

Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Pozitif Sıtma Örneklerinin Tanısı ve Tür Ayrımı

Diagnosis and Species Discrimination of Positive Malaria Samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction

Esra Atalay Şahar¹, Muhammet Karakavuk¹, Hüseyin Can², Şebnem Nergiz³, Kadri Gül³, Aysu Değirmenci Döşkaya¹, Yüksel Gürüz¹, Mert Döşkaya¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

ÖZ

Amaç: Sıtma, yılda ~198 milyon hastada saptanan ve 367-755 bin arası insanın da ölümüne neden olan önemli bir tropikal hastalıktır. Son yıllarda geliştirilen real time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile aynı test içinde *Plasmodium* spp. saptanması ve tür ayrımı kontaminasyon riski en aza indirgenerek hızlı bir şekilde sağlanabilmektedir. Bu çalışmada, 18S rRNA geni hedefleyen real time PZR yöntemi kullanılarak aynı test içinde *Plasmodium* spp. saptanması ve tür ayrımının yapılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Testin uygulanmasında tanısı mikroskopi ile doğrulanmış 15 sıtma pozitif hasta örneği (14 adet *P. vivax*, 1 adet *P. falciparum*) yanında *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ve *P. malaria* 18S rRNA gen bölgesini içeren pozitif plazmit kontroller kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak sıtma negatif 15 insan DNA örneği kullanılmıştır.

Bulgular: Real Time PZR sonuçlarına göre 15 sıtma hastasına ait örnekte *Plasmodium* spp. pozitif bulunmuş ve ayrıca erime eğrisi analizi sonucunda bu örneklerin 14'ünün *P. vivax*, birinin de *P. falciparum* olduğu saptanmıştır. Bunun yanında, real time PZR yöntemi ile deneysel olarak *P. falciparum* ve *P. vivax* sıtması olan hastalara ait birer DNA örneği karşılaştırıldığında *P. falciparum* ve *P. vivax* miks enfeksiyonu başarılı bir şekilde saptanmıştır.

Sonuç: Türkiye'de sıtma tanısı ve tür ayrımı yanında miks enfeksiyonların da saptanmasında mikroskopik yöntemler yanında real time PZR yönteminin de kullanımının yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malaria*, *Plasmodium ovale*, 18S rRNA geni, real time PZR

Geliş Tarihi: 28.01.2016

Kabul Tarihi: 25.07.2016

ABSTRACT

Objective: Malaria is an important tropical disease that is detected in 198 million people and causes 367-755 thousand deaths annually. Recently, the real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique has enabled quick determination of *Plasmodium* spp. and species identification in the same assay with a low contamination risk. In the present study, we aimed to use real-time PCR targeting the 18S rRNA gene to diagnose *Plasmodium* spp. and perform species identification.

Methods: DNA samples of 15 patients with malaria (14 caused by *P. vivax*, 1 caused by *P. falciparum*) confirmed by microscopy as well as positive control plasmids were used. As the negative control, DNA samples of 15 individuals without malaria were used.

Results: According to the results of real-time PCR, samples of 15 patients with malaria were found to be positive for *Plasmodium* spp. Melting curve analysis showed that 14 of them were *P. vivax* and the remaining was *P. falciparum*. In addition, mixed infection with *P. falciparum* and *P. vivax* was successfully detected by real-time PCR when DNA of *P. falciparum*- and *P. vivax*-positive samples was experimentally mixed.

Conclusion: The present study showed that real-time PCR can be useful in the diagnosis and species identification of *Plasmodium* spp. as well as the detection of mixed infections in addition to microscopy in Turkey.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malaria*, *Plasmodium ovale*, 18S rRNA gene, real-time PCR

Received: 28.01.2016

Accepted: 25.07.2016

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Hüseyin Can E.mail: huseyin.can@ege.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2016.4711

©Telif hakkı 2016 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2016 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

GİRİŞ

Sıtma, yıllık olarak 198 milyon insanın enfekte olmasına sebep olmanın yanında 367-755 bin arası insanın da ölümüne neden olan büyük bir tropikal hastalıktır (1). Bu vakaların çok büyük bir kısmı sıtmanın endemik olduğu Afrika, Asya, Merkez ve Güney Amerika'nın tropikal bölgelerinde bulunan 100 ülkede görülmektedir (2, 3). Ayrıca sıtma, endemik bölgelere seyahat eden insanlarda karşılaşılan ateşli hastalıkların en yaygın etkeni olarak kabul edilmektedir. Örnek olarak, seyahatten geri dönen 24920 hasta arasında ateşli olan 6957 hastanın %21'inde sıtma saptanmıştır (4). Ayrıca, ateşli hastalıklar arasındaki ölümlerin %33'ünün sıtma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (5). Bu yüzden, hızlı tanı ve tedavi becerisinin sıtmanın endemik olmadığı bölgelerde de kritik olduğu ileri sürülmüştür.

