



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BAKIRKÖY DR. SADİ KONUK SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ

SITMA TANILI HASTALARIN ARŞİVLENMİŞ ÖRNEKLERİ KULLANILARAK PCR YÖNTEMİ İLE *Plasmodium falciparum* GENETİK TÜR TAYİNİN YAPILMASI VE DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Kübra Dilan Avcı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2022





T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BAKIRKÖY DR. SADİ KONUK SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ

SITMA TANILI HASTALARIN ARŞİVLENMİŞ ÖRNEKLERİ KULLANILARAK PCR YÖNTEMİ İLE *Plasmodium falciparum* GENETİK TÜR TAYİNİN YAPILMASI VE DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Kübra Dilan Avcı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye Kart Yaşar

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca, donanımlı ve iyi bir hekim olabilmem adına bilgi ve tecrübesi ile daima bana yol gösteren, karşılaştığım pek çok müşkülde beni dinleyen, anlayan, çözüm arayan, her türlü desteği sağlayan, güçlü bir şekilde arkamda olduğunu hissettiren, ahlaki yönüyle de örnek aldığım, öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum, çok değerli hocam *Prof. Dr. Kadriye Kart Yaşar*'a,

Tez sürecinde kendisi ile tanıştığım, tezimin her aşamasında büyük özveriler ile beni destekleyen, bu çalışmanın ortaya çıkmasında yoğun emekler harcayan, karşılaştığım sorunları aşmamda tüm samimiyeti ile yanımda olan kıymetli hocam *Doç. Dr. Mehmet Karakuş*'a,

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden itibaren ilim ve görgüleri ile örnek aldığım, kapılarını çaldığım her vakit tüm güleryüz ve samimiyetleri ile bana yardımcı olan, beni destekleyen ve yönlendiren, saygıdeğer hocalarım *Prof. Dr. Hayat Kumbasar Karaosmanoğlu* ve *Prof. Dr. Özlem Altuntaş Aydın*'a,

Engin tecrübeleri ile uzmanlık yolunda adım adım ilerlememde büyük emekleri olan, deneyimlerinden çok şey kazandığım saygıdeğer hocalarım *Doç. Dr. Habip Gedik, Doç. Dr. Sevtap Şenoğlu* ve *Doç. Dr. Zuhal Yeşilbağ*'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan daima mutluluk duyduğum, kimi zaman yoğun çalışma temposu içinde olsak da pek çok zorluğun üstesinden beraberce geldiğimiz uzman abi ve ablalarıma, tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire, sekreter ve sağlık personelleri de dahil olmak üzere tüm BEAH Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ailesine,

Tez örneklerimin temininde bana yardımcı olan sayın Ali Rıza İlerler ve sayın Arif Gümüş'e,

Nice fedakarlıklar ile bugünlere gelmemde büyük emekler sarfeden, sevgi ve güvenleri ile beni destekleyen, manevi büyük bir güç olarak her daim arkamda olduklarını bildiğim sevgili annem *Ayşe Avcı*, babam *Mehmet Avcı* ve canım kardeşlerim *Yusuf* ve *Yasin*'e,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

Dr. Kübra Dilan Avcı

İstanbul, 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR…… i
KISALTMALAR…… v
TABLO LİSTESİ…… vi
ŞEKİL LİSTESİ…….. vii
ÖZET viii
ABSTRACT x
1- GİRİŞ VE AMAÇ 1
2- GENEL BİLGİLER..... 3
2.1. SITMA TARİHİ……... 3
2.2. EPİDEMİYOLOJİ…… 3
2.3. ETİYOLOJİ…….. 4
2.3.1. *Plasmodium falciparum*……. 4
2.3.2. *Plasmodium vivax ve Plasmodium ovale*……... 4
2.3.3. *Plasmodium malaria*…….. 5
2.3.4. *Plasmodium knowlesi*……. 6
2.4. KLİNİK BELİRTİ VE BULGULAR…… 6
2.5. TANI ve ANTİMALARYAL DİRENÇ TAYİNİ…… 7
2.5.1. Mikroskobi……. 7
2.5.2. Antikor Saptayan Yöntemler……. 7
2.5.3. Antijen Saptayan Yöntemler……. 8
2.5.4. Moleküler Yöntemler…… 8
2.5.4.1. Nested PCR…….. 10
2.5.4.2. Real-Time PCR…… 11
2.6. TEDAVİ…….. 13
2.6.1. Antimalaryal İlaçlar…….. 14

2.6.1.1. Kinolin Deriveleri…… 15
2.6.1.2. Anti-Folatlar…… 16
2.6.1.3. Artemisinin ve Türevleri……. 16
2.6.1.4. Atovakuon-Proguanil…….. 17
2.6.1.5. Antimalaryal Aktiviteye Sahip Antibakteriyaller... 17
2.6.2. Sıtma Etkenine Göre Tedavi Seçimi……. 17
2.6.2.1. *P. falciparum* Sıtmasında Tedavi…… 17
2.6.2.2. *P. ovale,P. vivax, P. malariae, P. Knowlesi* Sıtmasında Tedavi…… 19
2.6.3. Antimalaryal İlaç Direnci…….. 19
2.6.3.1. Anti-Folat İlaç Grubunda Direnç……..... 21
2.6.3.2. Kinolin İlaç Grubunda Direnç…… 22
2.6.3.3. Atovakuon İlaç Grubunda Direnç…….. 23
2.6.3.4. Artemisinin İlaç Grubunda Direnç……. 24
2.7. KEMOPROFİLAKSİ……. 25
3.GEREÇ VE YÖNTEM……... 26
3.1. Etik Kurul izni, Proje Fonu…… 26
3.2. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi…… 26
3.3. DNA İzolasyonu……. 26
3.4. Real-Time PCR…….. 28
3.5. Klasik PCR ve Nested PCR……... 29
3.6. Sekans Analizi……..... 36
3.7. İstatistiksel Analiz…….. 37
4. BULGULAR……. 38
4.1. Örneklerin Dağılımı……... 38
4.2. Mikroskobi Bulguları……. 38
4.3. Real-Time PCR Analiz Bulguları…….. 39
4.4. Nested PCR Analiz Bulguları…… 40
4.5. Klasik PCR Analiz Bulguları……. 45
4.6. Sekans Analiz Bulguları……. 45
4.7. İstatistiksel Veriler…….. 50
5. TARTIŞMA…… 53
6. SONUÇ…….. 62

7. KAYNAKLAR……... 64
8. ÖZGEÇMİŞ…… 71
9. EKLER…… 73

KISALTMALAR

AKT: Artemisinin Kombine Tedavisi

AL: Artemeter-Lumefantrin

Cq: Quantification Cycle

CQ: Klorokin

CT: Threshold Cycyle

DHFR: Dihidrofolat redüktaz

DHPS: Dihidropteroat sentetaz

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

HTT: Hızlı Tanı Testleri

HRP-2: Histidine Rich Protein-2

MGB: Minor Groove Binder

PCR: Polymerase Chain Reaction

***Pf*ATPaz 6:** *P. falciparum* ATPaz 6

***Pf*crt:** *P. falciparum* chloroquine resistance transporter

***Pf*dhfr1:** *P. falciparum* dihidrofolat redüktaz

***Pf*dhps:** *P. falciparum* dihidropteroat sentetaz

***Pf*K13:** *P. falciparum* Kelch 13

***Pf*mdr1:** *P. falciparum* multidrug resistance 1

***Pf*mrp:** *P. falciparum* multidrug resistance protein

SNP: Single nücleotide polymorphism

TAE: Tris-Asetat-EDTA

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Antimalaryal İlaçların Etki Yerleri

Tablo 3.1. *P. falciparum* Tür Spesifik Primerler

Tablo 3.2. Antimalaryal İlaç Direnci İçin Kullanılan Primerler

Tablo 3.3. Nested 1. Aşama PCR (*Pf*mdr1) /Klasik PCR (*Pf*crt, *Pf*K13 Amplifikasyon Reaksiyonu Basamakları

Tablo 4.1. Bölgelere Göre Tek Nükleotid Polimorfizm Sonuçlarının Dağılımı

Tablo 4.2. Bölgelere ve Ülkelere Göre Örnek Sayıları ve Mutasyonların Dağılımı

Tablo 4.3. Bölgelere Göre *Pf*crt ve *Pf*mdr1 SNP haplotipler

Tablo 4.4. *Pf*crt ve *Pf*mdr1 Haplotip Dağılımı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. *Plasmodium falciparum* eritrositer hayat dönemleri

Şekil 2.2. Hızlı antijen testi

Şekil 2.3. PCR siklusunun basamakları

Şekil 2.4. Nested PCR akışı

Şekil 2.5. TaqMan yöntemi

Şekil 2.6. PCR eğrisinin aşamaları

Şekil 2.7. *P. falciparum'*un CQ (klorokin) ve LMF(lumefantrin) yanıtında *Pf*mdr1 ve *Pf*crt mekanizması

Şekil 3.1. Lam üzerindeki örneğin edilde edilmesi

Şekil 4.1. Afrika Kıtası örneklerin dağılımı

Şekil 4.2. Mikroskopi örneği

Şekil 4.3. *P. falciparum* tür spesifik primerler ile belirlenen amplifikasyon eğrileri

Şekil 4.4. *Pf*mdr1(86,184) nested 1.aşama PCR ürününün jel-elektroforez ile görüntülenmesi

Şekil 4.5. *Pf*mdr1(1034,1042) nested 1.aşama PCR ürününün jel-elektroforez ile görüntülenmesi

Şekil 4.6. *Pf*mdr1(1246) nested 1. aşama PCR ürününün jel-elektroforez ile görüntülenmesi

