

Sıtmanın Laboratuvar Tanı Yöntemleri

KURŞAT ALTINTAŞ *

En eski mitolojilerin konusu olan sıtmanın tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. Milattan önce Mısır papyruslerinde, Çin, Hint ve Asur yazıtlarında aralıklı gelen ateşten söz edilmektedir.

İsa'dan önce 5. YY'da yaşamış olan Hippocrates, eserinde tekrarlayan ateş ve dalak büyümesini tarif etmiş ve dalak büyümesi olgusu ile bataklik bölgelerde yaşam arasındaki paralelliği vurgulamıştır. Eski Yunanistan ve Roma'da sıtmanın bataklikla olan bu ilişkisine dikkat çekilmiş, etken bilinemediği için hastalığa bataklik gazlarının sebep olduğu düşünülerek kötü hava anlamına gelen malarya (mal-aria)denmiştir.

Peru yerlilerinin bir rastlantı sonucu kına kına ağacı kabuklarının ateşli hastalıklara iyi geldiğini bulmaları ve 1683 yılında Contes Del Chincon'un bu bulguyu yazması, konuyla ilgili bu yönlü araştırmalara hız kazandırmıştır.

17. YY'a kadar gerek batı, gerekse Türk ve İslam bilginlerince hastalıkla ilgili bir takım yaklaşımlar sağlanmışsa da bu konudaki gerçek anlamda gelişmeler 17. YY'dan sonra olmuştur. Bu gelişmeler içinde en önemlileri 1880 yılında C.L.A. Laveran tarafından etkenin bulunması, 1900 yılında hastalığın bulaşmasında anofelesin sorumlu tutulması ve 1924'den sonra sıtmaya karşı bir takım yapay ilaçların bulunması ve II. Dünya Savaşı'ndan sonra Paul Muller tarafından DDT'nin böcekkıran (insecticid) özelliğinin ortaya konmasıdır.

Ancak tarihi bu kadar eski ve salgınları ile bir çok uygarlıkların yıkılmasına neden olmuş bu hastalık, benzeri salgın nedenleri tam olarak denetim altına alınabildiği halde günümüzde hala önemli bir sağlık sorunudur.

Ülkemizde sıtma olgusunun tarihçesi çok eski Anadolu Uygarlıklarına kadar uzanmaktadır. Bu uygarlıkların büyük bir kısmının çöküş nedenleri içinde bu hastalığın rolü bilinmektedir.

Cumhuriyet tarihimizin ilk günlerinde sıtmanın ülke sağlığında önemli bir sorun teşkil ettiği bilinci ile çalışmalara başlanmıştır. Çıkarılan sıtma savaş kanunlarının ışığı altında ilgili hekim ve sağlık persone-

linin üstün vazife anlayışı ve gayretleri ile büyük başarılar elde edilmiş, 1957 yıllanna kadar süren çabalar bu tarihte sorunu eradikasyon aşamasına getirmiştir. Başarı ile sürdürülen eradikasyon programı sonunda 1970'li yıllarda vaka sayısı 1263e kadar düşürülmüştür. Ancak 1975'den sonra sıtma yeniden tırmanışa geçerek iki yıl içinde yüzbini üstünde bir vaka sayısına ulaşmıştır. Bu gün konu ile ilgili ciddi ve bilinçli çalışmalar sürdürülmektedir.

Genellikle sıtmayı kitaplardan ve anlatılan derslerden öğrenen genç hekimimizin konuya dikkatlerinin çekilmesi ve özelliklerle hassas bölgelerde sıtma olgusunu hatırdan tutmaları ve bu yönlü gerekli tanı tıygulamaianını ihmal etmemeleri gereği vurgulanarak bu yazımızda sıtmanın laboratuvar tanı yöntemleri ve parazitin türlere göre alyuvar içi morfolojik görüntülerine yer vermek istedik.

Pek çok hastada, sıtma geçirdiği halde sıtmanın bilinen klinik tablosuna uymayan belirtiler görülebilir. Böyle durumlarda pasif sürveyyans ile sıtma bulma önem kazanır. Bu nedenle hekim ve tüm sağlık personelinin, anamnezinde ateşli ve ateş geçirmiş her şahıstan sıtma tanısı amacı ile kan almaları son derece önemlidir.

