

Basıldığında KONTROLSUZ KOPYA niteliğindedir.



# ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

## Sıtmanın Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitolojik Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-06
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

## İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR .....	3
GENEL BİLGİ .....	4
TEKNİK BİLGİLER .....	5
1 Hedef mikroorganizmalar .....	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları .....	5
3 Sıtma tanısında kullanılan teknikler .....	7
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim .....	11
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
6 Referans Laboratuvar .....	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13

## Kapsam ve Amaç

Sıtma, *Plasmodium* türlerinin neden olduğu, tedavisiz olgularda ölümlerle sonuçlanabilen ciddi protozoal bir sistemik enfeksiyondur. Sıtma, günümüzde halen dünya nüfusunun yarısını tehdit etmekte ve her yıl yaklaşık 1 milyon kişinin ölümüne yol açmaktadır. Erken tanı konması ve hemen etkili bir tedavinin başlanabilmesi sıtmada vaka yönetiminin temelini oluşturduğu kadar, hastalık ve ölüm oranının düşürülmesinin de anahtarıdır (1,2).

Klinik bulgular temelinde tanı konulması ve tedavinin buna göre verilmesi bugün kabul edilen bir yaklaşım olmadığından, sıtmada tanı mikrobiyolojik incelemeye dayalıdır (2).

Sıtma ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır ve bir eliminasyon programı yürütülmektedir (3,4). 2000'ler boyunca vaka sayıları çok azaldığı veya hatta bazı yıllarda hiç yerli vaka rastlanmadığı için klinik laboratuvarlara örnek başvurusunun çok azalmış olduğu varsayılabilir. Vaka sayılarının düşmesinde etkili kontrol programlarının rolü olduğu düşünülmektedir, ancak, yakın tarihte dünyada da örnekleri olduğu üzere, değişik faktörlerin etkisi (iklim şartları, vektör direnci vb.) ile hastalığın yeniden sorun olarak gündeme gelme olasılığı ortadan kalkmış değildir. Sıtma, dünyada çok büyük bir nüfusu tehdit eden bir hastalık olarak, ülkemizde de halk sağlığı açısından önemini korumaktadır ve her zaman yeterli bir tanı kapasitesine ihtiyaç vardır.

Hastalığın görülüşünde azalma ile birlikte, ülkemizde sıtma tanısı koyabilen laboratuvar kapasitesinin sayıca azaldığı ve/veya bu alandaki tecrübe ve yetişmiş insan gücü bakımından olumsuz etkilendiği tahmin edilmektedir.

Sağlık Bakanlığı tarafından 2012 yılında ülke genelinde yürütülen kapasite araştırmasına göre incelenen klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının (n=510) dörtte biri sıtma için inceleme yapabildiklerini beyan etmişlerdir. Bunların ise yaklaşık %20'sinde sonucun ince yayma veya kalın damla preparatlardan sadece birine dayalı olarak verildiği anlaşılmaktadır. Bir diğer ifade ile bu laboratuvarların sıtma için *standart vaka tanımına* göre geçersiz ya da yetersiz bir tanı prosedürü kullanarak sonuç verdikleri söylenebilir (5).

Kısacası, sıtma tanısında doğru ve güvenilir sonuç için belli bir laboratuvar kapasitesinin hazırda tutulması ve/veya geliştirilmesi önemli görünmektedir.

Bu UMS'nin amacı, sıtmanın tanısı için standart işlem adımlarını tanımlamak ve klinik mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarlarına doğru ve güvenilir tanıya yardımcı bir Rehber sunmaktır.

## Kısaltmalar ve Tanımlar

<b>buffy-coat</b>	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katman.
<b>EDTA</b>	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>QBC</b>	Quantitative (kantitatif) buffy coat

## Genel Bilgi

Sıtma, tüm dünyada en sık görülen paraziter enfeksiyondur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya nüfusunun yarısı sıtma riski altında olup bu hastalık nedeniyle çoğu Afrika ve Uzak Asya ülkelerinde olmak üzere yılda yaklaşık 1 milyon kişi hayatını kaybetmektedir (1,2,6).