Şekil 4.7. *Pf*mdr1 (86,184), *Pf*mdr1 (1034,1042), *Pf*mdr1 (1246)'de 1.aşama nested PCR ürünleri ile 2.aşama nested PCR denemesi

Şekil 4.8. *Pf*mdr1 (86,184)'in 2.aşama nested PCR jel-elektroforez görüntüsü

Şekil 4.9. *Pf*mdr1 (1034,1042)'in 2.aşama nested PCR jel-elektroforez görüntüsü

Şekil 4.10. *Pf*mdr1 (1246)'in 2.aşama nested PCR jel-elektroforez görüntüsü

Şekil 4.11. *Pf*K13'ün PCR amplifikasyon ürünlerinin jel-elektroforez görüntüsü

Şekil 4.12. *Pf*crt geninin 74,75,76. kodonlarındaki anlamlı mutasyon örnekleri

Şekil 4.13. *Pf*mdr geninin 86. kodonlarındaki anlamlı mutasyon örnekleri

Şekil 4.14. *Pf*mdr1 geninin 102. kodonundaki sessiz mutasyon örnekleri

Şekil 4.15. *Pf*mdr1 geninin 184. kodonundaki anlamlı mutasyon örnekleri

Şekil 4.16. *Pf*mdr1 geninin 1042. kodonundaki anlamlı mutasyon örnekleri

Şekil 4.17. *Pf*K13 geninin 602. kodonundaki anlamlı mutasyon örnekleri

SITMA TANILI HASTALARIN ARŞİVLENMİŞ ÖRNEKLERİ KULLANILARAK PCR YÖNTEMİ İLE *Plasmodium falciparum* GENETİK TÜR TAYİNİN YAPILMASI VE DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda mikroskobik incelemeyle sıtma tanısı almış hastaların arşivlenmiş örneklerinde antimalaryal ilaç direnç genlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza arşivlenmiş *P. falciparum* tanılı ve Batı, Orta ve Doğu Afrika kaynaklı olarak sınıflandırılmış, ince-kalın yayma ve EDTA'lı kan örnekleri dâhil edilmiştir. DNA izolasyonu sonrası real-time PCR ile *P. falciparum* tür tayini; nested-PCR/klasik PCR yöntemleriyle direnç marker bölgelerinin (*Pf*crt, *Pf*mdr1, *Pf*K13) amplifikasyonu amaçlanmıştır. Amplifiye örneklerin tek nükleotid polimorfizminin (SNP) araştırılması amacıyla sekans analizi Macrogen Laboratuvarında (Macrogen, Kore); referans *P. falciparum* clone 3D7 izolatıyla kıyaslamalı SNP analizi ise SBÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Geneious R9 programıyla sağlanmıştır.

Bulgular: Çalışmadaki 100 *P. falciparum* örneğinin 45'i yayma, 55'i EDTA'lı kan örneğiydi. Yayma örneklerinin %82,2'si, EDTA'lı örneklerin tamamı real-time PCR'la *P. falciparum* olarak tanımlandı. Sekans verileri incelendiğinde, en yüksek mutasyon oranı *Pf*mdr1 bölgesinde gözlenmiştir (%74,5). *Pf*mdr1 bölgesinde Y184F mutasyonu 91 örneğin 68'inde (%74,7); N86Y ve N1042D mutasyonu sırasıyla 3 ve 16 örnekte (%3,3 ve %17,4) saptanmıştır. *Pf*crt mutasyonu 11(%12,2), *Pf*K13 mutasyonu sadece iki örnekte saptanmıştır. Tüm Afrika bölgelerinde Y184F oranı, *Pf*crt ve N1042D'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,01$). *Pf*mdr1 için değişen prevalans oranlarında olmak üzere beş farklı haplotip; NYN (Yabanıl), NFN (%56,2), NYD (%2,2), NFD (%15,7) ve YFN (%3,4) saptanmıştır. *Pf*crt ve *Pf*mdr1 geni kombine olarak incelendiğinde yedi haplotip (MNKNFN, MNKNFD, MNKYFN, IETNYD, IETNFN, IETNYN, IETYFN) oluşturduğu gözlenmiş ve MNKNFN ve MNKNFD en sık 2 haplotip olmuştur (%51,7 ve %15,7). Hem *Pf*crt ve *Pf*mdr1 mutasyon haplotiplerinin birlikteliği %7,9 oranındaydı.

Sonuç: Türkiye'de, antimalaryal dirençle ilgili moleküler belirteçlerin sürveyansı hakkındaki ilk çalışma olan bu çalışmada, en yüksek mutasyon olarak *Pf*mdr1 ve

*Pf*mdr1 kodonları içinde de Y184F mutasyonu başta olmak üzere N86Y ve N1042D SNP'leri; 2.sıklıkta ise *Pf*crt mutasyonu ile sadece 2 örnekte *Pf*K13 geninde E602D mutasyonu saptanmıştır. Antimalaryal ilaç direnci ve genetik SNP sürveyansının düzenli olarak yapılması, küresel sıtma eliminasyon stratejilerinin belirlenmesine önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Plasmodium falciparum*, Sıtma, PCR, İlaç Direnci

ABSTRACT

Aim: In our study, we aimed to investigate antimalarial drug resistance genes in archived samples of patients diagnosed with malaria by microscopic examination.

Material and Methods: Archived *P. falciparum* thick/thin smear and EDTA Bloodd samples, originating from East, West, and Central Africa, were included in this study. After DNA extraction we aimed to identify P. falciparum by real-time PCR and amplify resistance marker regions (Pfcrt, Pfmdr1, PfK13) using nested-PCR/classical PCR methods. Amplified PCR products were sequenced commercially (Macrogen, Korea) in order to investigate single nucleotide polymorphism (SNP) by comparing with reference *P. falciparum* clone 3D7 isolate. Data analysis was done using Geneious R9 software in Department of Medical Microbiology of University of Health Sciences.

Results: Of the studied 100 samples, 45 were preserved as thick/thin smear, while 55 of them were archived in EDTA blood tubes. While all of the EDTA samples were identified as *P. falciparum* by real-time PCR, only 82.2% of the Smear samples could be identified. When the sequence data were analyzed, the highest mutation rate was observed in the Pfmdr1 region (74.5%). Y184F mutation in the Pfmdr1 region in 68 of 91 samples (74.7%); N86Y and N1042D mutations were detected in 3 and 16 samples (3.3% and 17.4%), respectively. Y184F ratio was statistically significantly higher than Pfcrt and N1042D in all African regions ($p<0,01$). Five different haplotypes for *Pf*mdr1with varying prevalence rates; NYN (wild-type), NFN (56.2%), NYD (2.2%), NFD (15.7%) and YFN (3.4%) were detected. When *Pf*crt and *Pf*mdr1gene were examined in combination, it was observed that they formed seven distinct haplotypes (MNKNFN, MNKNFD, MNKYFN, IETNYD, IETNFN, IETNYN, IETYFN) and among the detected haplotypes, MNKNFN and MNKNFD were found to be most common. The prevalence of the combination of both *Pf*crt and *Pf*mdr1mutation was found as 7.9%.

Conclusion:

In this study, which is the first study on the surveillance of molecular markers related to antimalarial resistance in Turkey, N86Y and N1042D SNPs, especially Y184F mutation, are found in P*f*mdr1 and P*f*mdr1 codons as the highest mutation; E602D mutation in P*f*K13 gene was detected in only 2 samples with P*f*crt mutation in the

second frequency. Regular surveillance of antimalarial drug resistance and genetic SNPs will contribute significantly to the determination of global malaria elimination strategies.

Key words: *Plasmodium*, Malaria, PCR, Drug Resistance.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

DSÖ'nün 2021 Dünya Sıtma Raporu'na göre 2020 yılında sıtma açısından endemik olan 85 ülkede 241 milyon sıtma vakası bildirilmiştir. 2019 yılında 227 milyon olan vaka sayısı 2020 yılında artmıştır. 2020'deki artış, genel olarak Afrika Bölgesi kaynaklıdır. Afrika Bölgesi, tahmini 228 milyon ile vakaların yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Vaka sayılarındaki artışın sebeplerinden biri antimalariyal tedavilere dirençli *Plasmodium* suşlarının ortaya çıkmasıdır. İlk antimalaryal direnç 1950'lerde malaria eradikasyon programı ile kullanılmaya başlanan klorokine (CQ) karşı 1960'ların başından itibaren gelişmiştir (1). CQ direnci ilk olarak Doğu Afrika'da tanımlanmıştır (2). *P. falciparum'*daki CQ direnci dünyanın çoğu yerine yayılarak milyonlarca ölüme neden olmuştur. CQ yerine farklı antimalaryal ilaçların kullanımı sonrası başka çeşitli antimalaryal ilaçlara karşı da dirençler ortaya çıkmıştır. Bu durum son yıllarda yetersiz tedavi, nüksler, komplikasyonlar gibi tedavide gözlenen başarısızlıklara sebep olmaktadır. Afrika Bölgesi'nde artemisinin kısmi direncinin ortaya çıktığına dair son kanıtlar küresel endişeye sebep olmaktadır ve direncin terapötik etkinlik ve genotipik sürveyans kapsamını belirleme çalışmaları, DSÖ tarafından acil bir öncelik olarak tanımlanmıştır (3).

Sıtma tanısında moleküler yöntemler son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile sadece enfeksiyonun tanısı değil, etken parazitin türünün belirlenmesi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve ilaç direncinin saptanması da mümkün olmaktadır (4).

Antimalaryal ilaç direnç markerları, antimalaryal ilaç direnci ile ilişkili genlerdir. Bunlar *Pf*crt (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter), *Pf*mdr1 (*P. falciparum* multidrug resistance 1), *Pf*dhfr (*P. falciparum* dihidrofolat redüktaz), *Pf*dhps (*P. falciparum* dihidropteroat sentetaz), *Pf*mrp (*P. falciparum* multidrug resistance protein), *Pf*ATPaz 6 (*P. falciparum* ATPaz 6) ve *Pf*K13'tür (*P. falciparum* kelch 13) (1,5).

