedavisini tam alan grubu oluşturmaktadır. Plasebo etkisinin

Resim 1. *Plasmodium berghei* parazitinin intraperitoneal olarak verilmesi.

Resim 2. Klorokin ilacının gavaj yardımıyla fareye verilmesi.

göz ardı edilmemesi için V. gruba serum fizyolojik verildi. Enfeksiyonun gelişimini izlemek amacıyla IV. gruba tedavi verilmedi.

Tedavi almayan grup dışındaki gruplarda bulunan farelere *P.berghei*'nin verildiği günden iki gün sonra tedaviye başlandı¹⁹.

Tedavi ve Enfeksiyonların Takibi

Çalışmamızda oluşturulan beş gruptan ilk üç gruba klorokin tedavisi uygulandı. Farelere verilen 50 mg/kg/gün klorokin dozunun altı saat içerisinde parazitemiyi azaltabildiği bildirildiğinden dolayı tercih edildi¹⁸. Birinci gruba bir gün 50 mg/kg/gün klorokin tedavi, II. gruba iki gün 50 mg/kg/gün klorokin tedavisi ve üçüncü gruba üç gün 50 mg/kg/gün klorokin tedavisi uygulandı. Üçüncü grup tam tedavi alan kontrol grubu olarak, IV. grup tedavi uygulanmayan kontrol grubu olarak planlanırken V. gruba sadece serum fizyolojik verildi.

Enfekte edildikten sonraki ikinci günde farelerin tedavilerine başlandı ve 21 gün boyunca farelerin enfeksiyon durumları takip edildi. Tedavi bitiminden itibaren gūnaşırı her bir farenin kuyruk ucu kesilerek kan alındı (Resim 3). Alınan kanın bir kısmıyla ince yayma

Resim 3. Fare kuyruk ucundan kan alınması ve preparat hazırlanması.

preparatları hazırlandı ve Giemsa boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda immersiyon (x100) objektif ile incelenerek parazit varlığı açısından kontrol edildi. Alınan kanın geri kalan kısmı rRT-PCR ile parazite ait hedef gen bölgesi aranarak kontrol edildi.

RNA İzolasyonu

rRT-PCR çalışması için gerekli RNA izolasyonu işlemi QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qia-gen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun olarak yapıldı. Elde edilen RNA'lar çalışma yapılana kadar mikrosantrifüj tüp içerisinde -86°C'de bekletildi²⁰.

cDNA Eldesi

cDNA eldesi amacıyla high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, ABD) kullanıldı. Çalışma için gerekli olan karışım her bir örnek için; 2 µl 10x RT tampon çözeltisi, 2 µl 10x RT random primerleri, 0.8 µl 25x dNTP, 1 µl MultiScribe™ revers transkriptaz, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve 10 µl RNA olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnek, 0.2 µl hacminde mikrosantrifüj tüpleri içerisinde hazırlandı ve ısı döngü cihazına yerleştirilerek yukarıda belirtilen döngü ile cDNA eldesi gerçekleştirildi²¹ (Tablo I).

Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

P.berghei parazitinin 18S ribozomal RNA gen bölgesine özgü primerleri kullanılarak rRT-PCR çalışıldı²². *P.berghei* 18S rRNA için ileri primer AAG CAT TAA ATA AAG CGA ATA CAT CCT TAC ve geri primer GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT G şeklinde belirlendi. rRT-PCR için primer çözeltisi 1 µl ileri primer, 1 µl geri primer, 18 µl nükleaz içermeyen su olarak hazırlandı. rRT-PCR analizinde, her bir örnek için toplam 23 µl karışım hazırlandı. Karışım; 12.5 µl 2x SYBR green PCR master karışımı, 1.6 µl primer çözeltisi ve 8.9 µl nükleaz içermeyen su içerecek şekilde hazırlandı. 2 µl cDNA eklenerek karışım rRT-PCR cihazına (Rotor-Gene Q, Almanya) yüklendi ve PCR protokolüne uygun olarak çalışma gerçekleştirildi²² (Tablo II). PCR protokolünde ön denatürasyon bir döngü 95°C 15 dakika ve ardından 40 döngü şeklinde uygulandı. Her bir döngü 95°C'de 20 saniye denatü-

Tablo I. Isı Döngü Cihazında cDNA Protokolü

	1. basamak Primer bağlanması	2. basamak DNA polimerizasyonu	3. basamak Enzim deaktivasyonu	4. basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