Sıtma ülkemizde tarihi çağlardan bu yana büyük salgınlarla uygarlıkları etkilemiş ve binlerce kişinin ölümüne yol açmış bir hastalıktır. Geçtiğimiz yüzyıl boyunca da sıtma önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmiş ve ciddi bir mücadele yürütülmüştür. Son yıllarda etkili olan kontrol programları sayesinde yerli olgu sayılarının ileri derecede azaltıldığı, tanı konulan sıtma olgularının ise hemen hemen tamamının ya yabancı uyruklu hastalar ya da sıtmanın endemik olduğu ülkelere çalışmaya giden, seyahat eden kişiler olduğu kaydedilmektedir (7).

İnsanlarda sıtmaya *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malaria*, *Plasmodium ovale* ve *Plasmodium falciparum* türleri neden olur. Uzakdoğu ülkelerinde gözlemlendiği üzere, *Plasmodium knowlesi* gibi bazı maymun parazitlerinin de insanlarda enfeksiyon yapabildiği son yıllarda moleküler yöntemlerle gösterilmiştir (8,9). Tüm dünyada ve ülkemizde *P. vivax* en yaygın görülen türdür. Ölümle sonuçlanan olguların büyük çoğunluğu ise *P. falciparum*'a aittir (7,8).

Sıtma *Plasmodium* cinsi tek hücreli parazitlerin neden olduğu kırmızı kan hücrelerinin bir enfeksiyonudur. Parazitler dişi anofel sivrisineğin beslenmek için sokması sonucu insan konakçıya bulaşır.

Sıtma ile enfekte kişilerde, üşüme, titreme, ateş yükselmesi ve terleme döngüsü şeklinde görülen *sıtma nöbetleri* hastalığın karakteristik özelliğidir (7,8,11). Nöbetler *P. vivax*'da 48 saatte bir, *P. falciparum*'da 72 saatte bir görülürse de *falciparum* sıtmasında genelde düzensizdir. *P. vivax* ve *P. ovale* enfeksiyonları çok daha iyi tanımlanan nöbetlerle birlikte. Çok sayıda sıtma atağı geçiren kişilerde klinik çok belirgin değildir; hatta genellikle herhangi bir bulgu ve semptom göstermezler. Sıtma bazen de diğer ateşli hastalıklar ile karıştırılabilir ve ayırıcı tanı önem kazanır (2).

Sıtma şüphesi **acil** bir durumdur ve kesin tanısı hızlı bir şekilde konulmalı, tedavisi en kısa sürede başlatılmalıdır (7). DSÖ, sıtma savaşına başlayabilmek için önce **kesin tanı** konmasını ve sıtma hastalarının bulunmasını önermektedir (2,9). Sıtmanın kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konur. Sıtmanın mikrobiyolojik tanısında tüm dünyada en yaygın kullanılan yöntem, hastanın parmak ucundan alınan kanın lama yayılıp boyanmasıyla hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesidir; "kalın damla ve ince yayma" olarak tanımlanan bu incelemede *Plasmodium*'lar görülerek tanı konulmaktadır (1,10,11).

Sıtma tanısında hastanın periferik kan örneğinin mikroskopik incelemesi günümüzde halen 'altın standart' olarak kabul edilmektedir. Bir diğer ifade ile, boyanmış kan yaymalarının mikroskopik incelemesi ile laboratuvar tanısı, sıtmada vaka yönetimi ve epidemiyolojik çalışmalar için yaygın olarak tercih edilen ya da referans yöntem olmaya devam etmektedir (10,11).

Öte yandan, mikroskopik incelemede tanı duyarlılığı alınan örneğin ve hazırlanan yaymaların kalitesi, boyamanın kalitesi, personelin eğitimi, tecrübesi gibi pek çok faktörden etkilenebilir. Tanı duyarlılığının artırılması büyük ölçüde örneğin doğru alınmasına ve doğru bir şekilde preparat hazırlanmasına bağlıdır (1,10).