Çalışmamızda kalın damla ve ince yayma preparatlarının mikroskobik değerlendirilmesiyle sıtma tanısı almış hastaların arşivlenmiş ince ve kalın yayma ile EDTA'lı kan örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerde PCR yöntemi ile *P. falciparum* tür tayinin yapılması ve antimalaryal ilaç direnç genlerindeki (*Pf*crt, *Pf*mdr1, *Pf*K13) SNP'lerin (Single nücleotide polymorphism, tek nükleotid polimorfizmi) saptanarak

analizi amaçlanmıştır. Direncin yayılmasının ciddi sonuçları olacağından genetik mutasyonların saptanmasının sıtma tedavisinde etkili olan ilaçların, dolayısı ile küresel sıtma eliminasyon stratejilerinin belirlenmesine önemli veriler sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.SITMA TARİHİ

Türkiye'de sıtma olarak bilinen hastalık, dünyada daha çok malarya olarak adlandırılır. Sıtma, tarih boyunca milyonlarca insanın hastalanmasına ve ölümüne neden olan tıbbın tanımladığı ilk hastalıklardandır.

Sıtma ülkemizde ele alınan büyük bir sağlık problemidir. 1925 yılından itibaren sıtma savaşı çalışmaları başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ile yapılan işbirliği ile 1957 yılından itibaren, ülkemizden sıtmanın eradikasyonu çalışmalarına başlanmıştır (6). 2006 yılında da ülkemiz eliminasyon programına dahil edilmiştir (7).

2.2. EPİDEMİYOLOJİ

DSÖ'nün 2021 Dünya Sıtma Raporu'na göre 2020 yılında sıtma endemik olan 85 ülkede 241 milyon sıtma vakası bildirilmiş ve 2019 yılında 227 milyon olan vaka sayısı ile kıyaslandığında ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir. 2020 yılında gözlenen bu deki artış, COVID-19 salgını sırasında hizmetlerin kesintiye uğramasıyla ilişkilendirilmiştir. Vakalardaki artış genel olarak Afrika Bölgesi kaynaklıdır. Afrika Bölgesi, tahmini 228 milyon vaka ile vakaların yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Yirmi dokuz ülke dünya genelinde sıtma vakalarının %96'sından sorumludur ve altı ülke küresel olarak tüm vakaların yaklaşık %55'ini oluşturmaktadır: Nijerya (%27), Demokratik Kongo Cumhuriyeti (%12), Uganda (%5), Mozambik (%4), Angola (%3,4) ve Burkina Faso (%3,4). Tüm dünyada sıtmaya bağlı ölüm 2000 yılında 896.000 iken, istikrarlı bir şekilde azalarak 2019 yılında 558.000 ölüm bildirilmiştir. 2020'de sıtma ölümleri, 2019'a kıyasla %12 artarak tahmini 627.000'e yükselmiştir (3). Korunmaya yönelik küresel ve ulusal çabalara rağmen COVID-19 salgınının, beklenenden daha yüksek oranda sıtma morbiditesine yol açmış olması muhtemeldir (3,8).

Sıtma hastalığına ılıman ve tropikal bölgelerde daha sık rastlanmaktadır (5). *Plasmodium falciparum* dünyada en fazla görülen sıtma etkeniyken, *P.vivax* ikinci önemli türdür (9). *Plasmodium falciparum* sıtma ölümlerinin %90'dan fazlasının etken türü olarak belirlenmiştir (1). Afrika'da, *P. falciparum* baskınken, *P. vivax* ise Asya, Orta ve Güney Amerika, Orta Doğu ve Okyanusya'da yaygındır. *Plasmodium ovale*

sadece Batı Afrika'da yaygınken, *P. malaria* çoğu bölgede bulunur, ancak Afrika dışında nispeten nadirdir. Son on yıl içerisinde Güney Doğu Asya'nın ormanlık bölgelerinden simian paraziti olan *P. knowlesi*'nin etken olduğu pek çok insan sıtma vakası bildirilmiştir (5,10). Türkiye'de *P. vivax* endemik olup en sık Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde görülür (11). Ülkemizde başlatılan eliminasyon programı ile sıtma olgularında dramatik azalma izlenmiştir. DSÖ verilerine göre 2010 yılından bu yana Türkiye'de yerli olgu saptanmamıştır ve Türkiye sıtmanın elimine edildiği ülkeler arasında yer almaktadır. Günümüzde Türkiye'de saptanan olguların tamamı yurtdışı kaynaklı olup, 2017 yılı verilerine göre toplam 214 vaka görülmüş, bunların 148'i *P. falciparum* olarak raporlanmıştır (8).

2.3. ETİYOLOJİ

*Plasmodium m*parazitleri, *Sporozoa* sınıfında, *Apicomplexa* şubesi, *Eucoccidiida* takımında ve *Plasmodidae* familyasında yer alır (12). Beş farklı *Plasmodium* türü hastalıkla ilişkilendirilmiştir, bunlar; *P. falciparum, P. vivax, P. ovale* ve *P. malariae, P. knowlesi'dir* (13).

2.3.1. *Plasmodium falciparum*

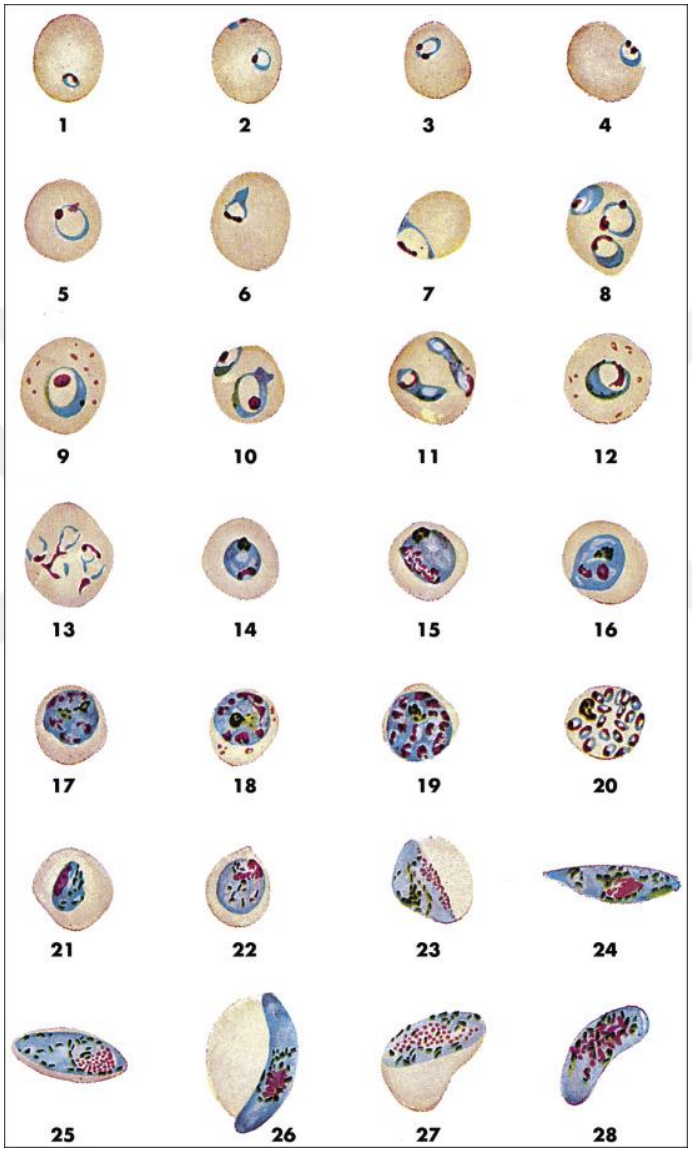
Dünyadaki sıtma olgularının %85'inden sorumludur. Total eritrosit popülasyonunun % 10'dan fazlasını enfekte eder. Her yaştan eritrositi enfekte edebilir. Bir eritrosit içine birden fazla parazit gözlenebilir. Genç trofozoitin nükleusu sıklıkla iki adettir (2 taşlı yüzük görünümü). Şizontlar periferik kanda nadir görülür. Serbest kalan merozoitler düzensiz aralıklarla yeni eritrositleri enfekte eder. Bu sebeple ateş nöbetleri arası 36-72 saat olarak değişebilir. Gametositler uzun ve hilal/orak şeklinde (muz şeklinde) morfoloji gösterir. Sıtma pigmenti hemozin mavi renge boyanan bazofilik yapıda, kaba görünümlü ve az sayıdadır ve Maurer tanecikleri adı verilir. Bu pigment gametositin nükleusu etrafına toplanma eğilimindedir (14).

2.3.2. *Plasmodium vivax ve Plasmodium ovale*

Her eritrosit içine sadece bir parazit olacak şekilde immatür-genç eritrositleri enfekte ederler. Total eritrosit popülasyonunun %1'inden daha azını enfekte ederler. Eritrosit içindeki Giemsa ile koyu kırmızı-kahverengi ince küçük asidofilik granüllere Schüffner granülleri denir (14). *Plasmodium vivax* ile enfekte eritrositler, normal eritrosit boyutundan büyüktür. Parazit eritrositleri hemen hemen tümüyle dolduracak büyüklüktedir (14).

Plasmodium ovale ile enfekte eritrositler neredeyse hiç büyümediği için normal eritrosit boyutundadır. Ayrıca enfekte bazı eritrositlerin membranında testere ağzı şeklinde tırtıklanma görülür ve gametositleri yuvarlaktır (12).

