

SITMA TANISINDA YENİLİKLER

Ahmet ÖZBİLGİN, Ahmet Taylan TAMAY

Ateşli hastalar, sıtma görülen bölgelerden gelen kişiler klinik belirtileri sıtma için tipik olmasa bile bir damla kan alınarak sıtma yönünden incelenmelidir. Türkiye’de sıtma etkeni olarak *Plasmodium vivax* ve nadiren *Plasmodium falciparum*’a rastlanmaktadır. Sıtma infeksiyonunun kesin tanısı kanda *Plasmodium*’ların görülmesi ile konulmaktadır. Laboratuvar tanısında, kalın ve ince kan yaymanın incelenmesi altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle öncelikle etkensel tanı yöntemleri gözden geçirilmiştir.

A. ETKENSEL TANI

Kan Alma Tekniği

Bakılar için gerekli az miktarda kan, erişkinlerde parmak ucundan, bebeklerde ise topuğun planter kısmından alınır. Hatalı sonuçlar almamak için kan alınacak yerin siyanozlu veya ödemli olmaması gerekmektedir.

İnce Yayma Preparat Yapma Tekniği

1. Temiz bir lamın kenarından bir santim kadar mesafede orta bir noktaya, parmağın delinen yerinde toplanmış kan damlasına temas ettirmek suretiyle ufak bir damla kan alınır. Lam asla parmağa direkt olarak temas ettirilmemelidir.

2. Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında kan damlası işaret parmağının bulunduğu tarafta olacak şekilde düz bir şekilde tutulur.

3. Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan bir lamel, kan damlasının ön kısmına (baş parmağa doğru olan kısmına) işaret parmağına bakan 45°’lik bir açı yapacak şekilde temas ettirilir. Bu iş için lamel yerine lam da kullanılması mümkündür.

4. Kanın lamelin iki köşesine yayılması için kısa bir süre beklenir ve açı muhafaza edilmek şartıyla sol tarafa doğru sürülür.

5. Lamelin peşinden sürüklenen kan içindeki hücreler bozulmadan ince bir tabaka halinde yayılır ve preparatlar havada kurutulur.

Kalın Damla Kan Preparatı Yapma Tekniği

Bir kalın damla kan preparatı 5-6 yayma preparatın kapsadığı miktarı bir saha içine aldığı için, kanda parazit az da bulunsa görülme ihtimalini arttırmaktadır.

1. Temiz olduğu bilinen bir lama lanset ile delinmiş parmak ucunda toplanmış kan damlasına temas ettirerek ve aralarında yaklaşık 1 cm ara olmak şartıyla, 2-3 damla kan alınabilir.

2. Bir toplu iğnenin baş tarafı ile alınan damlalar pıhtılaşmadan, dairesel hareketler yapmak suretiyle kana takriben 1 cm çapında yuvarlak şekil verilir. Burada toplu iğnenin rolü, kan elemanları içerisinde özellikle *Plasmodium*’ların bulunduğu eritrositlerde parazitlerin kan plazmasına çıkmalarını sağlamaktır. İğnenin dairesel hareketleriyle eritrositlerin çeperleri kolayca parçalanır ve içlerinde bulunan *Plasmodium*’lar serbest hale geçerler. Toplu iğne yerine başka bir lamın kenarları da günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

3. Preparat havada kurutulur.

İyi yapılmış bir preparatta kalın damlanın arkasına yerleştirilecek bir yazı rahatça oku-

nabilmelidir. Kan yayma preparatları kuruduktan sonra, kan yayılan lamın bir ucuna yakın yerine ve kan üzerinde kurşun kalemle hastanın isim ve protokol numarası yazılabilir. Bu şekilde konulan işaretler lam boyandıktan sonra da sabit kalır (1,3,10-15).

KAN YAYMALARININ BOYANMASI

Tanı amaçlı, iyi bir şekilde hazırlanan her kan yayması preparatının en iyi şekilde de boyanması gerekmektedir. Kan yaymalarının hazırlandıktan sonra hemen boyanmaları her zaman en iyi sonucu vermektedir. Bekletilmiş preparatların boyanmasında parazitlerin boya alma özellikleri bozulabilmektedir.