*P. knowlesi* ile *P. malaria* mikroskopik incelemede birbirlerinden ayırt edilemez; tanı ancak DNA dizi analizi ile mümkündür. Son yıllarda, özellikle saha çalışmalarında kullanılmak üzere sadece *Plasmodium* türlerini de ayırt edebilen hızlı tanı kitleri geliştirilmiştir. Bunların dışında serolojik testler ve PCR ile de sıtma tanısı konulması mümkündür (7,8,9,11).

## Teknik Bilgiler

### 1 Hedef mikroorganizmalar

*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* ve insanda enfeksiyona yol açan diğer *Plasmodium* türleri

### 2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

#### 2.1. Laboratuvar güvenliği

Kan ve benzeri klinik örnekler ile çalışırken **en ciddi risk** personele kan-kaynaklı patojenlerin (hepatit virüsleri, HIV) bulaşma riskidir. Kan ve serum ile çalışırken daima **eldiven** giyilmelidir.

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Boyanmış olsun veya olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

**Güvenlik uyarısı!** Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

#### 2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

#### 2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

##### İnceleme örnekleri

Örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve ilgili diğer UMS belgelerinden edinilebilir.

Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- Mikroskopik inceleme için periferik kan, EDTA'lı venöz kan, kemik iliği veya kanın 'buffy-coat' kısmı kullanılabilir.
- Sıtma tanısında yaygın olarak tercih edilen örnek parmak ucundan alınan kandan hazırlanan "kalın damla ve ince yayma" preparatlarıdır (periferik kan yaymaları). Mümkünse örnek deneyimli bir kişi tarafından alınmalı ya da hasta gönderilerek laboratuvar tarafından örnek alınması tercih edilmelidir.
- Venöz kan da yayma hazırlanmasında kullanılabilir. Bunun için kan örneği EDTA (0.02g/10mL kan) içeren tüpe alınır ve gönderilir. Venöz kan kullanılacaksa, kan alındıktan sonraki 1 saat içinde preparat yapılmış ve sabitlenmiş olmalıdır.
- Serolojik tanı için antikoagülan içermeyen tüplere alınmış kan örnekleri (~5 mL) tercih edilmelidir. Kan 15-20 dk bekletildikten sonra santrifüj edilir; serum kısmı steril bir tüpe ayrılır ve laboratuvara gönderilir.
- Moleküler teknikler için EDTA'lı tüplerde tam kan/kapiller kan/buffy-coat; biyopsi veya aspirasyon sıvısı örnekleri; boyanmamış preparatlar, filtre kağıdına emdirilmiş tam kan/kapiller kan kullanılabilir.
- Tüm örnekler antiparaziter tedaviye başlamadan önce alınmalıdır.

### Besiyeri / Reaktif

- Giemsa boyası reaktifleri ve donanımı (bkz. UMS, P-TP-06).
- Metanol, saf (%100'lük; aseton içermeyen) – Nem (su) çekmesini önlemek için metanol ağzı sıkıca kapalı bir şişede saklanmalıdır!
- Hızlı tanı testi (immünokromatografik temelde 'dipstick test') – *P.falciparum* veya diğer türler için çeşitli kitler piyasada mevcuttur.
- Floresan boyama için akridin-oranj veya QBC kapiller tüpleri
- ELISA veya IFA kitleri – Serolojik inceleme veya araştırmalar için kullanılabilir; piyasada mevcuttur veya laboratuvarda da hazırlanabilir.