Şekil 2.1. *Plasmodium falciparum* eritrositer hayat dönemleri (1-14 trofozoitler; 15-19 şizontlar; 20



olgun şizont; 21-25 genç gametosit; 26 olgun makrogametosit; 27 genç mikrogametosit; 28 olgun mikrogametosit (15)

2.3.3. *Plasmodium malaria*

Yaşlı eritrosileri enfekte eder. Total eritrosit popülasyonunun % 0,2 kadarını enfekte ederler. Enfekte eritrositler genişlemez ve normal eritrosit boyutundadır. Parazit eritrosit içinde bir bant şeklinde görülür. Pigmentler, Ziemann granülleri olarak adlandırılır ve gametositleri yuvarlaktır (14).

2.3.1.4. *Plasmodium knowlesi*

Eritrosit içerisinde bant benzeri görünüme sebep olur bu yüzden *P. malariae* ile sık karıştırılır. Endemik bölgelerde *P. malariae* tanısı konulan pek çok olgunun nested PCR ile *P. knowlesi* olduğu anlaşılmıştır (14).

2.4. KLİNİK BELİRTİ VE BULGULAR

Sıtma nöbeti, üç dönem ile karakterize bir tablodur; üşüme-titreme, yüksek ateş, terleme (12). Tüm sıtma türleri içinde en ağır seyredebileni *P. falciparum*' un yol açtığı sıtmadır. *P.falciparum* ile enfekte eritrositlerin yüzeyinde parazite ve insana ait proteinlerden meydana gelen yumrumsu çıkıntılar oluşur. Bu yumrumsu çıkıntılar ile endotele bağlanan enfekte eritrositler kılcal damarlara sekestre olur, mikrovasküler kan akımı bozukluğu ve tıkanıklıklara sebep olur (16). *Plasmodium falciparum*'un her yaştaki eritrositi enfekte edebilmesi ve bu sebeple parazitemi seviyesinin fazla olması ayrıca sitoaderans yeteneğinden dolayı, serebral sıtma, akciğer ödemi, malabsorbsiyon ve enterokolit, böbrek yetmezliği gibi komplikasyonlara daha sık rastlanır (14,17). En fazla görülen komplikasyon karasu humması olarak bilinmektedir. Hastada normal sıtma nöbeti ve belirtileri devam ederken, birkaç gün sonra şiddetli karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal başlamakta, belirgin hemolitik sarılık, hemolitik anemi gelişmekte, idrar önce hematüri nedeniyle kırmızı, sonra hemoglobinüri nedeniyle siyah renkte görülmekte, hastada böbrek yetmezliği ve hipertansiyon ile kollaps oluşmaktadır. Hastalarda transfüzyon ve diyaliz ihtiyacı olabilir. Karasu hummasının mortalitesi %30'dur (12).

Rekürrens (Depreşme); Hastalık süresince gözlenen klinik düzelmeler sırasında, hasta yeni bir parazit ile yeniden enfekte (re-enfeksiyon) edilmediği halde sıtma kliniğinin depreşmesidir. İki şekilde görülür; Relaps ve recrudescence.

1. **Relaps*:*** *P. vivax* ve *P. ovale* sporozoitlerinin bir kısmı karaciğer parankim hücrelerinde gelişme göstermeksizin, latent halde uzun bir süre kalabilmektedir. Hipnozoit denilen bu yapılar bir süre sonra (8-24 hafta ya da aylar sonra) aktive olup çoğalmaya başlar. Gelişimini tamamlayan her bir hipnozoit yeni bir eritrositer dönemi başlatır. Latent durumdaki hipnozoitlerin aktivite kazanmasına bağlı olarak görülen bu sıtma depreşmesine relaps denir.
2. **Recrudescence:** Hipnozoit dönemi görülmeyen *P. malariae, P. falciparum* türlerinin neden olduğu olgularda, ilk enfeksiyonun yetersiz ya da yarım

bırakılmış tedavileri sonrasında kanda çok düşük seviyede parazit popülasyonu kalır. Bunlar enfekte bireylerde belirti oluşturmazlar. 30-50 yıl bu şekilde kalmış olgular rapor edilmiştir. Dalak fonksiyon bozukluğu gibi bazı durumlarda kandaki parazit popülasyonunda artış olur ve hastalık semptomları ortaya çıkar. Bu sıtma depreşmesine recrudescence denir (14).

2.5. TANI ve ANTİMALARYAL DİRENÇ TAYİNİ

Sıtmada uygun tedavinin zamanında başlanabilmesi ve komplikasyonların engellenebilmesi için tanının hızlı konulması gerekir. Tanı için periferik kanda parazit aranması, serolojik ve moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır (17).

2.5.1. Mikroskobi

Sıtma tanısında hastanın periferik kan örneğinin mikroskobik incelemesi günümüzde halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Mikroskobik değerlendirmenin avantajları olarak şunlar sayılabilir; ucuz bir yöntem olması, parazit çeşitliliğinin saptanabilmesi, parazit yoğunluğunun değerlendirilebilmesi, antimalaryal tedavinin sonucunun izlenebilmesi. Öte yandan, mikroskobik incelemede tanı duyarlılığı; alınan örneğin ve hazırlanan yaymaların kalitesi, boyamanın kalitesi, personelin eğitimi, tecrübesi gibi pek çok faktörden etkilenebilir. En yaygın kullanılan yöntem "kalın damla ve ince yayma" preparatların Giemsa ile boyanarak mikroskobik olarak incelenmesidir, referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Kalın damla kan preparatı bir yoğunlaştırma yöntemi olup parazitin olup olmadığını saptamada kullanılır. İnce yayma kan preparatı ise parazitin türünü belirlemek amacıyla yapılır. Kalın damlada kan elemanları ve eğer varsa parazit dâhil, aynı büyüklükte bir ince yayma preparata göre yaklaşık 15-20 kat halinde bulunurlar. Böylece parazitin saptanmasında duyarlılığı çok daha yüksektir. Ancak parazit morfolojisi konusunda yeterli bilgi vermediğinden tür ayırımı kalın damla preparat ile mümkün değildir (4,12,17).

2.5.2. Antikor Saptayan Yöntemler

Sıtma parazitine karşı oluşan antikorlar, özellikle eritrositik evredeki enfeksiyonlara karşı oluşan antikorlar; indirekt floresan antikor testi (İFA), indirekt hemaglütinasyon (İHA), immünpresipitasyon ve enzim işaretli antikor testi (ELISA) yöntemleri ile saptanabilir. Fakat antikorlar geç dönemde saptanabilir seviyeye geldiği

için sıtmanın akut tanısında yararlı değildir. Daha çok epidemiyolojik çalışmalarda, transfüzyona bağlı sıtma olgularında kullanılabilirler (12,13).

2.5.3. Antijen Saptayan Yöntemler

Hızlı tanı testleri (HTT), "Rapid Diagnostic Tests" (RDT), parazitlerin hedef antijenine karşı oluşmuş monoklonal ve poliklonal antikorların kullanıldığı, antijen-antikor birleşmesi esasına dayalı testlerdir. Uygulanması kolay, uzmanlık gerektirmezler. Yaklaşık 10 dakika içinde sonuç vermektedirler. HTT, uzman gerektiren mikroskobik incelemenin geciktiği durumlarda fayda sağlayabilir. Fakat tür belirlenememesi, paraziteminin hesaplanamaması HTT'nin dezavantajlarındandır. HTT pozitif olduğunda bile, tanıyı tür düzeyinde doğrulamak ve parazitemi düzeyini tahmin etmek için mikroskopi endikedir (11,13,16,17). Mevcut testler, *P. falciparum'*a özgü antijen olan histidine rich protein-2 (HRP-2), *P. falciparum*'a spesifik *Plasmodium* laktat dehidrogenaz (pLDH-Pf), tüm *Plasmodium* türlerinde bulunan *Plasmodium* laktat dehidrogenaz (pLDH-pan) ve aldolaz antijenlerinin saptanmasına dayanmaktadır (18).



Şekil 2.2. Hızlı Antijen testi

2.5.4. Moleküler Yöntemler

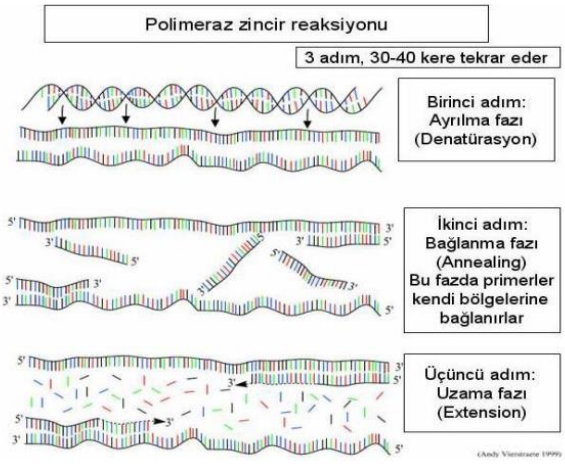
Sıtma tanısında moleküler yöntemler son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile sadece enfeksiyonun tanısı değil, etken parazitin türünün belirlenmesi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve ilaç direncinin saptanması da mümkün olmaktadır (4).

İlk defa 1984 yılında Franzen ve ark. *P. falciparum* hastası olan bir hastanın kan örneğinde DNA sarmalı üzerinde tekrar eden bir bölge saptamışlardır. Daha sonra DNA' nın bazı bölümlerinin *Plasmodium* türleri için spesifik olduğu ve bu bölümlerin izolasyonu ile parazitin tanınabileceği düşünülmüş ve DNA hibridizasyon yöntemi bildirilmiştir. Sonraki çalışmalarda hücre içindeki diğer RNA ve DNA'lardan 10-50 kat daha fazla olan ribozomal RNA (rRNA) gen bölgesini hedefleyen özel primerler

geliştirilmiştir. Snounou ve ark. DNA ekstraksiyonu sonrası agaroz jel elektroforezi ile *Plasmodium* DNA'sını tespit ederek, 1–11 parazit/µl yoğunluğundaki parazit yükünü dahi saptayabilen polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemleri geliştirmişlerdir (12).