Tablo II. *Plasmodium berghei* Parazitinin 18S Ribozomal RNA Gen Bölgesine Özgü Primerleri ile Hazırlanan Gerçek Zamanlı PCR Sıcaklık Protokolü

Program	Döngü	°C	Süre
Ön denatürasyon	1	95	15 dk
		95	20 sn
Amplifikasyon	40	60	30 sn
		72	50 sn

rasyon, 60°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 50 saniye uzama aşamalarını içerecek şekilde gerçekleştirildi. rRT-PCR çalışması sonunda Rotor-Gene Q cihazının analiz programına göre amplifikasyon grafikleri değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışma gruplarının farelerin kuyruk ucundan alınan kandan yapılan Giemsa boyaması ile boyanan preparatlarının ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmesi sonucunda;

Bir gün tedavi alan I. grup farelerin ince yayma preparatlarında parazitin verildiği üçüncü günden itibaren *P.berghei* parazite rastlanmıştır. Bu gruptaki farelerin kan yaymaları incelendiğinde paraziteminin giderek arttığı ve 15. günde farelerin öldüğü gözlenmiştir (Resim 4).

İki gün tedavi alan II. grup farelerin ince yayma preparatları incelendiğinde üçüncü günden itibaren *P.berghei* parazite rastlanmış fakat ilk gruba göre ilk günlerde parazitemi hızının daha yavaş sonrasında ise logaritmik olarak arttığı görülmüştür. II. grup farelerin 17. günde öldüğü gözlenmiştir (Resim 5).

Üç gün tedavi alan III. grup farelere parazit verildikten sonra; ikinci, beşinci ve yedinci günlerde yapılan ince yayma kan preparatlarında *P.berghei* parazite rastlanmış fakat daha sonraki günlerde yapılan preparatlarında parazite rastlanmamıştır (Resim 6).

Tedavi almayan IV. Grup farelerin ince yayma preparatlarında parazitin verildiği ikinci günden itibaren *P.berghei* paraziti gözlenmiştir. Ardışık günlerde yapılan preparatların incelenmesinde paraziteminin giderek arttığı gözlemlenmiş ve bu gruptaki farelerin enfeksiyon verildikten 13 gün sonra öldüğü görülmüştür (Resim 7).

Aynı şekilde serum fizyolojik verilen V. grup farelerin ince yayma preparatları incelendiğinde paraziteminin giderek arttığı görülürken bu gruptaki farelerin de 13 gün sonra öldüğü görülmüştür (Tablo III).

Resim 4. Bir gün tedavi verilen I. grup farelerin Giemsa boyalı preparatı.

Resim 5. İki gün tedavi verilen II. grup farelerin Giemsa boyalı preparatı.

Resim 6. Tam tedavi verilen III. grup farelerin tedavi sonrası Giemsa boyalı preparatı.

Tedavi bitiminden sonra ardışık günlerde farelerden alınan kanların rRT-PCR ile *P.berghei* parazetine ait hedef gen bölgesinin varlığı açısından değerlendirilmiştir. Enfeksiyonunun yedinci gününde tüm grupların kanlarında *P.berghei* PCR pozitifliği saptanmıştır. Daha sonraki günlerde alınan kanlarda ise I, II, IV ve V. gruplardaki farelerin tüm örneklerinde PCR pozitifliği saptanırken, III. grup farelerin kan örnekleri negatif sonuç vermiştir (Şekil 1) (Tablo IV).

TARTIŞMA

Dünyada yaklaşık 170 *Plasmodium* türü tanımlanmakla birlikte, insanlarda enfeksiyona neden olan sıtma etkenleri *P.vivax*, *P.falciparum*, *P.malariae*, *P.ovale* ve *P.knowlesi* türleridir¹.

Resim 7. Tedavi verilmeyen IV. grup farelerin Giemsa boyalı prepatı.

Tablo III. Giemsa Boyalı İnce Yayma Preparatlarının İmmersiyon Mikroskobu ile İncelenme Sonucu *Plasmodium berghei* Saptanma Durumu ve Yüzdesi

Gün	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup	V. Grup
0.	P (%1)	P (%1)	P (%1)	P (%1)	P (%1)
1.	T	T	T	P (%2)	T
2.		T	T	P (%4)	T
3.	P (%3)	P (%1)	T	P (%7)	T
5.	P (%5)	P (%1)	P (%2)	P (%9)	P (%10)
7.	P (%9)	P (%3)	P (%1)	P (%12)	P (%13)
9.	P (%12)	P (%5)	N	P (%16)	P (%17)
11.	P (%15)	P (%8)	N	P (%20)	P (%22)
13.	P (%19)	P (%12)	N	Eksitus	Eksitus
15.	Eksitus	P (%17)	N	-	-
17.	-	Eksitus	N	-	-
19.	-	-	N	-	-
21.	-	-	N	-	-

P: Pozitif, N: Negatif, T: Tedavi.