Giemsa Boyama Yöntemi

Solüsyonların Hazırlanması

Önce dereceli silindire 10 ml distile su konur, bunun üzerine her 1 ml distile su için 1 damla oranına göre 10 damla Giemsa ana boyası ilave edilir. Dereceli silindir dairesel hareketler yapılarak hafifçe karıştırılır. Özel yapılmış karıştırıcı kullanılabilir. Bu hazırlanan Giemsa solüsyonu ince yayma kan preparatları için 30 dakika, kalın damla preparatlar için ise 45 dakika süreyle uygulanır. Boya miktarının iki katına çıkarıldığı durumlarda bekleme süresi yarıya düşürülebilir.

İnce Yayma Kan Preparatının Giemsa Boyasıyla Boyanması

Usulüne göre hazırlanmış ince yayma kan preparatının Giemsa ile boyanması esnasında aşağıdaki işlemleri sırayla uygulamak gerekir:

1. Kurumuş preparat metil alkol ile 2-3 dakika tespit edilir. El ile veya pensle preparatın bir ucundan tutularak metil alkolü döküp preparatın kuruması beklenebilir. Tesbit (fiksasyon) paraziti morfolojik özellikleri sabit kalacak şekilde öldürmek demektir.
2. Hazırlanan Giemsa boya solüsyonu köprü üzerine konmuş ve daha önceden metil alkol ile tesbit edilmiş olan preparatı tamamen kaplayacak şekilde dökülür ve mümkün olduğunca solüsyonun taşmamasına dikkat edilir. Boyama süresi yukarıda belirtildiği gibidir.
3. Bu süre sonunda ince yayma preparatının üzerindeki boya lam bir pensle kaldırılarak dökülür, bir kap içerisinde bulunan musluk suyuna birkaç kez daldırılarak veya dik tutulan preparatın üzerine bir balondan musluk suyu dökülerek yıkanabileceği gibi, normal çeşme suyunun altında elin baş ve işaret parmakları arasında dikey olarak tutulup yıkanabilir.
4. İnce yayma kan preparatı bu işlem sonrası havada kurutulur ve kan preparatı mikroskop altında incelenir.

Kalın Damla Kan Preparatlarının Giemsa Boyasıyla Boyanması

1. Preparat havada kurutulduktan sonra, tesbit edilmez. Üzerine Giemsa boya solüsyonu dökülür. 45 dakika beklenir.
2. Boyası dökülür ve içinde distile su bulunan diğer bir kaba konarak yıkanır. Petri kutusu içine konan saf suya pens yardımıyla daldırılıp çıkarılarak da yıkanabilir. Fazla şiddetli yıkanmamalı ve üzerindeki kan tabakası düşmemelidir.
3. Havada kurutulur ve mikroskopta incelenir.

Aynı Lam Üzerindeki İnce Yayma ve Kalın Damla Kan Preparatlarının Birlikte Boyanması

1. Sadece ince yayma kısmı 30 saniye süreyle içine batırarak veya 30° ile 45°'lik açıda bulunacak şekilde üzerine dökerek saf metil alkol ile sabitlenir.
2. Preparatların kuruması için beklenir. Her iki yayma 45 dakika süreyle Giemsa ile boyanır.

3. İnce yayma kısmı pH=7 tamponlu suya sokularak çalkalanır. Kalın damla bölümü ise ince yayma bölümünün tamponlu suyla teması önlenerek 3 ila 5 dakika süreyle tamponlu suda tutulur.

4. Lamlar ince yayma bölümü aşağıda olacak şekilde dik pozisyonda kurumaya bırakılırlar.

Sıtmanın laboratuvar tanısında en sık kullanılan Giemsa boyama yönteminin yanında Field, May-Grünwald, Leishman, Wright ve Delafield'in hematoksilen boyama yöntemi de kullanılmaktadır.

Kan Yaymalarının İncelenmesi

Kalın damla preparatlarını değerlendirirken parazitlerin tanısında deneyimli araştırmacıların yorumu gerekmektedir. Buna karşılık, kalın damla yöntemi infeksiyonların daha hızlı tanınmasını sağlayacak oldukça zaman kazandırıcı bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

Sıtma tanısında kalın damla yöntemi rutin olarak tavsiye edilmesine rağmen, aynı lam üzerine bir de ince yayma preparat hazırlama gereği duyulmaktadır. Bu durum özellikle *Plasmodium ovale* ve *Plasmodium malariae* gibi tanıda karakteristik yapının önemli olduğu parazit türlerinin tanısında gereklidir. Bu çift preparatlı lamları boyamada en iyi yöntem Giemsa ile boyama yöntemidir. Bu durumda ince yayma preparat metil alkol ile tesbit edilirken, kalın damla preparatın bulunduğu kısma alkol değmemesine özen göstermek gerekmektedir. Kalın damla preparatlar en az 5 dakika süreyle yani immersiyon objektifinde en az 100 mikroskobik alan incelenecek şekilde değerlendirilmelidir (Tablo 1).