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. Moleküler yöntemlerde hedef, venöz kandan veya filtre kâğıdına emdirilmiş kan örneğinden DNA ekstraksiyonu, geleneksel ya da real-time 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 (4).

PCR'a dayalı yöntemler teknik açıdan karmaşık olduğu için rutin tanı yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Fakat epidemiyolojik, genetik, immünolojik çalışmalarda, sıtmaya karşı aşı geliştirilmesinde, ilaç direncine neden olan genlerin saptanmasında kullanılmaktadır (12). PCR, bir DNA molekülünde hedef dizilere oligonükleotid primerin bağlanması ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq polimeraz ile ipliklerin uzaması temeline dayanır. PCR'ın temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$'dür. Bir PCR döngüsü (siklus) denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur (19).



Şekil 2.3. PCR siklusunun basamakları (20)

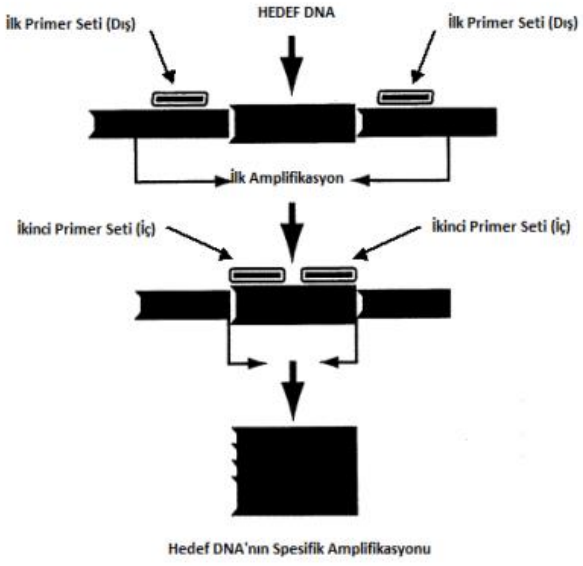
Denatürasyon aşamasında 95–100°C'de birkaç dakika ısıtılarak çift zincirli hedef DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Bağlanma aşamasında

DNA’nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapacak olan primerler bağlanır. Bağlanma sıcaklığı ve sürenin uzunluğu; primerlerin nükleotid yapısına, uzunluğuna ve PCR solüsyonundaki konsantrasyonlarına bağlıdır, genellikle primerlerin erime sıcaklıklarının 5˚C altında olup 55-65˚C’lerde en iyi sonucu vermektedir. Uzama aşamasında ise ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq polimeraz, nükleotitleri ekleyerek hedef DNA’nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur. Taq polimerazların aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi 72˚C’dir.

Her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. Teorik olarak her döngünün %100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 döngü sonucu 2^{20} kat ürün meydana gelir. Toplam döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır. Döngü sayısının arttırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenen ürünlerde bir artış meydana gelmez. Bu yüzden 40’dan fazla döngüden oluşan PCR reaksiyonları genellikle başarılı bir sonuç vermez. Amplifikasyondan sonra PCR ürünleri genellikle jel üzerindeki kuyucuklara yüklenir ve daha sonra elektroforeze tabi tutulur (19).

2.5.4.1. Nested PCR

Özgül olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgüllükte bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde art arda iki PCR yapılır. İlk aşama PCR’da iki adet dış (outer) primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu ile özgül olmayan ürünler oluşturulur. İkinci PCR ise, ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA’nın iç kısımlarına ait dizileri içeren iki iç (inner) primer ile yapılır.

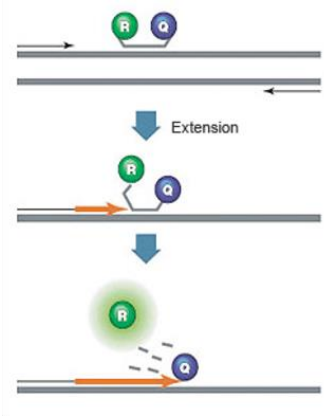


Şekil 2.4. Nested PCR akışı (21)

İlk PCR ürünleri ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgül ürünler elde edilir. Tek bir hedef DNA molekülü bulunsa bile, iki aşamalı olarak yapılan nested PCR amplifikasyonları ile çok sayıda DNA elde edilebilmektedir. Nested PCR'ın en büyük dezavantajı, ikinci tur amplifikasyon için birinci tur ürünlerinin ikinci tüpe aktarımı sırasında meydana gelebilecek yüksek kontaminasyon oranıdır (19,22).

2.5.4.2. Real-Time PCR

Real-time PCR, klasik PCR ve gen analizlerinde kullanılan diğer yöntemlere göre oldukça önemli avantajlara sahiptir. Hedef bölgenin çoğaltımı ve kantitasyonu aynı alette yapılabilmekte böylelikle elektroforez aşaması ortadan kalkmaktadır. Bu da zaman tasarrufu sağladığı gibi kontaminasyon riskini de azaltmaktadır. Temelinde PCR'a dayanan bu yöntem floresan teknolojisindeki ilerlemelere bağlı olarak 1990'lı yıllarda geliştirilmiştir. PCR ürünleri oluştukları andan itibaren DNA'ya bağlanan floresan boyalar sayesinde izlenebilmekte ve eşzamanlı olarak ölçülebilmektedir. Floresan sinyali iki yoldan biriyle oluşturulabilir. İlk yöntem, yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (SYBR green 1, etidyum bromür gibi) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmesidir. PCR ürünlerindeki artışa bağlı olarak daha fazla bağlanma gösterir ve daha fazla floresans yayar. Diğer yöntemde de hedefe özgül problar kullanılmaktır. Proba dayalı en iyi bilinen örnek ise TaqMan probe sistemi olarak adlandırılan tekniktir. FRET hibridizasyon probları, moleküler 'beacons' yöntemleri de bulunmaktadır. TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda raportör (reporter) florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom bulunmaktadır. TaqMan probu hedef DNA bölgesine bağlanır. Probla hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (23,24).



Şekil 2.5. TaqMan Yöntemi (25)

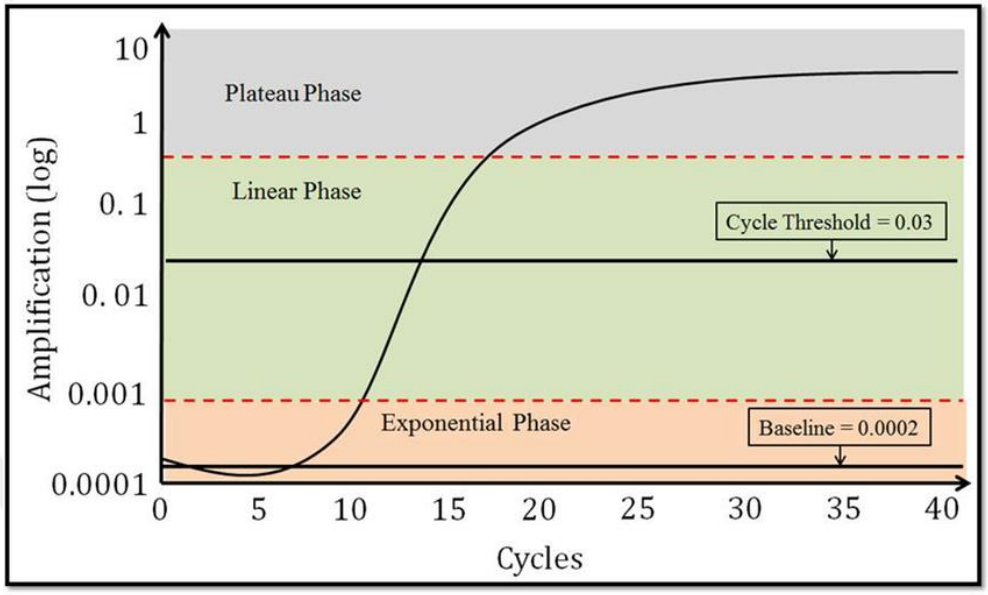
Kantifikasyon için, amplifikasyon eğrilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu eğrilerin 3 önemli evresi mevcuttur.

1.Lag (Lineer) fazı: Bu fazda saptanabilir ürün ortaya çıkmaz.

2.Eksponensiyal faz: Bu evrede kopya ürün sayısı logaritmik olarak artış göstermektedir. Ürün miktarı saptanabilir duruma gelmeye başlar.

3.Plato fazı: Bu fazda ortamdaki deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP), primerlerin bitmesine bağlı olarak ürüne bağlanması azalır. Oluşan ürün sayısı azaldığı için bu faz bir düzlük şeklinde gözlemlenmektedir. Bu nedenle Plato Fazı olarak adlandırılır. Lag fazından, eksponensiyal faza geçerken müthiş bir artışın gözlendiği ilk basamağa ya da başka bir deyişle kullanılan proba bağlı olarak reportör sinyalinde önemli artışın gözlemlendiği ilk değere Eşik Değeri (Threshold Cycle; CT) denir. Hassas kantifikasyon hesaplanabilirliği için amplifikasyonun nerede başladığının bilinmesi önemlidir (23,24). CT'nin literatürde crossing point (C_p), take-off point (TOP), quantification cycle (C_q) olarak farklı isimlendirmeleri bulunmaktadır. MIQE

(minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) rehberinde standardize edilebilmesi için Cq kullanımını önermektedir (26).