Plasmodium falciparum, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ve *P. knowlesi* insanları enfekte eden *Plasmodium* türleridir (6-8). Bu türler arasında Türkiye'deki yerli sıtma etkeninin *P. vivax* olduğu, ayrıca yurt dışı kaynaklı *P. falciparum* olgularının da görüldüğü bildirilmiştir (9-11). Türkiye'de sıtma vakalarının büyük bir kısmının da Güneydoğu Anadolu bölgesinde ortaya çıktığı görülmüştür (11). Türkiye'de 2008 yılında başlatılan eliminasyon programı ile 2011 yılında yeni yerli sıtma hastası belirlenmediği bildirilmiştir (12). Bu dönem sonrası 2012 yılı yaz aylarında Mardin ili Savur ilçesinde 219 kişiyi etkileyen *P. vivax* salgını hastalığın yurdumuz için daimi bir tehdit arz ettiği göstermektedir (13).

Sıtma tedavisinde etken *Plasmodium* tür yada türlerinin (miks enfeksiyon) doğru olarak saptanması kritik öneme sahiptir çünkü *P. vivax* ve *P. ovale* karaciğerde uyku halindeki hipnozoitler ile daha sonra reaktivasyon ile hastalık tekrar edebilmektedir. Bu yüzden *P. vivax* ve *P. ovale*'nin özgün tedavisi için hipnozoit evreye mahsus antimalariyal ilaçların kullanılması gerekmektedir (5). Benzer şekilde, sıtmanın şiddetini değiştirebilen *P. falciparum*/*P. vivax* miks enfeksiyonuna da doğru şekilde tanı konması gerektiği bildirilmiştir (14). Miks enfeksiyonlarda, eksik tanı sonucu uygulanan eksik tedaviye bağlı anti sıtma ilaçlara karşı dirençli *Plasmodium* popülasyonlarının ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür (15).

Sıtma tanısı ve tür ayrımında, basit ve düşük maliyetli olması sebebiyle ince yayma ve kalın damla preparatların ışık mikroskopik incelemesi çok sık kullanılmakta fakat bu yöntem ile elde edilen sonuçların objektif olmaması ve doğru tanı için deneyimli personel gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (2, 5). Ayrıca, deneyimli personelin bile düşük parazitemi ile seyreden vakalarda ve miks enfeksiyonlar da hatalı sonuçlar verebildikleri görülmüştür (16).

Sıtma tanısı için bir diğer yöntem de *P. falciparum* ve *P. vivax* enfeksiyonlarına özgü olduğu bildirilmiş hızlı tanı testleridir (17). Bu yöntemin dezavantajı ise tedavi sonrasında, haftalarca kalıcı olabilen atık antijenler ve romatoid faktörler ile çapraz reaksiyonlar vermesi sonucu yanlış pozitifliklere neden olabilmesidir (16, 18).

Mikroskopik ve hızlı tanı testi yöntemlerinin aksine, hızlı tanıyı yüksek duyarlılık ve özgüllükle sağlayabilen ve tekrarlanabilir polimeraz zincir reaksiyonu tekniği 1980 yılından beri sıtma tanısı için uygulanmaktadır (19). Bu yöntem sayesinde sıtma tanısı yanında tür ayrımı, düşük parazitemi gösteren enfeksiyonların ve aynı zamanda sıtma vakalarının %5'inden fazlasında görülen miks enfeksiyonların saptanmasının olası olduğu gösterilmiştir (20, 21). Ayrıca, sıtma tanısında PZR kullanımının plasental sıtma vakalarının yakalanmasını %42'den %97, semptomatik olmayan paraziteminin saptanmasını da %17'den %47'ye artırdığı gösterilmiştir (2).

Bu çalışmada 18S rRNA geni hedefleyen real time PZR yöntemi ile öncelikle *Plasmodium* spp. saptanması ve dört farklı *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ve *P. malaria*) türünün ayrımının aynı test içerisinde yapılması hedeflenmiştir.