LABORATUVAR YÖNTEMLERİ

Sıtmanın kesin tanısı laboratuvar yöntemleri ile olabilmektedir. Uygulama iki şekilde olur.

A- Doğrudan kan muayenesi ile etkenin görülmesi.

B- İmmünolojik yöntemlerle sıtma antikorlarının araştırılması.

A DOĞRUDAN KAN MUAYENESİ İLE ETKENİN GÖRÜLMESİ

Kesin tanı için etkenin görülme olanağı varsa immünolojik yöntemleri uygulamaya gerek yoktur.

Sıtma Tanısı amacı ile kan preparatlarının yapılması:

1. Lam ve Lamellerin hazırlanması:

Bunun için hiç kullanılmamış lam ve lameller tercih

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bilim Dalı Öğretim üyesi

SITMANIN LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ

edilmelidir. Bu cam materyal eşit miktar eter-alkol karışımından geçirilip temiz bir bezle kurulanır. Lam ve lameller kenarlarından tutulup, parmak izi bırakılmamalıdır.

2. Parmaktan Kan Alma: Erişkinlerde sol el yüzük parmağı volar yüzünün en çıkıntılı yerine yakın noktadan, çocuklarda kulak memesi veya topuktan kan alınabilir. Bu amaçla kan alınacak yer eter-alkol ile iyice silinir, kuruması beklenir ve varsa temiz Frenkel iğnesi ile veya sterilize edilmiş bir iğne ile delinir. Çıkan ilk damla kan, pamukla silinerek alınır. İkinci damla 3 mm çapa erişince, kısa kenarlarından sol eîin baş ve işaret parmağı ile tutulan lam, kısa kenardan 2 cm. kadar içeri olmak kaydı ile parmaktaki kan damlasına değdirilir. Diğer elin baş ve işaret parmağı ile tutulan lamel, damlayı 45° lik açı içine alacak şekilde kenarı boyunca lam'a temas ettirilir. Lamel damlaya değecek şekilde aynı açı ile biraz geri alınır, kapiller sızım kan lam ve lamel arasında yayılır. Lamel, lam üzerinde dengeli bir hızla geniş açı yönünde kaydırılırsa uygun bir kalınlıkta kan yayması yapılmış olur. Parmak silinerek tekrar bir damla kan çıkarıldıktan sonra başka bir lam üzerine değdirmek sureti ile aralıklı iki küçük kan damlası alınır. İğne ucu veya lam köşesi ile bu damlalar 5 mm çapında olacak şekilde genişletilir (Şekil 1).

3. Hazırlanan yaymanın tesbiti: Yapılan yayma ve kalın damlalar havada kurutulur. Sıtma asalağının alyuvar içindeki gözlemine yapabilmek için alyuvarlarla birlikte morfolojilerini korumak gerekir. Bu amaçla yaymalar kuruduktan sonra % 96-98'lik metil alkol'e batınarak tesbit edilir. Tesbit süresi 3-5 dakikadır. Kalın damla kan preparatlarında tesbit işlemine gerek yoktur.

Bu iki uygulamanın birbirine göre avantaj ve dezavantajları vardır.

Yayma preparatlarda alyuvarlar da tesbit edildiği için asalağın alyuvarlarda yaptığı değişiklikler (soldurma, büyütme, lekeleme gibi) asalak türünün tanınmasına ışık tutar. Ancak ince bir kan tabakası elde edildiği için parazit sayısı az olup gözden kaçabilir. Kalın damla preparatlarda metil alkol tesbiti yapılmadığı için alyuvarlar sonraki uygulamada erirler. Bu nedenle alyuvar içi gözlem yapılamaz. Ancak yaymaya göre çok kalın bir kan tabakası elde edildiği için her sahada asalağı bulma olanağı fazladır. Biri diğerini destekleyen bu iki yöntemin birlikte uygulanmasında büyük yarar vardır.