Şekil 2.6. PCR eğrisinin aşamaları (27)

2.6. TEDAVİ

Sıtma tedavisi planlanırken enfekte eden *Plasmodium* türü, hastanın klinik durumu, enfeksiyonun edinildiği coğrafi bölge göz önünde bulundurulmalıdır. Tedavi belirlenirken tür ayrımının yapılması önemlidir. *Plasmodium* türü belirlenemediyse, etken *P. falciparum* olarak düşünülerek hemen tedaviye başlanmalıdır. *Plasmodium vivax* ve *P. ovale* sıtmalarında hipnozoitlere etkili tedavinin gerekliliği, *P. falciparum* enfeksiyonlarının ciddi hastalığa ve hatta ölüme neden olabilmesi, *Plasmodium* türlerinin farkı coğrafyalarda farklı antimalaryal ilaç direnç özelliklerine sahip olması tür ayrımının önemini göstermektedir. Sıtma klinik bulgulara göre ‘‘komplike olmamış sıtma’’ ve ‘‘ciddi sıtma’’ olarak ikiye ayrılır. Komplike olmayan sıtmada tedavinin amacı hastalığın ilerlemesini önlemek iken, ciddi sıtmada amaç komplikasyonları ve ölümü engellemektir (9).

Komplike olmayan sıtma teşhisi konan hastalar, oral antimalaryallerle etkili bir şekilde tedavi edilir. Ancak bilinç bozukluğu/koma, şiddetli anemi (hemoglobin <7 g/dL), akut böbrek yetmezliği, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), dolaşım bozukluğu/şok, dissemine intravasküler koagülopati (DIC), asidoz, sarılık (şiddetli sıtmanın en az bir başka belirtisiyle birlikte), hiperparazitemi (parazit yoğunluğu

≥%5) kriterlerinden biri veya birkaçı varsa komplikasyonlu/ciddi sıtma olarak kabul edilir. İntravenöz antimalaryal tedavi ile tedavi edilmelidirler (28).

Tedaviye başlandıktan sonra hastanın klinik ve parazitolojik durumu izlenmelidir. *P. falciparum, P. knowlesi* veya klorokin dirençli *P. vivax* ile enfekte hastalarda tedaviye parazitolojik yanıtı izlemek için her 12-24 saatte bir kan yayması tekrarlanmalıdır (28).

2.6.1. Antimalaryal İlaçlar

Sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlar, parazitin tüm evrim şekillerine etkili olamadıklarından etki yerlerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Kanda eritrositler içinde bulunan trofozoit, şizont ve merozoitlere etkili ‘‘kan şizontosidal’’, karaciğer parankim hücreleri içinde gelişen şizont şekillerine etkili ‘‘doku şizontosidal’’, yine karaciğer hücreleri içinde bulunan *P. vivax* ve *P. ovale* hipnozoitlerine etkili ‘‘hipnozoitosidal’’, kanda bulunan gametositlere etkili ‘‘gametosidal’’, ve sporozoitlere etkili ‘‘sporozoisidal’’ ilaçlar olarak ayrılmaktadırlar (12).

Tablo 2.1 Antimalaryal İlaçların Etki Yerleri (11)

Etki Yeri	İlaç
Kan Şizontosidleri	Kinin, Klorokin, Artemisinin ve türevleri, Meflokin, Primetamin, Lumefantrin, Fansidar, Doksisiklin, Atovakuon, Dihidrofolat redüktaz inhibitörleri, Dihidropteroat sentetaz inhibitörleri
Primer Doku Şizontosidleri	Primakin, Proguanil
Sekonder Doku Şizontosidleri	Primakin
Gametosidler	Artemisinler, AKT, Primakin
Sporozoisidler	Primakin, Proguanil, Dihidrofolat redüktaz inhibitörleri, Atovakuon

AKT: Artemisinin kombine tedavisi

Sıtma önleyici ilaçların yaygın olarak uygunsuz kullanımı, sıtma parazitleri üzerinde güçlü bir seçici baskı uygulayarak, yüksek düzeyde direnç gelişimine sebep olabilir. Farklı direnç mekanizmalarına sahip farklı ilaçlar bir arada kullanılarak, direncin ortaya çıkması ve yayılması yavaşlatılabilmektedir (9).

2.6.1.1. Kinolin Deriveleri

Klorokin (CQ): Bir 4-aminokinolin derivesidir. *P. vivax, P. ovale, P. malariae* sıtmalarının tedavisinde etkili bir ilaçtır fakat *P. falciparum* sıtmasında yaygın direnç olması nedeniyle tercih edilmez. CQ, esas olarak parazitin büyük halka biçiminde ve olgun trofozoit aşamalarında etki eder. Hipnozoitlere etkisizdir. CQ, *Plasmodium* türlerinin hemoglobin içeren sindirim veziküllerinde konsantredir. İntraveziküler pH'yı yükseltir ayrıca hem polimerazı inhibe eder. Böylece parazitin eritrosit içindeki hemoglobini sindirmesiyle ortaya çıkan toksik ara bileşenlerin yıkılmasını engellerler ve paraziti öldürürler (5,29).

Kinin: En eski antimalaryal ilaçtır. CQ gibi hem polimerazın aktivitesini inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu grubun en önemli üyeleri kinin, kinidin, çinkonin, çinkonidindir (5,29).

Primakin: Hipnozoitlerin tedavisinde kullanılan bir 8-aminokinolindir. Gametosidal etkileri de vardır. *Plasmodium'*un eritrositer aşamasına karşı etkili değildir ve *P. vivax* veya *P. ovale* enfeksiyonlarını tedavi etmek için CQ veya diğer ilaçlarla birlikte kullanılmalıdır (5,29).

Meflokin: Kinin analoğu olan bir kinolin metanol türevidir. Komplike olmayan çok ilaca dirençli *P. falciparum* sıtmasının tedavisinde tercih edilebilir.

Halofantrin: Kinin veya meflokinden daha etkili bir ilaçtır ancak, ölümcül ventriküler taşikardilerle ilişkili olduğundan kullanımı kısıtlıdır.

Amodiyakin: CQ'ya benzer etki şekline sahip bir kinolin analoğudur. *P. falciparum'*un dirençli izolatlarına karşı daha aktiftir. Artemisin kombine tedavisi (AKT) olarak artesunat ile kombine edilir.

Piperakin: Çoklu ilaca dirençli *P. falciparum'a* karşı etkilidir. Dihidroartemisisin ile kombine kullanılır. Piperakin, QT aralığını biraz uzatmasına rağmen CQ'dan daha güvenli bulunmuştur (5).

2.6.1.2. Anti-Folatlar

Primetamin: Dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Yapıca trimetoprime benzer. DHFR, DNA sentezi aşamalarından biri olan folik asitten tetrahidrofolat sentezini sağlar. DHFR inhibitörleri ile nükleik asit sentezi bloke olur. DHFR inhibitörleri ile aseksüel parazitin olgun trofozoit evresinin gelişimini engellemenin yanı sıra sporontosidal aktiviteye de sahiptir. Sulfonamid/sulfonlar ile kombine olarak kullanılırlar (5,29).

Sulfonamid/Sulfonlar: Dihidropteroat sentetaz (DHPS) enzimini inhibe ederler. DHPS, DNA sentezi aşamalarından biri olan PABA'dan folik asit sentezini sağlar. İnhibisyonu ile DNA sentezi bloke olur, primetamin ile kombine kullanılırlar. Sulfonamidlerden sulfadoksin ve sulfadiazin, sulfonlardan dapson antimalaryal olarak kullanılır (5,11).

2.6.1.3. Artemisinin ve Türevleri

Qinghaosu veya artemisinin, Çin'de yetişen *Artemesia annua* (Qinghao) çalısının yapraklarından elde edilen bir terpenlakton peroksit türevi bir ilaçtır. Artemisininin türevleri artesunat, artemeter ve dihidroartemisinindir. Bu ilaçlar, bilinen sıtma ilaçları arasında parazit yoğunluğunu azaltmada en hızlı etki gösterenlerdir ve halka formlarından erken şizontlara kadar en geniş antimalaryal etki spektrumuna sahiptirler. Hemoglobin metabolizmasını inhibe ederek, hem şizontların hem de gelişmekte olan gametositlerin seksüel evrelerine etki ederler. Ek olarak, bu ajanlar Ca^{++}-ATPaz ve bir glutatyon-S-transferaz gibi parazit proteinlerini alkilleyebilen serbest radikaller üreterek parazitleri tahrip ederler. Artemisinin ve

türevlerinin, direnç gelişimini engellemek ve ilaç etkinliğini arttırmak amacıyla sıtma tedavisinde farklı mekanizmalar ile etki eden antimalaryaller ile kombine kullanılmaları önerilir. Bu kombinasyona artemisinin kombine tedavisi (AKT) denir. AKT, hızlı etkili bir artemisinin türevi ile daha yavaş ve uzun etkili bir antimalaryal ilacın kombinasyonudur. Artemisinin türevi, aseksüel parazit sayısını her 48 saatte 10.000 azaltır. Daha uzun etkili kombinasyon ilaç ise, kalan parazitleri temizler ve artemisinin türevine karşı direnç gelişimine karşı koruma sağlar. DSÖ şu anda beş AKT önermektedir; artemeter+lumefantrin (AL), artesunat+amodiakin, artesunat+meflokin, artesunat+sulfdoksin-primetamin, dihidroartemisinin+piperakin. AL, çoklu ilaca dirençli *P. falciparum* sıtmasına karşı etkinliği yüksek olan bir kombinasyondur ve dünyada en yaygın kullanılan AKT'dir (5,9,29).