### Diğer gereç, donanım

*Mikroskopik inceleme için;*

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× düşük, 40× yüksek kuru, 100× immersiyon objektifleri ve 10× oküleri olan mikroskop tercih edilir (12).
- Floresan mikroskop – opsiyonel; akridin-oranj boyalı mikroskopi için.  
NOT: Mikroskoplarda okülerler 10× olmalıdır!
- Yaymaları hazırlamak için gerekli gereç, donanım (Lanset, lamlar, vb.)
- Giemsa boyama için gerekli gereç, donanım
- Santrifüj (tercihen soğutmalı) veya hematokrit santrifüjü
- Kesici-delici atık kabı

*Seroloji için;*

- ELISA yıkayıcı, ELISA okuyucu
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları
- Laboratuvar saati

*PCR ve diğer moleküler testler için;*

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb

## 2.4. Kalite kontrol

- Yaymaların düzgün olarak hazırlanması tanının doğru ve güvenilir olması için son derece önemlidir. Bu nedenle yaymalar hazırlanırken azami özen gösterilmelidir.
- Lamların önceden temizlenmiş olması yayma kalitesini etkilemektedir.
- Hazırlanan preparat arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Boyama için kullanılacak Giemsa solüsyonu, her boyama için stok solüsyondan hazırlanmalı ve 1 saat içinde boyama yapılmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu*).
- Kullanılan reaktif/kitlerin (moleküler testler dahil) son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Kontrol örnekleri kullanılarak malzemelerin etkinliği değerlendirilmelidir.
- Boyama sonuçlarının uygunluğundan emin olmak için, saklanmış pozitif örnekler veya referans suşlar teste dahil edilmelidir.
- Bütün solüsyonlar en az haftada bir kontrol edilmeli, bulanıklık ya da kontaminasyon bulgusu olan solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Tüm donanımın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

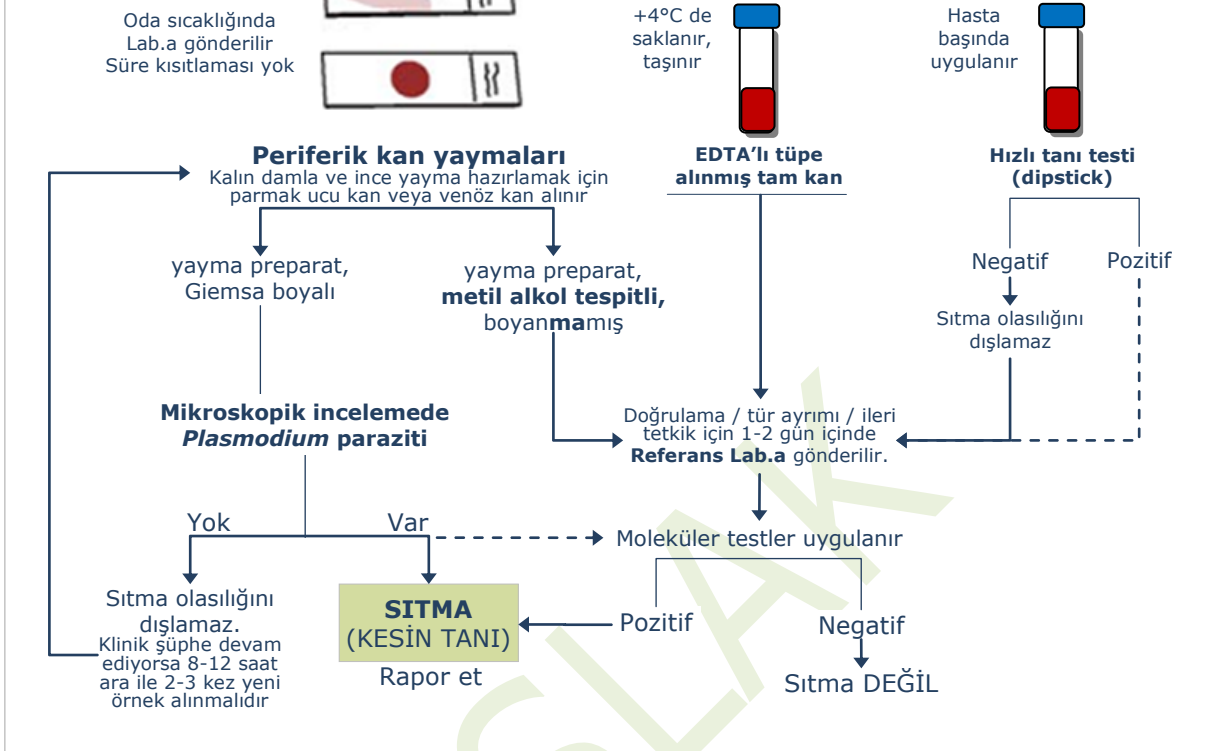
## 3 Sıtma tanısında kullanılan teknikler