4. Boyama işlemi:

u. *Yayma kan preparatlarının Giemsa ile boyanması:*

Boyanacak her preparat için 5 ml. hesap edilerek gerekli hacimi alacak bir mezüre Ph: 7,2 saf su veya fosfat tampon konur. Her ml. hacim saf su için bir damla stok Giemsa solüsyonu yakın mesafeden damlatılır. Boya damlatılmış mezür ağız kısmından tutula-

rak dairevi hareketlerle yere paralel bir düzlemde çevrilerek boyanın homojen karışması sağlanır. Kesinlikle çalkalama veya köpürtme yapılmaz. Bu şekilde hazırlanan boya bir küvet üzerindeki boya köprüsüne düzende yerleştirilmiş boyanacak lamlara 5 ce'lik pipetle köpürtmeden yavaşça aktarılır. Her preparat için 5 cc sulandırılmış boya solüsyonu kullanılmalıdır (Şekil 2). 3045 dakika beklenir. Boya küvete boşaltılır, hafif akan çeşmede su, boyalı yüzeye doğrudan çarpmayacak şekilde preparatlar yıkanır. Eğik olarak havada kurutulur. Ve birdamla özel immersiyon yağı damlatılarak, mikroskopta incelenir. Kalın damla kan preparatlarının Giemsa ile boyanmasında da yayma preparatların boyanmasındaki esaslara ayne uyulur.

b. *May Grünwald boyanması:*

Bu boya içinde metil alkol bulunduğundan tesbit işlemine gerek yoktur. Boya ticarete hazır eriyik veya tablet olarak satılır. Tablet kullanılıyorsa 1 tablet 10 ml. metil alkolde eritilir.

Kurutulmuş ve boya köprüsüne yerleştirilmiş preparat üzerine 20-30 damla bu solüsyondan dökülür. Tesbit için 2-3 dakika beklenir. Ve boya dökülmeden aynı hacimde damıtık su preparat üzerine ilave edilerek bir pipetle emilip bırakılmak suretiyle karıştırılır ve boyama için 10 dakika beklenir. Boya küvete dökülür, preparat çeşme suyunda yıkanır. Eğik olarak havada kurutulur. Bu boya ile kalın damla kan preparatı boyanmaz.

c. *Pappenheim boyanması:*

Havada kurutulmuş ve tesbit edilmiş preparat üzerine 20-30 damla May-Grünwald boyası damlatılır. Tesbit için 2-3 dakika beklenir. Boya dökülür. Preparat yıkanmadan ve kurumadan üzerine önce anlatılan şekilde hazırlanmış Giemsa boya solüsyonu dökülür. 45 dakika bekletilir. Boya dökülür, çeşme suyunda yıkanarak havada kurutulur. Bu boyama yöntemi de yayma preparatları için kullanılır.

d. *Wright boyanması:*

Boya köprüsüne konan preparat üzerine hazır satılan wright boyasından damlatılır. 1-2 dakika bekletilir. Üzerine aynı hacimde damıtık su ilave edilir. 2-3 dakika bekletilir. Sonra çeşmede yıkanır, havada kurutulur mikroskopta incelenir.

Boyalı preparatların mikroskopta değerlendirilmesi:

Bu iş için şaryolu (preparatın tabla üzerinde sağ-sol ve ileri-geri hareketine olanak veren kısım) bir mikroskop daha elverişlidir. Mikroskop aynasının düz tarafı kullanılır. Kondansör tablaya yakın bulundurulmalıdır. İncelemede immersiyon objektifi kullanılır.

Yukarda belirtilen boya yöntemleri metilen mavisi ve eozini bulundurlar. Bu prototipteki boyaların yapılan boyamaya Romanowskyboyama veya Roma-

Tablo 1: *Plasmodium türlerinin çeşitli gelişim evrelerindeki morfolojik özellikleri.*