2.6.1.4. Atovakuon-Proguanil

Atovakuon, parazit mitokondriyal elektron transportunu inhibe ederek, pirimidin biyosentezi için kofaktör olarak gerekli olan ubikinon kaybıyla sonuçlanır. Proguanil, pirimetamin gibi bir dihidrofolat redüktaz-timidilat sentetaz inhibitörü olan, sikloguanile dönüşen bir ön ilaçtır. Atovakuonun etkisi proguanil tarafından güçlendirilir. Sonuç olarak, hem karaciğerde hem de kanda DNA replikasyonu inhibe edilir. Çoklu ilaca dirençli olan parazitlerin tedavisinde kullanılır (5,29).

2.6.1.5. Antimalaryal Aktiviteye Sahip Antibakteriyeller

Protein veya nükleik asit sentezi üzerinde etkili olan antibakteriyeller sıklıkla önemli antimalaryal aktiviteye sahiptir. Ancak sıtmayı tedavi etmek için tek başına kullanılacak kadar aktif değiller. Tetrasiklinler, tüm sıtma türlerine karşı sürekli olarak aktiftir. Doksisiklin hem profilaksi hem de tedavi için en yaygın kullanılanıdır. Klindamisin, tetrasiklinler kadar etkilidir ayrıca çocuklarda ve hamile kadınlarda kullanılabilme avantajına sahiptir. Makrolidler *in vitro* olarak aktiftir ancak in vivo olarak genellikle yetersizdir. Azitromisin daha aktiftir ve hem profilaksi hem de tedavide değerlendirilmiştir. Rifampisin *in vivo* olarak zayıf bir antimalaryal etkiye sahiptir. Bu ilaçların tümü nispeten yavaş etki ederler, bu nedenle daha hızlı etki eden ajanlarla kombinasyon halinde kullanılırlar (5).

2.6.2. Sıtma Etkenine Göre Tedavi Seçimi

2.6.2.1 *P. falciparum* Sıtmasında Tedavi

Tüm sıtma hastaları yakından takip edilmelidir, tedavide gecikme ile morbidite ve mortalite riski artacağından tedavi acilen başlanmalıdır. *P. falciparum* sıtması (veya *P. falciparum* içeren mikst enfeksiyonlar) komplikasyonsuz hastalık ve şiddetli/komplikasyonlu hastalık olarak iki grupta değerlendirilmektedir (9).

Komplikasyonsuz *P. falciparum* vakaları için CQ direnci olan bölgelerde dört tedavi seçeneği vardır: artemeter-lumefantrin, atovakuon-proguanil, kinin kombinasyonları (kinin-doksisiklin/tetrasiklin, kinin-klindamisin), meflokin (Güneydoğu Asya'nın bazı bölgelerinde edinilen enfeksiyonlar için meflokin önerilmemektedir). Komplikasyonsuz *P. falciparum* vakaları için, Panama Kanalı'nın batısındaki Orta Amerika, Haiti ve Dominik Cumhuriyeti gibi klorokine dirençli suşların bulunmadığı bölgelerde hastalar CQ veya alternatif olarak hidroksiklorokin ile tedavi edilebilir (28). DSÖ, *P. falciparum*'un monoterapilerine karşı direnç geliştirmesini önlemek için birinci trimesterdeki gebeler hariç AKT ile tedaviyi önermektedir. Birinci trimesterdeki gebeler komplikasyonsuz *P. falciparum* enfeksiyonunda oral kinin ve klindamisin ile tedavi edilmelidir (9).

P. falciparum sıtmasında tekrarlama; yeni enfeksiyon, rekürrens veya ilk tanıda atlanan mikst enfeksiyon nedeniyle olmaktadır. Yeniden sıtma endemik bölgeye gitme öyküsü varsa yeni enfeksiyon ile tedavi başarısızlığını ayırt etmek mümkün değildir. Ayrım, yalnızca ilk ve tekrarlayan enfeksiyonlardaki parazitlerin PCR genotiplenmesiyle yapılabilir. Fakat PCR rutin olarak kullanılmadığından tedaviden sonraki 4 hafta içerisinde ateşin ve parazitemininin devam etmesi tedavi başarısızlığı olarak değerlendirilmektedir. İlk 4 hafta içerisinde parazitemi ve ateş görülmesi durumunda bölgede etkili olduğu bilinen farklı bir AKT rejimi önerilir. Kinin içeren tedavi rejimleri genel olarak önerilmemektedir. 4 hafta sonra tekrarlayan *P. falciparum* enfeksiyonlarının nedeni yeni enfeksiyon olarak değerlendirilip AL ile tedavi edilmelidir (9).

Komplikasyonlarla seyreden şiddetli sıtma vakalarının tümü hastaneye yatırılarak takip edilmelidir. Şiddetli sıtma olasılığı varsa parenteral antimalaryal ilaçlara gecikmeden başlanmalıdır, türden bağımsız olarak ilk tercih olan artesunattır. IV veya IM olarak verilebilir. 24 saatten sonra hasta oral ilaç alabiliyorsa ve parazit yoğunluğu %1'in altındaysa parenteral tedavi sonlandırılarak oral tedaviye başlanır.

Aksi durumda hasta oral ilaç alımını tolere edebilene kadar veya parazit yoğunluğu %1'in altına inene kadar parenteral tedaviye devam edilmelidir (9,28).

2.6.2.2. *P. ovale, P. vivax, P. malariae, P. knowlesi* Sıtmalarında Tedavi

P. malariae ve *P. knowlesi* türlerinde klorokin direncine dair yaygın bir kanıt bulunmamaktadır; bu nedenle, bu enfeksiyonların her ikisi için de CQ (veya hidroksiklorokin) hala kullanılabilir (28).

P. vivax ve *P. ovale* enfeksiyonlarında (klorokin dirençli *P. vivax*'ın prevalansının yüksek olduğu Papua Yeni Gine veya Endonezya'daki *P. vivax* enfeksiyonları dışında) CQ (veya hidroksiklorokin), etkili bir seçim olmaya devam etmektedir. Klorokine dirençli *P. vivax* vakaları Myanmar, Hindistan ve Orta ve Güney Amerika'da nadiren de olsa raporlanmıştır. CQ tedavisi sonrası klinik semptomların devam etmesi veya parazit yoğunluğunda azalma olmaması gibi durumlarda, CQ dirençli *P. vivax* enfeksiyonları için önerilen AL, atovakuon-proguanil veya kinin-doksisiklin/tetrasiklin/klindamisin rejimlerinden birine başlanmalıdır. Eritrositer döngüye etki eden bu ilaçlara ek olarak *P. vivax* ve *P. ovale* enfeksiyonlarında hipnozoit formlar için tedaviye primakin eklenmelidir (28). Gebelerin ve emziren kadınların primakin kullanmaması önerilmektedir. Primakin tedavisi emzirme sona erene kadar ertelenebilmektedir.

Güncel direnç durumunun bilinmediği durumlarda parazitin klorokine karşı direnç geliştirdiği kabul edilerek tedavinin buna göre düzenlenmesi uygun olacaktır. DSÖ, *P. vivax, P. ovale, P. malariae* ve *P. knowlesi* sıtma tedavisinde AL tablet (ilk trimesterdeki gebeler hariç) kullanılmasını önermektedir. İlk trimesterdeki gebelerde *P. vivax* sıtmasında kinin kullanılmalıdır (9).

2.6.3. Antimalaryal İlaç Direnci

DSÖ, 1950'lerde malaria eradikasyon programını, CQ ve dikloro-difenil-trikloroetan (DDT) ile açıklamıştır. Ancak 1960'ların başında CQ direnci ortaya çıkmıştır (1). CQ direnci ilk olarak Doğu Afrika'da tanımlanmıştır (2). Daha sonra da başka çeşitli antimalaryal ilaçlara karşı dirençler ortaya çıkmıştır. Orta Amerika hariç tüm coğrafi bölgeler antimalaryal ilaç direncinden etkilenmiştir. Güneydoğu Asya bölgesi, antimalaryal ilaç duyarlılığı çok azalmış olduğundan en çok etkilenen bölgedir. *P. falciparum'*daki CQ direnci dünyanın çoğu yerine yayılarak milyonlarca ölüme neden olmuştur. CQ direncinin sadece birkaç durum hariç yayılımı

sınırlanmışken, anti-folat ilaçlara ve atovakuona direnç sıklıkla ortaya çıkmaktadır. *P. falciparum'*da artemisinin direnci ilk olarak 2008'de Kamboçya'da rapor edilmiştir (30). *P. falciparum*'daki artemisinin direnci şu anda Kamboçya, Lao Demokratik Halk Cumhuriyeti, Myanmar, Tayland ve Vietnam'ın bazı bölgelerinde yaygındır (3,9). Afrika Bölgesi'nde özellikle Ruanda ve Uganda ve Eritre'de artemisinin kısmi direncinin ortaya çıktığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Fakat Ruanda ve Uganda'daki tedavi başarısızlık oranları, AKT etkili olmaya devam ettiği için %10'un altında kalmaktadır (3). Kamboçya'da AKT yerine atovakuon-proguanil kullanımı atovakuona karşı çok hızlı bir direnç ortaya çıkmasına neden olmuştur. Ayrıca Kamboçya'da piperakin direnci de ortaya çıkmaya başlamıştır ve bu direnç *P. vivax*'ta da görülebilmektedir. Kamboçya'da, şu anda önerilen tedavi rejimlerinin hiçbiri kabul edilebilir kür oranları (> %90) sağlamamaktadır ve etkisiz ilaç rejimlerinin sürekli kullanımı direncin yayılmasını hızlandırmaktadır. CQ'ya karşı yüksek düzeyde direnç Endonezya ve Papua Yeni Gine'de yaygındır, Asya ve Amerika'nın bazı bölgelerinde daha düşük direnç düzeyleri bildirilmiştir. *P. vivax'*ta anti-folat ilaç direnci de yaygındır. *P. malariae* veya *P. ovale* parazitlerindeki antimalaryal direnç üzerine yapılan çok az çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalarda düşük düzeyde direnç saptanmıştır (9).