Tablo 1. İnce yayma ve kalın damla kan preparatlarının sıtma açısından incelenmesi (6).

Özellikler	İnce yayma preparatlar	Kalın damla preparatlar
Preparat yüzeyi	250-450 mm ²	50-90 mm ²
Kan hacmi	1 µl	3-5 µl
Ortalama kalınlık	0.0025 mm	0.06-0.09 mm
Ortalama kontrasyon farkı	1	20-30
100 mikroskop alanının ortalama hacmi	0.005-0.007 µl	0.1-0.25 µl
İncelemek için gerekli zaman süresi	200-300 alan için 20-25 dakika	100 alan için ortalama 5 dakika
Boyanma sırasında bozulan parazitler ve lökositler	Yok	Lökositlerin % 8'i ve parazitlerin % 20'sine dek
Eritrositler	Tesbit edilmiş halde	Hemolize
Parazit yapıların morfolojik özellikleri	Bozulma yok	Bozulmuş olabilir
Artefaktlar	Sık değil	Oldukça sık

Bazı araştırmacılar ise paraziteminin düşük olduğu durumlarda 100 alanın yeterli olmadığı, en az 200 mikroskop alanının taranması gerektiğini belirtmektedirler. Ancak bu şekilde mikroskobik incelemenin duyarlılığı artmasına rağmen, özellikle saha çalışmalarında inceleme için harcanacak zaman artacaktır. Bununla birlikte bir preparatın sıtma negatif olarak değerlendirilebilmesi için en az 200 alanın taranması gerekmektedir. Şüpheli du-

rumlarda ise hastadan her 4 saatte bir kan alınarak preparatlar hazırlanmalı ve incelenmelidir. *P.falciparum* infeksiyonlarında ise belli periyotlarda kan alınarak incelenmesi tedaviye duyarlılığın anlaşılabilmesi için gerekli olduğu bildirilmektedir. Paraziteminin yoğunluğunun ince yayma kan preparatlarında parazit içeren eritrositlerin 10,000 eritrosit içindeki oranı saptanarak (immersiyon objektifi ile yapılan incelemelerde bir alana ortalama 300-400 eritrosit düşmektedir) veya her mikroskop alanına düşen ortalama parazit sayısını dikkate alarak belirlenmesi önerilmektedir. Bu yoğunluğu gösteren daha kesin bir yöntem ise kalın damla kan preparatlarında saptanan parazit sayısının hastanın kan lökosit değerine oranına göre saptanması olduğu belirtilmektedir. Bu şekilde kanın her μ 'sine düşen parazit sayısı saptanabilmektedir. Bazı araştırmacılar ise bu çıkan sayıyı 1 milyon ile çarparak litreye düşen parazit sayısını esas kabul etmektedirler. Daha kolay bir yöntem olarak şu şekilde değerlendirme yapılabileceği bildirilmektedir:

- + : Kalın damla preparatların her 100 alanı için 1-10 parazit
- ++ : Kalın damla preparatların her 100 alanı için 11-100 parazit
- +++ : Kalın damla preparatların her 1 alanı için 1-10 parazit
- ++++ : Kalın damla preparatların her 1 alanı için 10'un üzerinde parazit.

İncelemeyi yapan deneyimli bir araştırmacı iyi boyanmış bir ince yaymada μ 'de 100 paraziti ve kalın damla preparatlarda ise μ 'de 10-20 paraziti dahi saptayabilmektedir. Ancak burada önemli faktör araştırmacının deneyimidir.

Eğer kişinin sıtmadan öldüğünden şüpheleniliyorsa postmortem olarak yapılması gereken dalak veya beyinden ponksiyon materyeli almaktır. Bu işlem büyük bir aspirasyon iğnesi yardımıyla supraorbital bölgeden girerek beyinden alınan materyelin lama yayılması ve normal olarak boyanması ile yapılmaktadır.