YÖNTEMLER

Sıtma Pozitif Örnekler ve DNA İzolasyonu

Bu çalışmada 2005-2006 yılları arasında 14 adet *P. vivax* ve bir *P. falciparum* sıtması tanısı konmuş hastalara ait hızlı tanı testi çubukları (OptiMAL, Flow Inc.; Portland, Oreg., USA) ve Giemsa (Merck, Germany) boyalı ince yayma-kalın damla mikroskop lamaları kullanılmıştır.

Hızlı tanı testi ile pozitif bulunmuş 10 hastanın hızlı test çubuklarının uç kısımları kesilerek 400 µL serum fizyolojik içinde 1 saat boyunca 200 rpm oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Mikroskopi (Olympus, USA) ile pozitif bulunan 5 hastanın lam üzerinde bulunan kan örnekleri 200 µL serum fizyolojik ile lamdan ayrıştırılmıştır. Elde edilen örnekler DNA ekstraksiyonu High Pure Template Preparation kiti (Roche, Germany) ile üretici firmanın protokolü uygulanmıştır (10).

Real time PZR yönteminin *P. falciparum* ve *P. vivax* miks enfeksiyonunu saptayıp saptayamadığını araştırmak için *P. falciparum* ve *P. vivax* sıtması olan hastalara ait birer DNA örneği karıştırılmıştır.

Real time PZR sırasında, negatif kontrol olarak sıtma negatif olduğu mikroskopi ve hızlı tanı testi ile saptanmış 15 insan DNA örneği kullanılmıştır. Çalışma için Ege Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 14.05.2008 tarih ve 2007-5.1/6 karar no'lu onay alınmıştır.

Real Time PZR

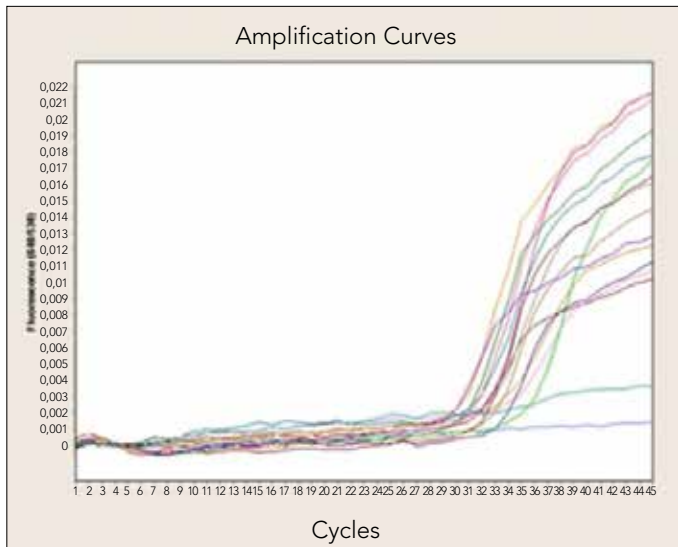
Real time PZR yöntemi tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir (2). Reaksiyon sırasında *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ve *P. malaria* için 18S rRNA geni hedeflenmiştir. Hedef genin çoğaltılmasında PF1 (5'-CATTYGTATTTCAGATGTC-3'; 18 nt) ve PF2 (5'-TTCTTTTA-ACTTTCTCGC-3'; 18 nt) primerleri ve iki farklı prob; PF3 (5'-GATACCGTCGTAATCTTAACCTAACCTAT-3'-FL; 29 nt) ve PF4 (LC RED640 5'- GACTAGGTGTTGGATGAAAGTG-3'-PO; 22 nt) kullanılmıştır. Bu reaksiyon için LightCycler® Fast Start DNA Master HybProbe kiti (Roche, Germany), primer ve prob lar Tablo 1'de ki gibi karıştırılmıştır. Örnekler 1.5 LightCycler Real Time cihazında (Roche Diagnostics, Germany) Tablo 2'de tarif edilen nicelik (=quantification) ve erime eğrisi (=melting curve) analizleri uygulanmıştır.