DSÖ'nün uyguladığı kontrol programları sayesinde dünya genelinde sıtma olgularında ve ölüm oranlarında büyük oranda azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir. DSÖ'nün sıtma raporuna göre 2010 yılında 251 milyon ve 2017 yılında 231 milyon sıtma olgusu bildirilirken 2019 yılında endemik 87 ülkeden yaklaşık 229 milyon sıtma olgusu bildirilmiştir. Sıtma nedeniyle hayatını kaybedenlerin sayısı 2000 yılında 736 bin iken 2019 yılında 409 bin kişiye düştüğü bildirilmiştir^{3,4,23}.

Son yıllarda ülkemizde görülen sıtma olgularının tümü yurt dışı kaynaklı olgulardır. Yurt dışı kaynaklı olguların büyük bir kısmının geldikleri ülkelerde tanı konulması ve teda-

Şekil 1. Gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrileri.

Tablo IV. Gerçek Zamanlı PCR Sonucu *Plasmodium berghei* Saptama Durumu

Gün	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup	V. Grup
7.	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
9.	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
11.	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
13.	Pozitif	Pozitif	Negatif	Eksitus	Eksitus
15.	Eksitus	Pozitif	Negatif	-	-
17.	-	Eksitus	Negatif	-	-
19.	-	-	Negatif	-	-
21.	-	-	Negatif	-	-

vi verilmesine rağmen bu kişilerin tedavilerini tam olarak almadıkları ve bu nedenle de ülkemizde hastalıklarının nüks ettiği gözlenmiştir.

Ishih ve arkadaşları 2006 yılında, *P.berghei* ile enfekte farelerde klorokin tedavi süresi ve parazit yükünün etkisini araştırdıkları çalışmada²⁴, 10^3 /ml *P.berghei* ile enfekte üç grup fareye bir, iki ve üç gün boyunca 20 mg/kg oral klorokin tedavisi uyguladıklarını bildirmiştir. İki ve üç gün tedavi alan gruplardaki farelerin tedavilerinin etkili olduğu, mikroskopik incelemede parazitin tespit edilmediği bildirilmiştir. Bir gün tedavi alan gruptaki farelerin kan yaymaları incelendiğinde yedinci ve 11. günlerde parazit tespit edilmezken 13. ve 15. günlerde mikroskopik incelemede parazit tespit edildiği ve farelerin 28. günde öldüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmanın devamında 10^5 /ml *P.berghei* ile enfekte üç grup fareye bir, iki ve üç gün boyunca 20 mg/kg oral klorokin tedavisi uygulanmış, üç gün tedavi alan gruptaki farelerin parazittemlerinde artış olmadan deney süresi boyunca hayatta kaldıkları ve mikroskopik incelemede parazit tespit edilmediği bildirilmiştir. Bir ve iki gün tedavi alan gruptaki farelerde ise başlangıçta paraziteminin azaldığı fakat daha sonra

artığı ve farelerin öldüğü bildirilmiştir. Çalışmamızdan farklı olarak daha az parazit yüküyle enfekte edilen farelerde bile eksik alınan tedavinin hastalığın seyri açısından kötü sonuçlar doğurabileceği ve sadece mikroskopik incelemeyle yapılan taramanın yeterli olmadığı yapılan çalışmada bildirilmiştir²⁴.

Perandin ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada²⁵, sıtmanın endemik olduğu bölgeden dönen ve ateş şikayeti olan 122 hastadan alınan kan örneklerinde mikroskopik inceleme ve PCR yöntemiyle sıtma taraması yapılmıştır. Tarama sonucunda mikroskopik incelemeyle 61, PCR yöntemiyle ise 62 kişide pozitiflik bildirilmiştir.

Mangold ve arkadaşlarının 2005 yılındaki çalışmasında²⁶, 358 hastanın kan örneği incelenmiştir. Bu örneklerden 76'sı mikroskopik incelemeyle pozitif bulunmuştur. Mikroskopik inceleme ile pozitif bulunan ve tür tayini yapılan 76 örneğin 74'ünde PCR yöntemi ile tür tayini yapılabilmektedir. PCR yöntemi ile tespit edilemeyen iki örneğin mikroskopik olarak %0.01 oranında *P.falciparum* parazitemisi olduğu bildirilmiştir.