Sıtma tanısında kullanılması gereken mikroskopik büyütme ortalama x1000 büyüklüğünde olmalıdır. Bunun için x10 büyütmeli oküler ve x100 büyütmeli immersiyon objektifleri kullanılmalıdır. Kalın damla kan preparatlarını incelerken sıtma parazitlerini artefakt ve trombositlerden ayırt edebilmek için dikkatli olmak gerekmektedir. Bu ayrımda dikkat edilmesi gerekli özellikler şunlardır:

1. Hemolize olmuş olgunlaşmamış eritrositler (retikulositler) sıklıkla Schüffner granülleri ile karıştırılmaktadır.
2. Trombositlerin morfolojik yapıları *P.vivax*'ı taklit edebilir. İnce yayma preparatlarında da trombositler superimpose olduklarında eritrositlerin dışına çıkmış *P.vivax* merozoitleri gibi boyanabilirler.
3. Tampon çözeltisinde bulunabilecek sporlar, mayalar, polenler veya algler değişik kan parazitlerine benzeyebilirler.
4. Giemsa boyasını kontamine edebilen bakteriler de *Plasmodium*'ların değişik formları ile karışabilmektedir.
5. Anemili hastalarda eritrositlerde görülebilecek Howell-jolly cisimcikleri benzeri nükleik yapılar sıtma parazitleri ile kolaylıkla karışabilmektedir.

Nadir görülmesine rağmen *Babesia* infeksiyonları da kolaylıkla *P.falciparum* ile karışabilmektedir (1,4,5,6,8,13,15).

B. İNDİREKT TANI YÖNTEMLERİ

1. Serolojik Tanı Yöntemleri

Sıtmada kullanılan serolojik yöntemler aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Sıtma antikorlarının ölçülmesinde sıklıkla kullanılan serolojik yöntemler (6).

Yöntem	Kullanım yeri	Antijen kaynağı	Tanıdığı antikor
İmmunopresipitasyon	Epidemiyolojik çalışmalar ve araştırma	Eritrositik şizont ve eriyik antijen	IgG, IgM
IFAT	Epidemiyolojik çalışmalar, araştırmalar, tanyaya destek	Eritrositik şizontlar	IgG, IgM, IgA
IHA	Epidemiyolojik takip	Antijen kaplı eritrositler	IgG
ELISA	Epidemiyolojik çalışmalar, tanyaya destek	Eriyik antijen	IgG, (IgM)
Radioimmunoassay	Araştırma	Eriyik antijen (veya antikorlar)	IgG, IgM
Kültürde merozoitlerin inhibisyonu	Araştırma	Eritrositik şizonttan merozoit	IgG, IgM

2. Moleküler Biyolojik Yöntemler

DNA problemleri veya PCR'a dayalı yöntemlerle parazitlerin tanınmasının ve tespit edilmesinin, teknik açıdan kompleks bir yaklaşım olduğu görülmektedir. Bununla birlikte özellikle parazitlerin immunolojik yarışmalı reaksiyonlardan bağımsız olarak tanınması ve hastanın kliniğinden etkilenmeden, diğer benzer organizmalarla ayırımına da gidilerek tanınmasına olanak vermesi ile sensitivitesi yüksek olan yöntemler olarak bilinmektedir. Pek çok PCR'a dayalı yöntem DNA problemlerinden çok daha hassas olup, *Plasmodium*'ların tanınmasında özellikle *Plasmodium* türünün tanımlanması yapıldıktan sonra, türe spesifik PCR ile insanda infeksiyon yapan *Plasmodium* türlerinin ayırımına gidilmesi yanında, klorokin direncine sebep olan geni tespit edebilmek için moleküler tanı yöntemlerinin uygulanabilmesi de mümkün görülmektedir (2).

3. Hızlı Sıtma Testleri

ParaSight®F test, *P.falciparum*'un kanda bulunan aseksüel kan formları ve gametositler tarafından salgılanan histidinden zengin protein-2'yi (histidine-rich protein-2: HRP-2) tanıtmaya dayalı hızlı bir antijen tespit yöntemidir.

P.falciparum tanısında kullanılan diğer bir hızlı tanı yöntemi olan "AMRAD ICT Malaria" olarak bilinen immunokromatografik tekniğe (ICT) dayanan yöntemde, iki yüzeyi nitroselüloz membranla kaplı küçük bir kart şeklindeki sistemin yüzeyine direkt kan damlatılarak dolaşımda bulunan *P.falciparum*'ları tespit etmek mümkün olabilmektedir.