		Plasmodium vivax	Plasmodium malaraya	Plasmodium falciparum	Plasmodium ovale	
T O R M L A R I	H o c a	yapı	Stoplasma açık mavi. Alyuvann 1/3 büyüklüğünde tek kromatin, kırmızı menekşe renkte.	Stoplasma koyu mavi. Daha geniş halka. Kromatin daha kesif ve irice.	Stoplasma mavi. Alyuvann 1/6'sı küçüklüğünde halkalar ve genellikle çift kromatin.	Stoplasma koyu. Plasmodium vivax'a benzer halka. Kromatin daha irice.
		pigment		Ender olarak ince siyah pigment görülür.		
	S i f i e 3 O	yapı	Amipsi görünüm ve belirgin vakuoi	Stoplasma dar ve uzun şerit görünümünde.	Halkaları kaim görünümlü ve ufak stoplasma çıkıntıları var.	Stoplasma ovalimsi, veya uzamış, vakuoi küçük.
		pigment	İnce, sarı-esmer taneçikler, stoplasma içinde dağınık.	Kaba yapıllı, irili-ufaklı yığınlar halinde.	Az sayıda ince taneçikler.	İri, yeşilimsi kahve rengi, dengeli dağılımda.
O i . 2 /s 3 Q	e e S Q o e O	yapı	Stoplasma uzantısı küntleşerek kaybolmuş. Parazit, alyuvann yarısından fazlasını doldurur. Vakuoi küçülmüştür.	Stoplasmanın şerit formu daha geniş, çekirdek bölünmeğe başlamış.	Stoplasma oval yapıda ve ufak çıkıntılar yok, koyu mavi renkte.	Stoplasma ovalimsi, koyu mavi, nukleus parçalanmış.
		pigment	Daha iri taneli.	Stoplasmada koyu kahve rengi yığınlar.	Serpilmiş pigment taneçikleri.	Koyu kahve renkte.
	c K W 5 O	yapı	Parazit, alyuvannı tamamen doldurmuş. Nukleus 12-24 parçaya ayrılmıştır.	8 merozoit papatya görünümünde.	Stoplasma alyuvann 2/3 ünü doldurmuş, koyulaşmış. Çekirdek 10-18 merozoit.	Stoplasma oval. 8-12 merozoit, düzensiz sıralanmış.
		pigment	Stoplasma içinde 1-2 yığın yapmış.	Pigment ortada, siyah kitle halinde.	Pigment ortada veya yanda, esmer kitle halinde.	Ortada veya yanda, yeşilimsi esmer kitle halinde.
B S e d	a S e g a c	yapı	11-15 mikron. Ovalimsi parlak, stoplasma koyu mavi, nukleus koyu kırmızı, ve ekzantrik yerleşmiş.	7-8 mikron. P. vivax gametositlerinden biraz küçüktür. Çekirdeğin yapısı daha sıkı.	10-12 mikron. Dar ve uzun muz şeklinde. Stoplasma koyu mavi, çekirdek sıkı, ufak, koyu kırmızı.	10-15 mikron. Malaraya gametositlerine benzer.
		pigment	iri pigment taneçikleri.	Kalın ve kaba taneli, esmerimsi.	Nukleus etrafında parlak sarı, kahve rengi.	Yeşilimsi, esmer taneli.
f c , e Q H s	O s t t f i r	yapı	Makrogamete benzer, stoplasma açık mor mavimsidir. Çekirdek açık kırmızı, merkeze yakındır.	Stoplasma açık mavi renkte, nukleus koyu kırmızı, merkeze yakın, gevşek yapıda.	Muz şeklinde dişi gametositten daha kısa ve kalın, stoplasma pembemsi renkte, nukleus gevşek yapıda.	Malaraya gametositine benzer.
		pigment	Pigment, stoplasmaya dağılmış.	Siyah kitleler halinde.	Stoplasmada dağınık.	İnce yeşilimsi, yaygın.

novvsky yöntemleri adı verilir. Böyle boyamalarda Plasmodium asalağının stoplazması türe göre açık maviden koyu maviye kadar değişen renklerde, çekirdek, kırmızı menekşe renginde, gerek Schüffner, gerekse Maurer lekeleri kırmızı renkte görülürler.

Mikroskoptaki şüpheli görüntünün Plasmodium olabilmesi için kromatinle birlikte stoplasmanın da görülebilmesi gerekir. Yayma preparatlarında alyuvar içi gözlem tanıda, kaim damlaya göre daha emin bir yaklaşım sağlar. Özellikle P. vivax'da enfekte alyuvarın diğerlerine göre daha solgun boyanması, biraz daha irileşmesi ve Schüffner lekeleri önemli tanı kriterleridir. Kalın damla yönteminde alyuvarların görülmemesi tanıda, plazmodium kromatininin ve stoplasmasının çok iyi saptanmasını gerektirir. Böyle durumlarda öncelikle ortamda, boyanmış benzeri görüntülerden kromatini ayırmak için şu özelliğe dikkat etmek gerekir: Kromatin kırmızı menekşe renginde ve parlaktır. Kenarları muntazamdır. Mikrometre ilerigeri hareket ettirildikçe kırılmadan dolayı kırmızıdan mora doğru renk değişimi olur. Kromatin tanındıktan sonra çevresine dikkat edildiğinde soluk mavi renkteki stoplazma kesin olarak görülmelidir.