Tablo 1. Real Time PZR testinde her örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
PF1, Forward Primer (20 µM)	0,5 µL	0,5 µM
PF2, Reverse Primer (20 µM)	1 µL	1 µM
PF3, Prob (20 µM)	0,2 µL	0,2 µM
PF4, Prob (20 µM)	0,4 µL	0,4 µM
10× FastStart mix	2,0 µL	1×
25 mM MgCl ₂	2,4 µL	4 mM
Distile su	8,5 µL	-
Kalıp DNA	5 µL	-
Toplam	20 µL	

Tablo 2. Real Time PZR testinde her bir örnek için kullanılan protokol

Analiz Modu	Döngü sayısı	Basamak	Hedef sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/sn)	Okuma modu
Preinkübasyon						
-	1	-	95 °C	10 dk	20	-
Amplifikasyon						
Quantification	45	Denaturation	95°C	10 sn	20	-
		Annealing	55°C	15 sn	20	Tek
		Extension	72°C	15 sn	20	-
Melting Curve (Erime Eğrisi)						
Melting curve	1	Denaturation	95°C	0 sn	20	-
		Annealing	59°C	20 sn	20	-
			40°C	20 sn	0.2	-
		Extension	85°C	0 sn	0.2	Sürekli
Cooling (Soğutma)						
-	1		40°C	30 sn	20	-

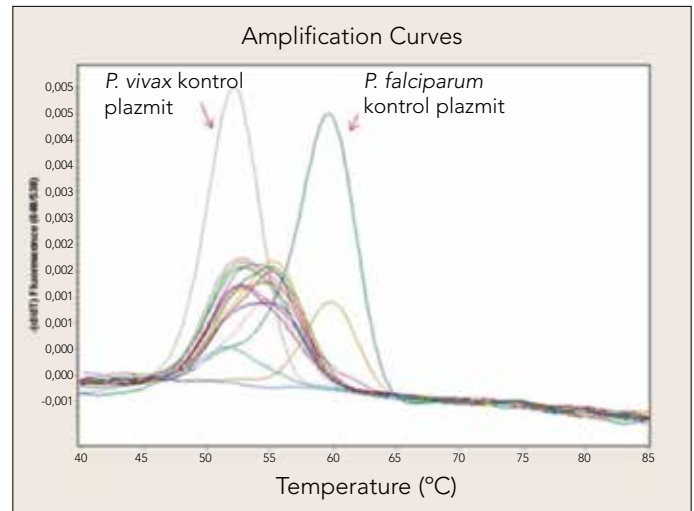
**Şekil 1.** Sıtma pozitif örnekler (n:15) ait real time PZR nicelik (=quantification) analizi sonuçları

Çalışmada pozitif kontrol olarak MR4-ATCC (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center-American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)'den ticari olarak temin edilmiş *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* ve *P. ovale* 18S rRNA geni içeren plazmitler kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır.

Plasmodium spp. tanısı nicelik analizi ile sağlanırken, erime eğrisi analizi ile erime ısı (melting temperature, T_m) değeri kullanılarak *P. falciparum* (T_m : $60 \pm 2^\circ\text{C}$), *P. malariae* (T_m : $57 \pm 1^\circ\text{C}$), *P. vivax* (T_m : $51,8^\circ\text{C}$ - $55,5^\circ\text{C}$ arasında) ve *P. ovale*'nin (T_m : $49,5 \pm 1^\circ\text{C}$) tür ayrımı yapılmıştır (2).

BULGULAR

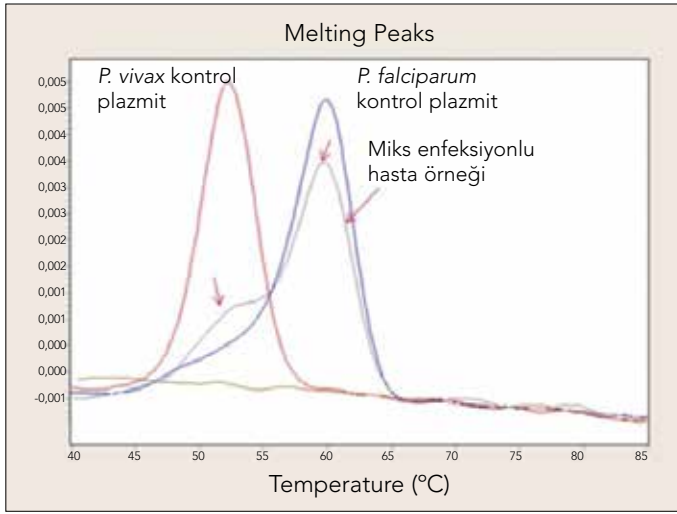
Sıtma hastalarına ait 15 örneğe real time PZR yöntemi uygulanması sonrası elde edilen nicelik analizi sonuçları her örnekte *Plas-*