### 3.1. Tanı akış şeması

- Sıtmanın tanısında mikroskopik inceleme, hızlı tanı testleri, seroloji ve moleküler yöntemler (PCR) kullanılabilir. En yaygın ve referans tanı yöntemi periferik kan yaymalarının Giemsa boyalı mikroskopisidir.
- Sıtmanın tanısında kullanılacak örnekler ve tanı adımları için bir akış şeması Şekil 1’de özetlenmiştir.

**SITMA ŞÜPHELİ VAKA**

- Ateş, üşüme-titreme, terleme,
- Anemi, splenomegali, trombositopeni
- Endemik bölgede yaşama veya seyahat
- Uygulanan farklı tedavilere rağmen bulguların devamı veya kötüleşmesi



**Şekil 1.** Sıtma şüpheli bir vakanın tanısında kullanılacak yöntemler için akış şeması

### 3.2. Mikroskopi

- En yaygın kullanılan yöntem "kalın damla ve ince yayma" preparatlarının Giemsa ile boyanması ve mikroskopik olarak incelenmesidir; referans yöntem olarak kabul edilmektedir.
- Kalın damla ve ince yayma preparatların hazırlanması ve bunların Giemsa ile boyanması ilgili UMS belgelerinde ayrıntılarıyla ele alınmıştır (bkz. sırasıyla, UMS, P-TP-07 ve P-TP-06).
- Kalın damla incelemesi organizmanın saptanmasında kayda değer miktarda ( $\sim 10 \mu\text{L}$ ) örnek incelemesine imkan veren bir tekniktir ve 'altın standart' olarak tanımlanmaktadır. Kalın damla preparatında, Giemsa ile boyanırken eritrositlerin hipoozmotik lizise uğratılması ile parazitler serbestleştirilmekte; kan hücreleri artıklarından oluşan zeminde boyanmış parazitler ayırt edilmektedir. Bir  $\times 1000$  büyütme alanında, ince yaymaya göre en az 20 kat örneğin değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (13).
- Her ne kadar artık eritrosit içinde konumlanmadığından kalın damlada parazitleri tanımak daha fazla eğitim ve tecrübe gerektiriyor olsa da kalın damlanın duyarlılığı ince yaymadan daha yüksektir.



- Tür tayininde ise ince yayma altın standarttır. Kalın damlada da parazitin türü ayırt edilebilir ancak kalın damladan türün anlaşılamadığı durumlarda ince yaymanın kesinlikle incelenmesi gerekir.
- Kalın damla ve ince yayma en yaygın olarak parmak ucundan alınan (periferik) kan ile hazırlanmaktadır. Kan örneğinin yoğunlaştırılması, böylece parazit yoğunluğunun artırılması ve mikroskopi duyarlılığının yükseltilmesi mümkündür ve bu amaçla konsantrasyon teknikleri geliştirilmiştir (7,8,9,11). Uygulamada aşağıdaki teknikler kullanılabilir:
  - (a) Bir antikoagülanlı (heparinize) tüp içine alınmış kan santrifüj edildiğinde olgun trofozoitler, şizont, gametositler kanın 'buffy-coat' olarak tanımlanan katmanında toplanırlar. Bu katmandan Pastör pipeti yardımıyla alınan örnekten yapılan yaymalar Giemsa ile boyanır ve mikroskopta incelenir. Yöntem özellikle *P. vivax*, *P. malariae* veya *P. ovale* tanısında çok düşük parazitemide yararlıdır ancak *P. falciparum* için yararlı değildir.
  - (b) Yöntem heparinize kapiller tüp içine alınmış kana da uygulanabilir. Ancak kapiller tüpteki 'buffy-coat' katmanından yayma yapabilmek için tüpün o hizadan kırılması ve katmanın lam üzerine aktarılması gerekmektedir. Kesici-delici yaralanması olasılığı yüksek olduğu için (laboratuvar güvenliği gerekçesi ile) daha az tercih edilir.
- Quantitative Buffy Coat (QBC®; Becton Dickinson) yöntemi olarak tanımlanan uygulamada ise, kan örnekleri **akridin-oranj** ve antikoagülan içeren özel bir tüpe alınıp hematokrit santrifüjünde çevrilir. Santrifüj sonrası, tüp özel bir tutucuya yerleştirilerek floresan mikroskopta veya floresan özelliği eklenmiş ışık mikroskobunda incelenir. Sıtma etkenleri tüpteki granülosit tabakasının altında birikir. QBC yönteminin sıtma etkenlerinin saptanmasında duyarlılığının yüksek olduğu belirtilmektedir (7,9,13).
- Periferik kandan hazırlanmış yaymalar da akridin-oranj ile doğrudan boyanarak floresan mikroskopta incelenebilirler (13).