Alyuvara giren Plasmodium, eritrosit içinde bir takım evreler geçirir. Bu evrelerde farklı görüntüler verir. Asalağın biyolojik evrelerine göre aldığı morfolojik şekiller ve alyuvarlarda meydana getirdiği değişiklikler türlere göre de farklıdır. Bu özellikler tablo 1,2 ve 3'de gösterilmektedir.

Bütün bu uygulamalara rağmen doğrudan kan muayenesi ile plasmodiumlar saptanamazsa parazitleri iç organlardan çevre kanına çekebilmek amacı ile provoke etmek gerekebilir. Bunun için 1:1000 adrenalin eriyiğinden deri altına 0.5-1 ml. enjekte edilmeli ve 20 dakika sonra tekrar kan muayenesi ile plasmodiumlar aranmalıdır.

B- İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLERLE SITMA ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI

Kanda plasmodiumların görülmediği olaylarda o şahısta sitmanın bulunmadığı söylenemez. Ateşli hastalıklarda hepato-spieno-megali olgusu saptanan şahıslarda veya sitma sağlığını sonucunda bu sağlığının etkinliğinde kan muayenelerinin yetersiz olduğu belirtilmektedir. Doğal olarak sitma bulaşı durmuş bölgelerdeki süregelen olguların saptanmasında, hastalığın kontrol altına alınmasında, kan transfüzyonu nedeniyle meydana gelebilecek sitma bulaşını önlemede ve endemik bölgelerdeki epidemiyolojik değerlendirmelerde immünojenik yöntemlerle sitma antikörlerinin araştırılması büyük kıymet taşır. Bu amaçla çeşitli serolojik yöntemler uygulanmaktadır.

a. Kompieman Birleşmesi Reaksiyonu:

En eski tanı yöntemlerinden biridir. Antijen; enfekte alyuvarlardan, daha eski bir yöntem olarak da enfekte maymun dalak ekstra tından hazırlanır. Ancak KBR yöntemi süregelen sıtma olgularında doğru sonuç veremeyebilir, iyeven olgularda ise etyolojik tanı yöntemleri daha geçerlidir.

b. Hemaglutinasyon Reaksiyonu:

Yöntemin esası sıtma antikörleri ile duyarlı hale getirilmiş eritrositlerin sıtma antikörleri ile karşılaştıklarında aglutine olmaları esasına dayanır. Bu yöntemle sıtma tanısı yapılabilmekle beraber tür ayırımı bu gün için olanaksızdır. Standart bir antijenin hazırlanmamış olması da ayrı bir sorundur.

c. İmmünodiffüzyon Yöntemi:

Agar jeli içinde sızıyla antijen ve antikor moleküllerinin karşılaştıkları noktalarda presipitasyon vermesi esasına dayanan bu yöntem lamda, tüpte, kapiller pipette, petri tabağında vb. yapılabilir. Antijenik analizler gibi araştırma çalışmalarında çok geçerli bir yöntem olmasına rağmen rutin teşhiste yöntemin duyarlılığına güvenilmez.

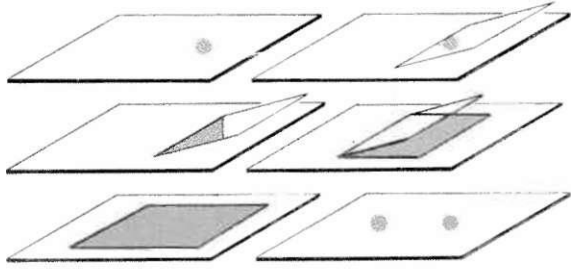
d. İmmüno fluoresans Yöntemi:

Özellikle İFAT (Dolaylı fluoresans antikor testi) serolojik tanıda diğer yöntemlere göre çok kullanılan bir yöntemdir. Fluoreseinle işaretli anti-insan serumu şahısta aranan antikorun varlığında bu antikora bağlanmak suretiyle Fluoresans mikroskopta gözlenebilir bir parlama verir. Bu esasa dayanan yöntem, örneğin sıtmada hangi antikor fraksiyonlarının sıtmaya özel olduğunu belirlemede başarı ile uygulanabilmektedir. Bu yöntemin sıtmada tanı yöntemi olarak uygulanabilmesi bir takım laboratuvar olanaklarını ve büyük titizliği gerektirmektedir.