**Şekil 2.** Sıtma pozitif örneklerin (n:15) real time PZR ile elde edilen erime ısı (=melting curve) analizi sonuçları. Elde edilen sonuçlar 14 örneğin *P. vivax* kontrol plazmiti ile uyumlu erime ısısına sahipken bir hastanın *P. falciparum* ile uyumlu erime ısısına sahip olduğunu göstermiştir. Ok ile gösterilen erime eğrileri pozitif plazmit kontrollere aittir

modium spp. varlığını göstermiştir (Şekil 1). Erime eğrisi analizi sonucuna göre ise 14 örneğin erime eğrileri *P. vivax* plazmit kontrolü ile uyumlu bulunmuştur. Mikroskopik olarak *P. falciparum* saptanan örneğin erime eğrisinin ise *P. falciparum* plazmit kontrolü ile uyumlu olduğu saptanmıştır (Şekil 2).

Sonuç olarak 15 sıtma pozitif örneğin 14'ünün *P. vivax* geriyeye kalan bir örneğinde *P. falciparum* olduğu real time PZR yöntemi ile saptanmıştır. Bu sonuçlar real time PZR yönteminin mikroskobisi ile %100 oranında uyumlu olduğunu göstermektedir.

P. falciparum ve *P. vivax* sıtması bulunan hastalara ait DNA örneklerinin karıştırılması sonrası elde edilen örneğin erime eğrisi analizinde *P. falciparum* ve *P. vivax* miks enfeksiyonunun pozitif



Şekil 3. *P. falciparum* ve *P. vivax* sıtması bulunan hastalara ait DNA örneklerinin karıştırılması sonrası elde edilen örneğin erime eğrisi analizinde *P. falciparum* ve *P. vivax* miks enfeksiyonunun gösterilmesi. Sol ok *P. vivax* pozitif plazmit kontrol ile uyumlu erime eğrisini gösterirken sağ üst ok *P. falciparum* plazmit pozitif kontrolü ile uyumlu erime eğrisini işaret etmektedir

plazmit kontroller sayesinde aynı test içinde ayırt edilebildiği görülmüştür (Şekil 3). Hasta örneklerine yapılan erime eğrisi analizinde *P. ovale* ve *P. malaria* erime ısı değerleri ile uyumlu bir sonuç saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Sıtma, endemik bölgelerde insanlığın en önemli sorunlarından biri olması yanında endemik bölgelere seyahat eden kişilerde de seyahat sonrası görülmesi sebebiyle endemik olmayan bölgelerde ciddi bir halk sağlığı problemidir. Bu yüzden, hızlı tanı ve tedavi sıtmanın endemik olmadığı bölgeler için de önemli olmaktadır.

Sıtma tanısı ve tür ayrımında mikroskopik yöntemlerin bir takım zaafları olduğu bildirilmiştir (16). Bu sebeple mikroskopik yöntemler dışında sıtma tanısında daha duyarlı ve özgül olduğu birçok çalışmada gösterilmiş real time PZR yöntemi bu çalışmada kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen mikroskop tanılı 15 sıtma pozitif örnek real time PZR ile pozitif bulunmuştur. Real time PZR ile yapılan erime eğrisi analizi sonucunda bu örneklerin 14'ünün *P. vivax*, bir örneğin de *P. falciparum* olduğu saptanmıştır (Şekil 2). Elde edilen sonuçlar mikroskopi ile karşılaştırıldığında tanıda ve tür ayrımında %100 uyum görülmüştür. Ayrıca *P. falciparum* ve *P. vivax* miks enfeksiyonunun pozitif plazmit kontroller sayesinde aynı test içinde ayırt edilebildiği görülmüştür (Şekil 3).

Real time PZR yöntemi sıtma tanısı ve tür ayrımı için sıklıkla kullanılmıştır. Mikroskopi ve real time PZR yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada, real time PZR ile *P. falciparum* için aquaglyceroporin (AQP) geni, *P. vivax* için enoyl-acyl carrier protein reductase (ECPR) geni, *P. ovale* için P25 ookinete surface protein (Pos25) geni ve *P. malaria* için circumsporozoite (CS) geni hedeflenmiştir. Çalışmada, 55 hastanın 53'ü hem mikroskopi hem de real time PZR ile pozitif saptanmıştır. Bir hastada da real time PZR ile miks enfeksiyon görülmüştür. Aynı çalışma da 79 asemptomatik hastanın 7'si mikroskopi ve real time PZR ile

pozitif saptanırken, real time PZR ile toplamda 16 hasta pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin tür ayrımı sonuçlarına bakıldığında ise real time PZR sonuçlarının mikroskopi ile uyumlu olduğu görülmüştür (22).