Elsayed ve arkadaşları, 2006 yılında 78 hastayı sıtma açısından mikroskopik inceleme ve rRT-PCR yöntemleriyle taramış, mikroskopik incelemeyle 28 hastanın, PCR yöntemi ile 27 hastanın pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, mikroskopik inceleme ile *P.ovale* olarak tanı konulan hastanın PCR yöntemi ile negatif olduğu saptanmıştır²⁷.

Nwakanma ve arkadaşlarının Batı Afrika ülkesi olan Gambiya'da 2009 yılında yapmış olduğu çalışmada²⁸, sıtma şüphesiyle polikliniğe başvuran 386 hastanın kan, tükürük ve idrar örneklerinin tanısal doğruluğunun mikroskopik inceleme ve PCR yöntemi ile karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada 386 hastanın Giemsa boyalı preparatlarının mikroskopik incelemesi iki farklı uzman tarafından yapılmıştır. Tüm kan örneklerini inceleyen birinci uzman 54 örneği pozitif, ikinci uzman ise 62 örneği pozitif olarak sonuçlandırmıştır. PCR yöntemiyle kan örnekleri değerlendirildiğinde 68 örnek pozitif olarak saptanmıştır. Bu çalışmada sıtma tanısında altın standart kabul edilen mikroskopik inceleme yönteminde preparatların deneyimli kişiler tarafından değerlendirilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Ancak deneyimli uzman tarafından incelemeye karşın, örnekte parazit sayısı çok az olduğunda veya iyi boyanmayan preparatlarda mikroskopik inceleme sonucunun yanlış negatif olarak değerlendirme olasılığı bulunmaktadır.

Rantala ve arkadaşları 2010 yılında Malavi'de 475 gebe hastanın sıtma tanısında, mikroskopik inceleme yöntemi ile PCR yöntemini karşılaştırmıştır. Mikroskopik inceleme ile 14 hastanın pozitif olduğu saptanırken, bunların 11'i *P.falciparum*, üçü *P.malariae* olarak tanımlanmıştır. PCR yöntemi ile 51 hastada pozitif sonuç elde edilmiş, mikroskopik inceleme yönteminde *P.falciparum* tanısı konan bir hastanın, *P.malariae* tanısı konan üç hastadan ikisinin negatif olduğu ve negatif olarak bildirilen 461 hastadan 40'nda *P.falciparum* pozitifliği bildirilmiştir²⁹.

Genç ve arkadaşları, 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Bölümüne 1999-2009 yılları arasında sıtma şüphesiyle başvuran 92 hastanın kan örneklerini mikroskopik inceleme ve PCR yöntemleri ile değerlendirmiştir. Mikroskopik inceleme so-

nucunda 44 hasta pozitif saptanırken, rRT-PCR yöntemi ile 56 hasta pozitif olarak bildirilmiştir³⁰.

Dormond ve arkadaşları, 2004-2008 yılları arasında tanı laboratuvarlarına gelen ve mikroskopik inceleme ile pozitif olarak belirlenen 83 hastayı incelemiştir. Mikroskopik inceleme ile yapılan tür tanımlamasını doğrulamak amacıyla multipleks PCR yöntemi kullanılmış ve dokuz örneğin uyumsuz olduğu saptanmıştır. Tedaviye başladıktan sonra parazit yükünün takibi için mikroskopik inceleme ve PCR yöntemi kullanılmış ve sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu bildirilmiştir. PCR yönteminin birden çok etkenle oluşan enfeksiyonların tanımlanması ve tedavi etkinliğinin izlenmesi için yararlı olduğu kanısına varılmıştır³¹.

Congpuong ve arkadaşlarının 2012 yılında Tayland'ın Bölge Sıtma Merkezinde yaptıkları çalışmada³² mikroskopik inceleme ile 475 hastanın hepsi negatif olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra tüm örnekler PCR yöntemi ile çalışılmış ve bir uzman tarafından tekrar incelenmiştir. Bunun sonucunda uzman incelemesi ve PCR yöntemi ile sekiz kişi sıtma açısından pozitif bulunmuş, bir örneğin yalnız PCR yöntemiyle pozitiflik gösterdiği bildirilmiştir.