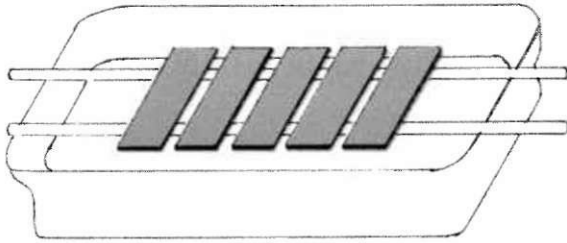
e. Elisa Yöntemi: (Enzyme Linked İmmüno-sorbent Assay)

Yöntemin esası enzimle işaretli anti-immüno-globülinle spesifik antikörlerin araştırılmasıdır. Bu yöntemde genellikle enzim olarak alkalın fosfat kullanılır. Değerlendirmede spektrofotometre kullanılır. Sıtmanın endemik olduğu bölgelerde sıtma olgularının ortaya çıkarılmasında bu yöntem İFAT ve hemaglutinasyon yöntemi kadar duyarlıdır.

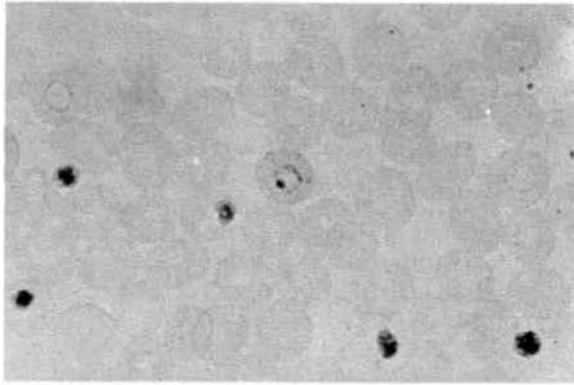
Ancak bütün bu serolojik yöntemlerde antijenin elde edilmesi önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu konuda pek çok olanağa gereksinmemiz vardır.



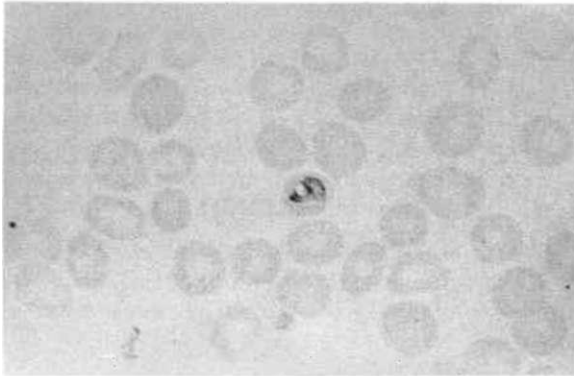
Şekil-1: Yayma ve kalın damia preparasyonunun uygulanması



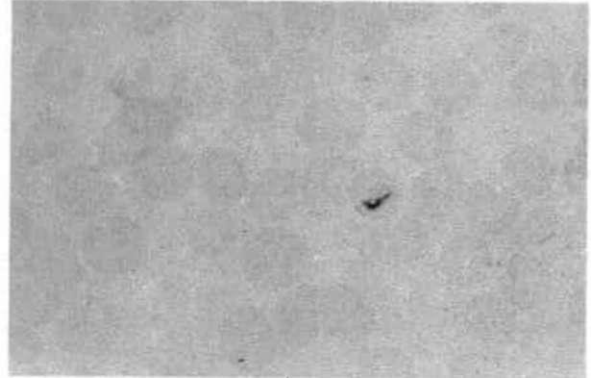
Şekil-2: Hazırlanmış boya köprüsündeki uygulama