Bir diğer çalışmada, 158 hasta (76 pozitif, 82 negatif) 18S rRNA geni hedefleyen real time PZR ile analiz edilmiş ve 76 pozitif örneğin 74'ü (%97,4) pozitif, 82 negatif örneğin de tümü negatif olarak bulunmuştur. Real time PZR ile pozitif örnekler arasında üç örneğin miks enfeksiyon olduğu saptanmıştır (3).

18S rRNA gen bölgesini hedefleyen real time PZR yönteminin kullanıldığı bir başka çalışmada, mikroskopi ile sıtma pozitif ve negatif olduğu bilinen 297 hasta örneğinin (292 pozitif, 5 negatif) 282'sinde (%95) real time PZR yöntemi mikroskopi ile paralellik göstermiştir. Kullanılan real time PZR yönteminin klinik örnekler için duyarlılığının %97, özgüllüğünün %100 olduğu bulunmuştur (2).

Sıtma tanısında altın standart olarak kabul edilen mikroskopi yönteminin duyarlılığının 100-200 parazit/µL olduğu belirtilmiştir (19, 22). Real time PZR yönteminin yapıldığı çalışmalar incelendiğinde, real time PZR yönteminin duyarlılığının 0,2 parazit genomu/reaksiyon seviyesinde olduğu ve mikroskopiye göre çok daha duyarlı olduğu görülmektedir (3, 9).

Türkiye'de sıtma epidemiyolojisi ile ilişkili yapılmış çalışmalarda daha çok mikroskopik yöntemlerin tercih edildiği gözlenmiştir. 2013 yılında Ordu'da yapılmış bir çalışmada, 31575 kan örneğinin 6'sı (%0,02) mikroskopik yöntemler kullanılarak pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin 3'ünün *P. vivax*, diğer 3 pozitif örneğin de yurt dışı kaynaklı *P. falciparum* olduğu saptanmıştır (23). 2012 yılında Antalya'da yapılan başka çalışmada, 131987 kan örneğinin 66'sı (%0,0005) mikroskopik yöntemler ile pozitif bulunmuştur. 66 pozitif örneğin sıtma etkeninin 57 örnek için *P. vivax*, geriye kalan 9 örnek içinde *P. falciparum* olduğu saptanmıştır (24). Bitlis ilinde toplanan kan örnekleri üzerinde yapılan çalışmada, 86951 örneğin mikroskopik bakı sonrasında 659'u (%0,75) pozitif olarak bulunmuştur. Tüm pozitif örneklerin sıtma etkeninin *P. vivax* olduğu belirtilmiştir (25). Mersin'de, 303573 kan örneğinin 73'ünün mikroskopi ile pozitif olduğu tespit edilmiştir. 73 pozitif örnek arasında, 67 örneğin *P. vivax*, geriye kalan 6 örneğinde *P. falciparum* olduğu saptanmıştır (26). Bursa'da yapılan bir çalışmada, 29683 örnek toplanmış ve mikroskopi ile incelenmiştir. Bu örnekler arasında 21'i (%0,07) pozitif olarak saptanmış ve pozitif örneklerin 11'inin *P. vivax* geriye kalan 10'unun da *P. falciparum* olduğu belirlenmiştir (27). Manisa'da, 86955 örneğin mikroskopi ile 6'sı (%0,007) pozitif olarak saptanmış olup bu örnekler arasında sıtma etkeninin 4'ü için *P. falciparum* geriye kalan 2'si içinde *P. vivax* olduğu bulunmuştur (28). Sıtmanın endemik olduğu Çukurova'da yapılan bir çalışmada, 92 sıtma şüpheli hastadan toplanmış kan örnekleri Giemsa boyama, nested PZR ve real time PZR ile analiz edilmiş ve sırasıyla, %47,8, %56,5 ve %60,9 oranlarında *P. vivax* saptanmıştır. Aynı çalışmada, mikroskopik incelemeye göre real time PZR ve nested PZR testlerinin özgüllük ve hassasiyetleri sırasıyla, %75 ve %100 ve %81,2 ve %97,7 olarak bulunmuştur (29).