Diğer hızlı tanı yöntemi olan MAKRO-MAL ise, *P.falciparum* HRP-2'sinin immunolojik olarak yakalanması ile diğer dipstick yöntemlerine benzer metodla bir nitroselüloz membran üzerinde pozitif hastaların kan veya serum örnekleri ile bantlar oluşturulması esasına dayanmaktadır (2,7).

4. Kantitatif "Buff Coat" Kan Parazit Tespit Yöntemi (QBC®)

QBC®, hematokrit pipeti içerisine alınan kanda bulunabilecek *Plasmodium* formlarının santrifüj ile tabakalandırılması ve tüpün içerisinde bulunan akridin oranj boyası ile tüm DNA ve RNA içeren organizmaların boyanması esasına dayanmaktadır. Eritrositlerde nükleus bulunmadığı için, *Plasmodium*'ların DNA ve RNA'sı boyanıp, floresan mikroskopu ile x600 büyütmede incelenerek eritrosit içerisinde görülmektedir. QBC® ile, kalın yaymaya kıyasla 1-2 parazit/µl gibi çok daha az sayıda bulunan parazitleri saptamak mümkün olabileceği gibi, yapılan bazı çalışmalarda parazit yükü 11 parazit/µl altına düştüğünde olguların sadece % 65'inin tespit edilebildiği belirtilmiştir (2,9).

KAYNAKLAR

- 1- Ash LR, Orihel TC: Examination of blood, "Parasites, A Guide to Laboratory Procedures and Identification" kitabında s. 99, ASCP Press, Chicago (1987).
- 2- Budak S, Turgay N: Sitmanın tanısı, "MA Özcel (ed): *Sıtma-Malaria*" kitabında s. 159, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 16, İzmir (1999).
- 3- Field JW, Sandosham AA, Fong YL: *The Microscopical Diagnosis of Human Malaria, Parts I and II*, Institute for Medical Research Federation of Malaysia, Kuala Lumpur (1963).
- 4- Fleck SL, Moody AH: Blood parasites, "C Butterworth (ed): *Diagnostic Techniques in Medical Parasitology*" kitabında s. 53, Cambridge (1993).
- 5- Garcia LS, Bruckner DA: Procedures for detecting blood parasites, "Diagnostic Medical Parasitology, 2. baskı" kitabında s. 584, ASM Press, Washington (1993).
- 6- Giles HM: Diagnostic methods in malaria, "Gilles HM, Warell DA (eds): *Edwards-Arnold Bruce-Chwatt's Essential Malariology*, 3. baskı" kitabında s. 78, Boston (1993).
- 7- Humar A, Ohrt C, Harrington MA, Pillai D, Kain KC: ParaSight F test compared with the PCR and microscopy for the diagnosis of *P.falciparum* malaria in travellers, *Am J Trop Med Hyg* 56:44 (1997).
- 8- Özbilgin A, Yereli K, Balcıoğlu IC, Değerli K: Kan inceleme yöntemleri, "MA Özcel (ed): *Parazit Hastalıklarında Tanı*" kitabında s. 63, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 15, İzmir (1997).
- 9- Rickman LS, Oberst R, Sangalang R, Chulay J: Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites, *Lancet* 1:68 (1989).
- 10- Shute PG, Maryon M: *Laboratory Technique for the Study of Malaria*, JA Churchill, London (1960).
- 11- Smith JW, Melvin DM, Orihel TC: Blood and tissue parasites, "Diagnostic Medical Parasitology" kitabı Vol 1, ASCP Press, Chicago (1976).
- 12- WHO: *Manuel des Techniques de Base pour le Laboratoire Medical*, WHO, Geneva (1982).
- 13- Wilcox A: *Manual for the Microscopical Diagnosis of Malara in Man*, 2. baskı, US Department of Health Education and Welfare, Public Health Services, Washington (1960).
- 14- Yaşarol Ş: *Parazitozlarda Serolojik Teşhis: Medikal Parazitoloji*, 2. baskı, s. 406, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir (1984).
- 15- Yaşarol Ş: *Sıtma Laboratuvar Tekniği: Sıtma Savaşındaki Temel Bilgiler*, s. 17, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir (1986).