### 3.3. Hızlı tanı testleri

- Sıtma tanısı için kandaki parazit antijenlerinin saptanmasına yönelik immuno-kromatografik temele dayalı çalışan hızlı tanı kitleri de geliştirilmiştir. Piyasada *P. falciparum* ve diğer türler için geliştirilmiş çeşitli kitler mevcuttur (9,13).
- Endemik bölgelerde, özellikle laboratuvar imkanlarının olmadığı saha şartlarında hızlı tanı kitlerinden yararlanılmaktadır.
- Bu kitlerin çoğunda, kan örneğindeki sıtma antijenlerini saptayan monoklonal antikolar kullanılır.
- Histidinden zengin protein II (histidine-rich protein II; HRP-II), parazit laktat dehidrogenaz (pLDH) veya her iki antijeni birden saptayabilen testler mevcuttur.
- Bu testler 15 dk içinde sonuçlanır ve deneyimli personel gerektirmez, ancak duyarlılıkları paraziteminin düşük olduğu enfeksiyonlarda zayıf olduğundan sonuçların bir başka yöntemle doğrulanarak değerlendirilmesi önerilmektedir (Şekil 1) (7,9,13).

### 3.4. Seroloji

- Rutin tanıda tercih edilmemekle birlikte, sıtmanın serolojik yöntemlerle tanısı da mümkündür ve özellikle transfüzyona bağlı sıtma incelemesi ve geriye dönük bilimsel araştırmalarda veya epidemiyolojik saha çalışmalarında yararlanılmaktadır (13).
- Serolojik testlerden IFA ve ELISA en çok tercih edilenlerdir. Bu testlerin pozitif bulunması kişinin enfeksiyonunun eski ya da yeni bir enfeksiyon olup olmadığını ayırt edememektedir (6,8,11).

### 3.5. Moleküler yöntemler (PCR)

- Sıtma tanısında PCR yöntemi son yıllarda yaygın olarak kullanılmakta, PCR ile sadece enfeksiyonun tanısı değil, etken parazitin türünün saptanması da mümkün olmaktadır (6,11,13).
- PCR için, antiparaziter tedavi başlamadan önce EDTA'lı tüpe alınmış venöz kan kullanılır. Filtre kağıdına (Whatman, 3M vb.) damlatılmış parmak ucu veya tam kan örneği de PCR için referans laboratuvara gönderilebilir.  
NOT: Filtre kağıdına EDTA'lı kan alınmaz!
- Boyanmış kan yaymalarının incelenmesinde tür tayini yapılamadığı durumlarda da, PCR yöntemi tercih edilmektedir (Şekil 1).
- Moleküler yöntemlerde hedef, venöz kandan veya filtre kağıdına emdirilmiş kan örneğinden DNA ekstraksiyonu, geleneksel ya da gerçek zamanlı PCR ile sıtma tanısının konulması ve sonraki basamakta *Plasmodium* tür tayininin yapılmasıdır. Çoklu (multipleks) PCR yöntemi ile aynı anda birden fazla *Plasmodium* türünün saptanması mümkündür. PCR yöntemi sadece tanı için değil hastaya uygulanan tedaviye yanıtın izlenmesinde ve direncin saptanmasında değerlidir (7,13).
- PCR yöntemi tür tayininin yanı sıra tedaviye yanıtın izlenmesinde ve direncin saptanmasında değerlidir. Küçük alt-ünite 18S rRNA ve sirkumsporozoit genler *Plasmodium* türlerinin ayırımında en çok kullanılır. Büyük alt-ünite rRNA geni daha çok cinse özgü bölge olarak uygundur.
- PCR son derece duyarlı bir tanı yöntemidir; mikrolitrede sadece 4 parazit olduğunda dahi tanı konulabilmektedir ki bu, %0.0015 parazitemiye karşılık gelmektedir. Donmuş örneklerin 3 yıla kadar çoğaltılıp PCR ile tanımlanması mümkün olabilmektedir (6,).