Sıtma çalışmaları arasında Türkiye'de saptanmış miks enfeksiyon vakalarına bakıldığında, ilk ve tek yerli miks enfeksiyon (*P. vivax*

ve *P. falciparum*) vakasının Ok ve ark. (30) tarafından 1996 yılında saptandığı bildirilmiştir.

SONUÇ

Sonuçta ülkemizde sıtma halen önemli bir sağlık sorunudur ve gerekli önlemlere rağmen yakın zamanda Savur'da gerçekleşen epidemiyi sıtma tanısının ve tedavisinin hızlı yapılması gerektiğini göstermektedir. Bunun yanında küreselleşen dünyada seyahatler giderek artmakta ve importe vakalar ve mikس enfeksiyonlarda paralel olarak artış göstermektedir. Yurdumuz insanları sıtmaya karşı doğal dirençli olmadığından özellikle *P. falciparum* enfeksiyonları şiddetli geçmekte ve tanının yetersiz veya geç olduğu durumlarda ölümle sonuçlanmaktadır. Özellikle düşük parazitemi durumunda real time PZR tekniğinin mikroskopiyeye göre yüksek duyarlılığı, hızı ve tür ayırımı aynı test içinde gerçekleştirmesi ile önemli bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sebeplerle yurdumuzda sıtma tanısı ve tür ayırımı için mikroskopik yöntemlere ek olarak özellikle referans merkezlerinin real time PZR gibi moleküler testleri kullanmasının hızlı tanı ve tedavi yönünden yararlı olacağı ve bu testlerin kullanımı sayesinde düşük parazitemi vakalar yanında mikس enfeksiyonların da saptanmasının artırılacağı düşünülmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar no: 2007-5.1/6).

Hasta Onamı: Çalışmanın retrospektif tasarımından dolayı hasta onamı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.A.Ş., M.D.; Tasarım - E.A.Ş., H.C., M.D. Y.G.; Denetleme - M.D., A.D.D., Y.G., Ş.N., K.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - E.A.Ş., Ş.N., K.G., M.D., M.K.; Analiz ve/veya Yorum - E.A.Ş., M.D., H.C.; Literatür Taraması - E.A.Ş., H.C., M.K., A.D.D., M.D.; Yazıyı Yazan - E.A.Ş., H.C., M.D., M.K.; Eleştirel İnceleme - E.A.Ş., Y.G., M.K., H.C., A.D.D., M.D. T

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadığını belirtmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from Ege University School of Medicine, Research Ethics Committee (Permit number: 2007-5.1/6).