Lo ve arkadaşlarının Myanmar-Çin sınırında 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada³³, 63 olguda *P.falciparum* enfeksiyonu tanısı konmuş, hastaların tedavi takibi rRT-PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Tedaviye bağlı olarak parazitlerde meydana gelen morfolojik değişikliklerden dolayı parazit yükünü mikroskopik yöntemle belirlemenin uygun olmadığı bildirilmiş ve antimalaryal tedavi sırasında rRT-PCR yönteminin kullanılmasının takip açısından önemli olduğu vurgulanmıştır. Çalışmalarında hastaların %9.5'inde 2-3 günlük tedaviden sonra tekrarlayan parazitemi görüldüğü bildirilmiştir.

Sıtma tanısında ve tedavisinin takibinde Giemsa boyalı yayma preparatlarının mikroskopik incelemesi halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Özellikle saha taramalarında kullanımının kolay, düşük maliyetli ve malzemelerinin kolay bulunuyor olması gibi avantajlar nedeniyle mikroskopik inceleme yöntemi yaygın kullanılmaktadır. Tedavi sürecindeki hastanın takibi ve tedavisini tamamlamayan olgularda tanı koymak oldukça zordur ve bu olguların büyük çoğunluğunda parazit atipik formda görülmektedir. Bu nedenle ince yayma kan preparatlarının incelenerek doğru tanı ve tür tayininin yapılması için deneyimli uzmanlara gereksinim vardır. Sıtma tanısında, parazitin tanınması ve tür tespiti hastalığın tedavisine yön verdiği için büyük önem taşımaktadır. Ülkemizde olgu sayılarının çok fazla olmaması deneyim eksikliğine neden olmakta ve bu durum bazı olguların atlanmasına neden olabilmektedir.

Çalışmamızda, sıtma tedavisinin takibinde mikroskopik inceleme ile rRT-PCR yöntemleri karşılaştırılarak kullanımının uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Mikroskopik inceleme yöntemi ile tür tayini deneyimli bir uzman tarafından yapılamıyorsa PCR yöntemi ile doğrulanması gerekmektedir. Yöntemlerden sadece birinin kullanılması durumunda parazitemi yükü az olduğunda yanlış negatif sonuç verilmesine neden olabileceği gözlenmektedir. Her iki yöntemin kullanılmasıyla meydana gelebilecek hatalar önlenerek,

ölüme neden olabilen sıtmanın tanı ve tedavi takibi herhangi bir aksaklığa neden olmadan sağlanmalıdır. rRT-PCR yönteminin kullanılmasının tanı, tür tayini ve tedavi takibinde büyük kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir. Özellikle tedavi sırasında ve sonrasında mikroskobik inceleme yöntemi ile birlikte rRT-PCR yönteminin kullanılmasının ülkemizdeki yurt dışı kaynaklı olguların takibinde ve verilecek tedavinin belirlenmesinde klinisyenlere yardımcı olacağı kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleşmesinde *Plasmodium berghei* suşunu sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasına teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 06/12/2016 ve Karar No: 77.637.435-074).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. Clin Microbiol Rev 2013; 26(2): 165-84.
2. World Malaria Report 2005. World Health Organization; 2005.
3. World Malaria Report 2017. World Health Organization; 2017.
4. World Malaria Report 2019. World Health Organization; 2019.
5. Özbilgin A, Topluoğlu S, Es S, İşlek E, Mollahaliloğlu S, Erkoç Y. Malaria in Turkey: successful control and strategies for achieving elimination. Acta Trop 2011; 120(1-2): 15-23.
6. World Malaria Report 2015. World Health Organization; 2015.
7. T.C. Sağlık Bakanlığı. Sıtma Vaka Yönetimi 2019. Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-sitma/rehberler>
8. Sargın-Altunok E, Aynioğlu A, Azak-Karali E, Mutlu B, Willke A. Kocaeli ilinde yurtdışı kaynaklı *Plasmodium falciparum* sıtması: 16 olgunun değerlendirilmesi. Klimik Dergisi 2016; 29(2): 86-9.
9. Demiraslan H, Erdoğan E, Türe Z, Kuk S, Yazar S, Metan G. Yurt dışı kaynaklı *Plasmodium falciparum* sıtması olgularının değerlendirilmesi: tanıda polimeraz zincir reaksiyonunun yeri. Mikrobiyol Bul 2013; 47(4): 668-76.
10. Kuman H. Sıtma (Malaria), pp:31-55. In: Özcel MA (ed), GAP'ı Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. 1993, İzmir.
11. Özcel MA. Kan ve Dokularda Görülen Protozoon Hastalıkları, pp:79-132. In: Özcel MA, Özbek Y, Ak M (eds). Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007, İzmir.
12. Postigo M, Mendoza-Leon A, Peraz HA. Malaria diagnosis by the polmerase chain reaction: a field study in South-Eastern Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92(5): 509-11.
13. Menon PK, Kapila K, Ohri VC. Polymerase chain reaction and advances in infectious disease diagnosis. Med J Armed Forces India 1999; 55(3): 229-31.
14. Zauli DAG. PCR and Infectious Diseases, pp:954. In: Nagpal ML, Boldura OM, Balta C, Enany S (eds). Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science. 2019.
15. McCutchan TF, Dame JB, Miller LH, Barnwell J. Evolutionary relatedness of *Plasmodium* species as determined by the structure of DNA. Science 1984; 225(4664): 808-11.