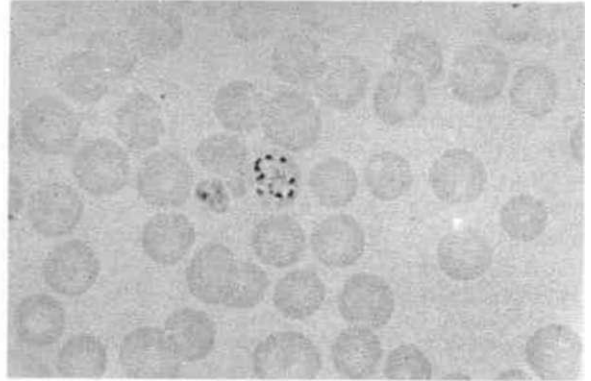
Şekil-3: Plasmodium vivax trofozoit form



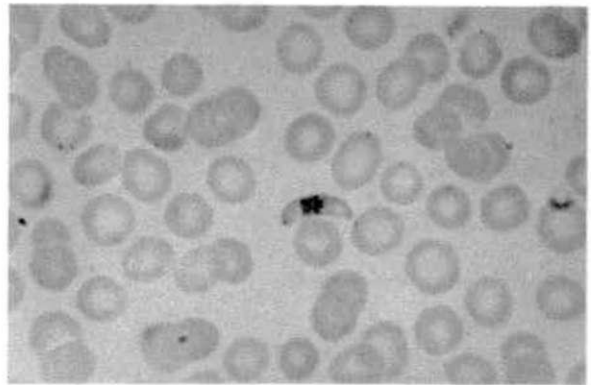
Şekil-4: Plasmodium malariae genç trofozoit



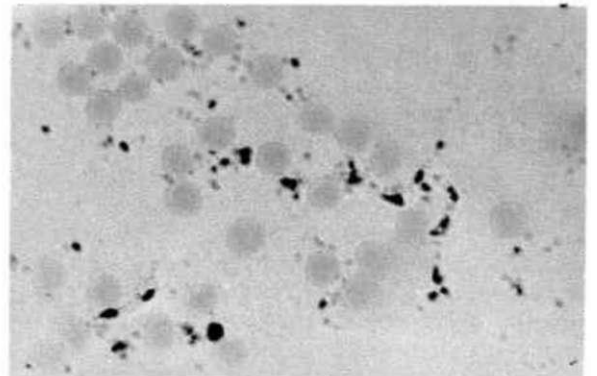
Şekil-5: Plasmodium malariae olgun trofozoit (bant şekli)



Şekil-6: Plasmodium malariae olgun şizont



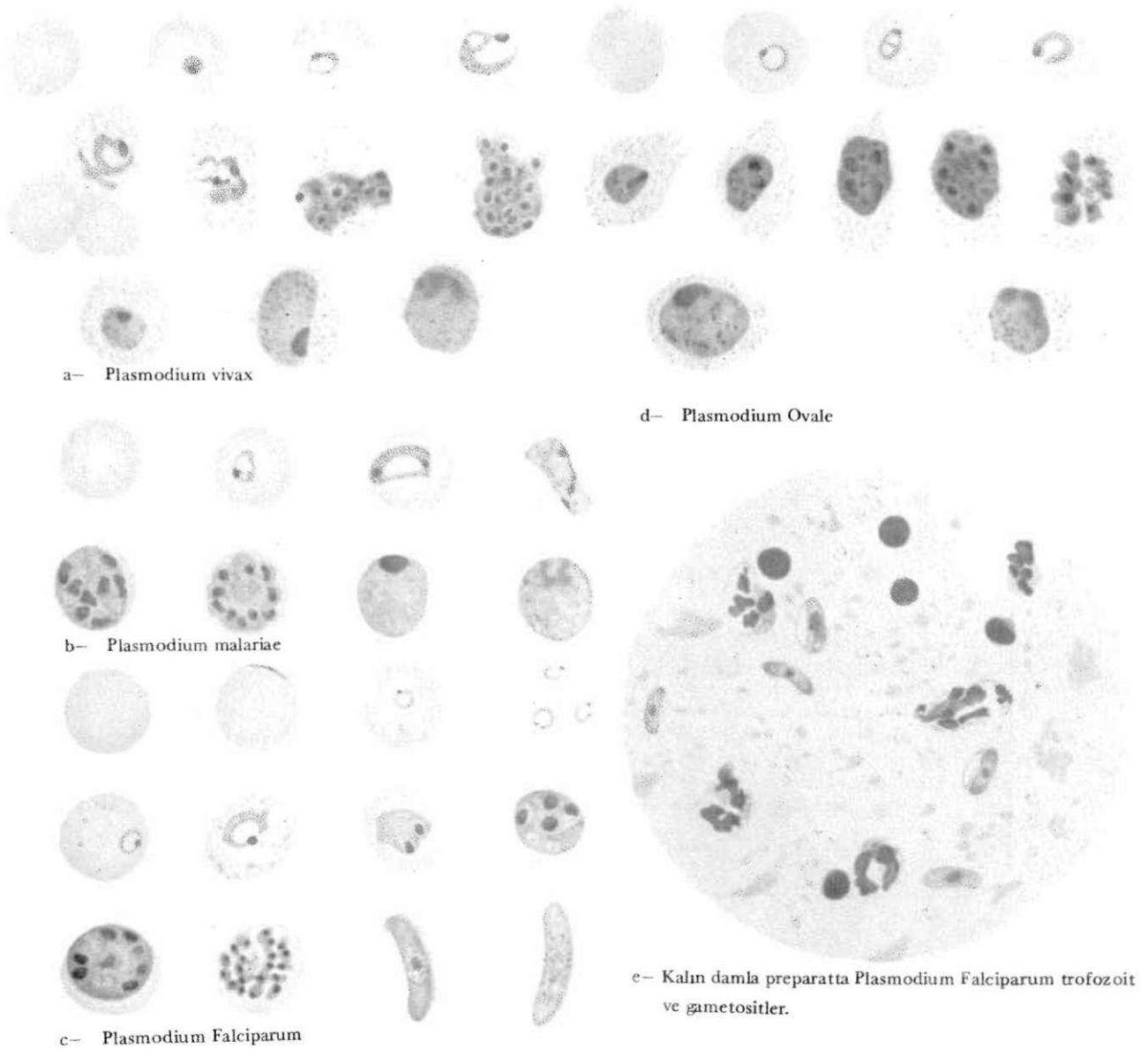
Şekil-7: Plasmodium falciparum gametosit form