### 3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Hazırlanan yaymalar havada kurutulup, saf metanol ile tespit edildikten sonra boyalı ya da boyasız olarak oda sıcaklığında bir süre (ör., taşıma süresince, birkaç gün) saklanabilirler veya ileri testler için referans laboratuvara gönderilebilirler (ayrıntılı bilgi için bkz. UMS, P-TP-07).
- Sıtma, ülkemizde neredeyse elimine edildiği için tanıda belirsizlik veya şüphede kalınan her durumun mutlaka Referans laboratuvar tarafından doğrulanması gerekir (iletişim için bkz. "6 Referans Laboratuvar").

- Örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara veya Referans laboratuvara gönderilecekse, *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma düzenlemelerine uygun olmalıdır (14). Buna göre; sabitlenmiş kan yaymaları ve filtre kağıdına emdirilmiş örneklerin "Muaf" şeklinde, tüpte kan ve diğer klinik örneklerin de "Biyolojik madde, Kategori B" şeklinde sınıflanmış olduklarına dikkat edilmeli ve paketlenme şartları bu kategoriler için önerildiği gibi yerine getirilmelidir. Kategorilerin her biri için gerekli açıklamalar "UMS GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi"nde verilmiş olup incelenmesi önerilir.

## 4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

### 4.1. Mikroskopi sonuçları

- Örnek yaymaları aynı gün içinde incelenip raporlanmalıdır.
- Giemsa boyanmış yaymalarda *Plasmodium* spp formlarının saptanması ile **kesin tanı** konur; raporda mümkünse tür adı ve saptanan parazit formları belirtilir. Örneğin;  
"Plasmodium vivax genç trofozoitleri ve gametositleri görüldü".
- Giemsa boyalı yaymaların mikroskopik incelemesinde parazitin görülmemesi **sıtma olasılığını dışlamaz**. Klinik şüphe devam ediyorsa 8-12 saat ara ile 2-3 kez yeni örnek alınıp gönderilmelidir!

### 4.2. Diğer test sonuçları

- Hızlı tanı testi ile pozitif sonuç, tanıyı destekler; ancak doğrulama için diğer inceleme yöntemlerine başvurulması gerektiği raporda belirtilmelidir.
- *Plasmodium* spp'ye ait DNA'nın gösterilmesi "kesin tanı" bulgusudur.  
NOT: "Standart Vaka Tanımı"nda PCR yer almamasına rağmen, hem hızlı, hem de duyarlılığı yüksek bir yöntem olması nedeniyle kesin tanı için uygun bir seçenek olarak kabul edilmektedir.
- *Plasmodium* türleri arasındaki çapraz reaksiyonlar nedeniyle enfekte eden türün ayırt edilmesine izin vermediği için ve antikorların varlığı akut enfeksiyondan ziyade eski enfeksiyonu gösterdiği için seroloji sıtmanın klinik tanısında önerilmemektedir. Transfüzyon sıtmasının araştırılmasında, potansiyel donörlerin hangilerinin transfüzyona bağlı sıtma olgusundan sorumlu olabileceğinin saptanmasında ve epidemiyolojik çalışmalarda toplumda sıtma ile karşılaşma sıklığının belirlenmesinde serolojiden yararlanılır (13)

### 4.3. Bildirim

- Sıtma bildirimi zorunlu bir hastalıktır ve bir salgınla ilişkili olabilir. Tanı konması halinde olguların kayıt ve bildirimi için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (3,4).