Informed Consent: Written informed consent was not obtained due to the retrospective nature of the study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.A.Ş., M.D.; Design - E.A.Ş., H.C., M.D. Y.G.; Supervision - M.D., A.D.D., Y.G., Ş.N., K.G.; Funding - M.D., Y.G., Ş.N., K.G. Materials - M.D., Ş.N., K.G.; Data Collection and/or Processing - E.A.Ş., Ş.N., K.G., M.D. M.K.; Analysis and/or Interpretation - E.A.Ş., M.D., H.C.; Literature Review - E.A.Ş., H.C., M.K., A.D.D., M.D.; Writing - E.A.Ş., H.C., M.D. M.K.; Critical Review - E.A.Ş., Y.G., M.K., H.C., A.D.D., M.D.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. World Malaria Report 2014; http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/160458/1/WHO_HTM_GMP_2015.2_eng.pdf?ua=1
2. Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Kru-dsood S, Leowattana W, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 850-4.
3. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, et al. Real-time PCR for detection and identification of Plasmodium spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2435-40. [CrossRef]
4. Wilson ME, Weld LH, Boggild A, Keystone JS, Kain KC, von Sonnenburg F, et al. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1560-8. [CrossRef]
5. Lefterova MI, Budvytiene I, Sandlund J, Färner A, Banaei N. Simple Real-Time PCR and Amplicon Sequencing Method for Identification of Plasmodium Species in Human Whole Blood. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2251-7. [CrossRef]
6. Dakić Z, Ivović V, Pavlović M, Lavadinović L, Marković M, Djurković-Djaković O. Clinical significance of molecular methods in the diagnosis of imported malaria in returning travelers in Serbia. *Int J Infect Dis* 2014; 29: 24-30. [CrossRef]
7. Ersan G, Ülker T, Akkoçlu G, Oğuz F, Köse Ş. Plasmodium falciparum'un Etken Olduğu Yurtdışı Kaynaklı Bir Sıtma Olgusu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18 (Suppl-A): 239-40.
8. İnanç T, Kuk S, Yazar S. Çorum'da 2006-2011 Yılları Arasında Sıtma Epidemiyolojisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18 (Suppl-A): 97-9.
9. Değirmenci A, Döşkaya M, Caner A, Nergis S, Gül K, Aydınok Y, et al. Action plan to regain unnecessary deferred blood donors due to malaria risk in Turkey. *Transfus Apher Sci* 2012; 46: 269-75. [CrossRef]
10. Döşkaya AD, Döşkaya M, Caner A, Gül K, Nergiz Ş, Can H, et al. Preliminary analysis of Plasmodium vivax genotypes isolated in southeastern Turkey. *Acta Parasitol* 2015; 60: 244-7. [CrossRef]
11. Tamer GS, Yılmaz M, Akçer B. Evaluation of Malaria Cases that Were Detected in Kocaeli Province During 2008 Through 2013. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2015; 39: 1-4. [CrossRef]
12. World Malaria Report 2012 http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_country_profiles.pdf
13. World Malaria Report 2013; http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_no_profiles.pdf?ua=1
14. Mohapatra MK, Dash LK, Barih PK, Karua PC. Profile of mixed species (Plasmodium vivax and falciparum) malaria in adults. *J Assoc Physicians India* 2012; 60: 20-4.
15. Tajebe A, Magoma G, Aemero M, Kimani F. Detection of mixed infection level of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax by SYBR Green I-based real-time PCR in North Gondar, north-west Ethiopia. *Malar J* 2014; 13: 411. [CrossRef]
16. Lau YL, Lai MY, Anthony CN, Chang PY, Palaeya V, Fong MY, et al. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of five human Plasmodium species. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 92: 28-33. [CrossRef]
17. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of Plasmodium species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 975-80. [CrossRef]
18. Bourgeois N, Boutet A, Bousquet PJ, Basset D, Douard-Enault C, Charachon S, et al. Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in Plasmodium sp. infection. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1305-11. [CrossRef]
19. Chua KH, Lim SC, Ng CC, Lee PC, Lim YA, Lau TP, et al. Development of High Resolution Melting Analysis for the Diagnosis of Human Malaria. *Sci Rep* 2015; 28: 1567. [CrossRef]

20. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed Plasmodium falciparum and P. vivax infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 609-12. [\[CrossRef\]](#)
21. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 315-20. [\[CrossRef\]](#)
22. Vo TK, Bigot P, Gazin P, Sinou V, De Pina JJ, Huynh DC, et al. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 422-8. [\[CrossRef\]](#)
23. Cetinkol Y, Yıldırım AA. The epidemiology of malaria in Ordu between 2002 and 2011. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2013; 37: 69-72. [\[CrossRef\]](#)
24. Ser Ö, Çetin H. Evaluation of malaria cases in Antalya between 2001 and 2011. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2012; 36: 4-8. [\[CrossRef\]](#)
25. Sahin IH, Zeyrek FY, Aydın MF, Öntürk H, Basank M. Malaria epidemiology in Bitlis from 1998 to 2008. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2012; 36: 1-3. [\[CrossRef\]](#)
26. Aydın MF, Sahin A. Malaria epidemiology in mersin province, Turkey from 2002 to 2011. *Iran J Parasitol* 2013; 8: 296-301.
27. Alver O, Atıcı E, Göral G. The epidemiology of malaria in Bursa-2009-2012. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2014; 38: 81-4. [\[CrossRef\]](#)
28. Aksoy Gökmen A, Pektaş B, Öncel K, Özdemir OA, Çavuş İ, Özbilgin A. The investigation of malaria cases in Manisa between 2008-2012. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2014; 38: 151-4. [\[CrossRef\]](#)
29. Genc A, Eroglu F, Koltas IS. Detection of Plasmodium vivax by nested PCR and real-time PCR. *Korean J Parasitol* 2010; 48: 99-103. [\[CrossRef\]](#)
30. Ok ÜZ, Vurgun N, Limoncu ME, Ceylan H, Kuman A. Türkiye'de son yıllardaki ilk yerli falciparum ve vivax miks sıtma olgusu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1996; 20: 211-6.