Şekil-8: Sivrisinekteki ookinet form

Tablo 2: Parazitli alyuvarlarda asalağın meydana getirdiği değişiklikler

		Plasmodium vivax	Plasmodium malariae	Plasmodium falciparum	Plasmodium ovale
PARAZİTLİ ALYUVARLARDA	Şekil	Alyuvar normalden büyük	Normal veya normalden küçük	Normal veya büzülmüş.	Büyümüş, ovalleşmiş, kenarları düzensiz.
	Renk	Soluk	Normal	Koyu	Soluk
	Lekeler	Trofozoit döneminden gametosit dönemine kadar Schuffner tanecekleri taşır.	Gametositleri bulunduran alyuvarlarda F.A.T. ile Ziemann tanecekleri saptanmıştır.	Olgun trofozoit döneminden şizont dönemine kadar kırmızı iri Maurer tanecekleri.	Gametosit döneminde iri Scuffner tanecekleri.

Tablo 3: Türlerine göre plasmodiumların alyuvar içi gözlemleri.

KAYNAKLAR

1. Belding, D.X.: Textbook of Clinical Parasitology. Appleton Century-Crofts, Inc. 1952. Newyork.
2. Beck, J.W.; Davies, J.JE.: Medical Parasitology. The C.V. Mosby Company Saint Louise. 1976.
3. Merdivenci, A.: Medikal Parazitoloji. Temel Matbaası 1981. İstanbul.
4. Özcel, M.A.; Östan, İ., Çakır, N.: Sıtmanın Laboratuvar Tanısı. (Sıtma Bilim Kitabı) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. 131-115. Ege Üniversitesi Matbaası Bornova-İzmir. 1979.
5. Unat, E.K.: Tıbbi Parazitoloji. İstanbul Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınlan. Celtüt Matbaacılık Koli. Şti. 1979. İstanbul.
6. Unsal, U.; Eren, N.; Benli, D.: Sıtma Epidemiyolojisi. Hacettepe Üniversitesi Toplum Hekimliği Enstitüsü Yayın no. 25. 1982 Ankara.
7. Yaşarol, Ş.; Sermet, İ.; Budak, S.: Sıtma Etkenlerinin Morfo-Fizyolojileri ve Evrimleri-Yeni Türler. (Sıtma Bilim Kitabı) Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. 1:11-35 Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova-İzmir. 1979.