## 5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Parazit mikroskopisi tanıda en öncelikle tercih edilen bir teknik olmakla birlikte, parazit formlarını iyi tanıyabilen iyi yetişmiş laboratuvar personeli gerektirmektedir. Ülkemizde vaka sayılarının son yıllarda belirgin azalmış olması laboratuvarları bu alandaki tecrübe ve yetişmiş insan gücü bakımından olumsuz etkilemiştir.
- Sıtmanın mikroskobik tanısında ince yayma preparatların incelenmesi sıtma parazitinin türü ve yaşamsal evresi (genç trofozoit, gametosit vb.) hakkında bilgi verilebilir, ancak sınırlı bir miktar örnekte tarama yapılabilmesi bir dezavantajdır.
- Kalın damla preparatta incelenebilen örnek miktarı ise ince yaymaya göre hayli yüksektir ve parazit yakalama şansı yükselir; ancak kalın damlada da parazitin türü ayırt edilemeyebilir.
- Hızlı tanı kitleri düşük parazitemili olgularda yanlış-negatif sonuç verebilmektedir.
- Sıtma tanısı için seroloji yaygın kullanılmamaktadır. Sonucun pozitif olması yeni enfeksiyonu göstermeyebilir; eski enfeksiyonda da pozitiflik saptanabilir.
- PCR ile tanı için kan örneğinin uygun koşullarda saklanması ve EDTA ile mümkün olduğunca kısa süre beraber tutulması son derece önemlidir. Kontaminasyon riskinin yüksek oluşu nedeniyle 'nested' PCR yöntemi hatalı sonuç verebilir.

## 6 Referans Laboratuvar

### Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,  
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı  
Ulusal Parazitoloji Referans Merkez Laboratuvarı  
**"Ulusal Sıtma Referans Laboratuvarı"**  
Refik Saydam Yerleşkesi,  
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55,  
06100 - Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0 312 565 5571

e-posta: [parazitoloji@thsk.gov.tr](mailto:parazitoloji@thsk.gov.tr)

[www.thsk.gov.tr](http://www.thsk.gov.tr)

### Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden tanı, doğrulama veya moleküler tiplendirmelerin yapılması; surveyans çalışmaları yürütülmesi; bölgesel/yerel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması; kalite kontrol programının yürütülmesi.

## İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Sıtmanın Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, P-ÖY-03	Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
UMS, P-TP-06	Giemsa boyama
UMS, P-TP-07	Kalın damla ve ince yayma
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

## Kaynaklar

- 1 WHO. Malaria microscopy quality assurance manual. Version 1. February 2009.
- 2 WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Global Malaria Programme, Switzerland. WHO/HTM/MAL/2006.1108, 2006.
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.  
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.  
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 6 WHO. New Perspectives Malaria Diagnosis. WHO/CDS/RBM/2000.14
- 7 Özcel MA. Sıtma. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M. *Özcel’in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2007, p. 79-134
- 8 Özbilgin A, Östan İ, Kurt Ö, Balcıoğlu C. Kan İncelemeleri. In: Ok ÜZ, Korkmaz M (eds). *Parazitolojide Laboratuvar*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2011, p. 63-79.
- 9 Ergüven S. A-16 Sıtma. Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Laboratuvar Eğitim Kitabı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. 2008, p. 5-20
- 10 WHO. Basic Malaria Microscopy Part I. Learner’s Guide. Second edition, Switzerland, 2010.  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547826\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547826_eng.pdf) (son erişim tarihi:18.12.2013)
- 11 CDC. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm> (son erişim tarihi:18.12.2013)
- 12 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1 - 4
- 13 Rogers WO. *Plasmodium and Babesia*. In: Versalovic J (ed in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2091-2112
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.