16. Hailesilase GG, Rajeshwar Y, Hailu GS, Sibhat GG, Bitew H. In vivo antimalarial evaluation of crude extract, solvent fractions and TLC-isolated compounds from *Olea europaea* Linn subsp. *cuspidata* (Oleaceae). eCAM 2020; 2020.
17. Ryg-Cornejo V, Ioannidis LJ, Hansen DS. Isolation and analysis of brain-sequestered leukocytes from *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice. J Vis Exp 2013; (71): e50112.
18. Ch'ng JH, Lee YQ, Gun S, Chia WN, Chang ZW, Wong LK, et al. Validation of a chloroquine-induced cell death mechanism for clinical use against malaria. Cell Death Dis 2014; (2014): e1305.
19. Maslachah L, Sugihartuti. Increase in neutrophil count after repeated exposure of *Plasmodium berghei* infected mice to artemisinin. Univ Med 2017; 36(1): 59-8.
20. Qiagen. QIAamp RNA Blood Mini Handbook 2010. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5ea61358-614f-4b25-b4a5-a6a715f9d3aa&lang=en>
21. Applied Biosystems. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol 2006. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814#4368814>
22. Pichugin A, Krzych U. Detection of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* liver stage parasite burden by quantitative real-time PCR, pp 81-89. In: Vaughan A (eds). Methods in Molecular Biology. 2015, Humana Press, New York.
23. World Malaria Report 2020. World Health Organization; 2020
24. Ishih A, Suzuki T, Muregi FW, Matsui K, Terada M. Chloroquine efficacy in *Plasmodium berghei* NK65 infected ICR mice, with reference to the influence of initial parasite load and starting day of drug administration on the outcome of treatment. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37(1): 13-7.
25. Perandin F, Manca N. Development of real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. J Clin 2004; 42(3): 1214-9.
26. Mangold KA, Manson UR, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. J Clin 2005; 43(5): 2435-40.
27. Elsayed S, Plewes K, Church D, Chow B, Zhang K. Use of molecular beacon Probes for real-time PCR detection of *Plasmodium falciparum* and other *Plasmodium* species in peripheral blood specimens. J Clin Microbiol 2006; 44(2): 622-4.
28. Nwakanma DC, Gomez Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E, et al. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. J Infect Dis 2009; 199(11): 1564-74
29. Rantala AM, Taylor SM, Trottman PA, Luntamo M, Mbewe B, Maleta K, et al. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. Malar J 2010; 9(1): 269.
30. Genç A, Eroğlu F, Koltas İS. Detection of *Plasmodium vivax* by nested PCR and real-time PCR. Korean J Parasitol 2010; 48(2): 99-103.
31. Dormond L, Jatton-Ogay K, De Valliere S, Genton B, Bille J, Greub G. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. Clin Microbiol Infect 2011; 17(3): 469-75.
32. Congpuong K, Saejeng A, Sug-aram R, Aruncharus S, Darakapong A, Meshnick SR, et al. Mass Blood Survey for malaria pooling and real-time PCR combined with expert microscopy in North-West Thailand. Malar J 2012; 11(1): 288.
33. Lo E, Nguyen J, Oo W, Hemming-Schroeder E, Zhou G, Yang Z, et al. Examining *Plasmodium falciparum* and *P.vivax* clearance subsequent to antimalarial drug treatment in the Myanmar-China border area based on quantitative real-time polymerase chain reaction. BMC Infect Dis 2016; 16(1): 154.