Antimalaryal ilaç direnci, hastanın tolere ettiği konsantrasyonlardan daha yüksek konsantrasyonlarda ilacın emilmesinden sonra parazitin hayatta kalma yeteneğidir. Antimalaryal ilaçlara direnç, genetik değişikliklere (mutasyonlar veya gen amplifikasyonları) sahip parazitlerin seçilmesi nedeniyle ortaya çıkar. Artemisinin türevleri de dâhil olmak üzere tüm sıtma önleyici ilaç sınıflarına direnç belgelenmiştir ve bu durum sıtma kontrolü için büyük bir tehdittir (10). Sıtma parazitleri, diğer parazitlerden lateral transfer yoluyla direnç genleri kazanmazlar. Direnç, spontan kromozomal nokta mutasyonlarından veya gen duplikasyonlarından kaynaklanır. Dirençli mutantlar, antimalaryal ilaçların varlığında hayatta kalma avantajına sahiptirler (5). Antimalaryal ilaç direncinin ana sonucu tedavi başarısızlığıdır. Düşük direnç seviyelerinde erken dönemde tedavi başarısızlığı görülmezken, geç dönemde nüks olan hastaların oranı artar. Direnç seviyesi arttıkça, nüksetme daha erken gerçekleşir veya parazitemi hiç azalmayıp artmaya devam eder. Parazit klirensinin yavaşlaması, artan direncin bir göstergesidir. Fakat tedavi başarısızlığında; yanlış

dozda ilaç kullanımı, uyum eksikliği, ilaç kalitesi, diğer ilaçlarla etkileşimler, ilaç emiliminde azalma, ilacı kusma veya hastalığın yanlış teşhisi gibi diğer nedenler de göz önünde bulundurulmalıdır (9). *P. vivax* antifolat grubu ilaçlara karşı yaygın direnç geliştirmiştir fakat *P. falciparum* dışındaki *Plasmodium* türleri genellikle antimalaryal ilaçlara *P. falciparum*'dan daha duyarlıdır. *P. falciparum* artık artemisinin türevleri de dâhil olmak üzere tüm antimalaryal ilaç sınıflarına karşı direnç geliştirebilmektedir (5). *P. falciparum'*un en sık kullanılan antimalaryal ilaçlara karşı dahi direncinin gelişmesi ve yayılması, sıtmanın kontrolünde büyük zorluklara neden olmaktadır. İlaç direnci seviyesini belirleyici çalışmaların düzenli olarak yapılması ile sıtmada etkili olan ilaçlara erişim açısından, sorumlu sağlık yetkililerine önemli bilgiler sağlanır. Sıtmada ilaç direncini değerlendirmede *in vivo* ilaç etkinliği çalışmaları, hasta izolatlarının *in vitro* duyarlılık testleri ile değerlendirilmesi ve ilaç direncinin moleküler belirteçlerinin saptanması gibi birkaç yöntem kullanılmaktadır (31). Antimalaryal ilaç direnç markerları, antimalaryal ilaç direnci ile ilişkili genlerdir. Bunlar *Pf*crt (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter), *Pf*mdr1 (*P. falciparum* multidrug resistance 1), *Pf*dhfr (*P. falciparum* dihidrofolat redüktaz), *Pf*dhps (*P. falciparum* dihidropteroat sentetaz), *Pf*mrp (*P. falciparum* multidrug resistance protein), *Pf*ATPaz 6 (*P. falciparum* ATPaz 6) ve *Pf*K13'tür (*P. falciparum* kelch 13) (1,5). Coğrafi bölgelere, ülkelere göre direnç özellikleri de değişmektedir. Papua Yeni Gine'de *Pf*crt ve *Pf*mdr1'deki mutasyonlar yüksek oranda saptanmışken (31), Haiti'de *Pf*mdr1 bölgelerinde sadece Y184F saptanmış, fakat *Pf*crt bölgelerinde mutasyon saptanmamıştır (32).

2.6.3.1. Anti-Folat İlaç Grubunda Direnç

Komplike olmayan sıtmada genellikle birinci basamak tedavi artemisinin kombinasyon tedavisidir (AKT). Bununla birlikte sülfadoksin-pirimetamin (SP), 5 kg'ın altındaki çocuklarda ve ayrıca gebelerde tercih edilen tedavi olmaya devam etmektedir (33).

P. falciparum ve *P. vivax*'ta proguanil ve pirimetamine karşı direnç DHFR genindeki mutasyonlar ile ortaya çıkar, enzim kompleksinin ilaca olan afinitesinin azalması ile ilişkilidir. Sülfonamid ve sülfon direnci, DHPS'yi kodlayan gendeki mutasyonların edinilmesiyle ortaya çıkar. *Pf*dhps mutasyonlu parazitler genellikle *Pf*dhfr mutasyonlarına da sahiptir. Beş mutasyon içeren (*Pf*dhfr S108N, N51I ve C59R

ve *Pf*dhps *A*437G, K540E) *P. falciparum* sıtmaları, sülfadoksin-pirimetamin (SP) ile tedavi başarısızlığı oranlarının artmasına ve artesunat ile kombine SP tedavisine zayıf yanıt verilmesine neden olmaktadır (1,5,33).

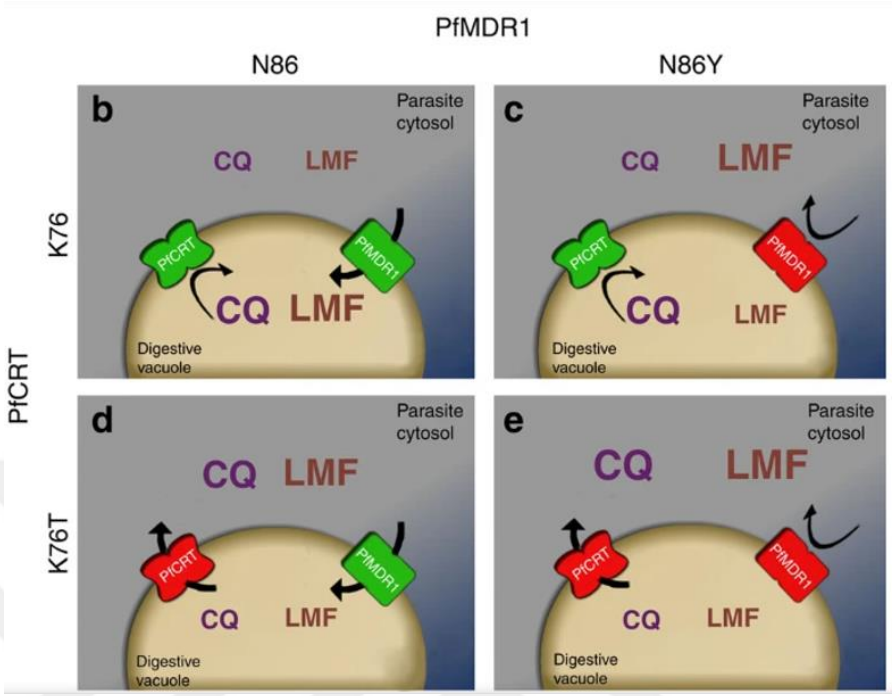
2.6.3.2. Kinolin İlaç Grubunda Direnç

En ucuz ve en yaygın antimalaryal ilaç olan CQ'ya karşı direnç gelişimi ile birçok ülkede artemisinin kombine tedavisi (AKT) kullanıma girmiştir (34). CQ direnci, sindirim vakuolündeki ilaç konsantrasyonlarının azalması ile ilişkilidir. İlaç konsantrasyonun azalması influks (içe alım) pompa işlevinin azalması, effluks (dışa atım) pompa işlevinin artması ile olur. ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcı protein, ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışan ve çesitli ilaçların, peptidler, aminoasitler, polisakkaritler gibi çeşitli endojen bileşiklerin membranlardan taşınmasını sağlayan bir membran proteinidir. Bu taşıyıcılar ilaçları sindirim vakuolünden çıkararak parazitte hücre içi ilaç birikiminin azalmasına yol açan bir effluks pompası işlevi görür. Dirençli parazitler, ilaca duyarlı parazitlerden 40-50 kat daha fazla, sindirim vakuolündeki klorokini azaltırlar. Sindirim vakuolünün zarında yer alan, 7. kromozomda kodlanan bir protein olan *Pf*crt genindeki nokta mutasyonlar CQ ilaç direnci ile ilişkilidir. 76. pozisyondaki tek kodon değişikliği, ana mutasyon olarak kabul edilmektedir. 72, 73, 74, 75, 76. kodonlarda da mutasyon tanımlanmıştır (1,5,35). A144F, I194T, A220S, Q271E and N326S *Pf*crt için tanımlanmış diğer polimorfizmlerdir (1). *Pf*crt tek başına veya *Pf*mdr1 ile kombinasyon halinde bulunabilir (36).

*Pf*mdr1, *Pf*crt gibi sindirim vakuolünün zarında bulunan 5. kromozomda kodlanan bir ABC taşıyıcı proteindir. *Pf*mdr1 geni üzerinde yapılan çalışmalar, dirençle ilişkili 5 SNP tanımlamıştır; N86Y, Y184F, S1034C, N1042D ve D1246Y kodonlarındaki polimorfizmler; kinin, klorokin, meflokin, lumefantrin, halofantrin, artemisinin grubu ilaçlara karşı antimalaryal direnç ile ilişkilidir (1).

*Pf*crt ve *Pf*mdr1 taşıyıcılarındaki nokta mutasyonlarının, parazitlerin CQ ve lumefantrine duyarlılığını farklı şekilde etkilediği bilinmektedir. *Pf*mdr1 mutasyonu ile CQ'nin sindirim vokuolüne taşınma aktivitesinin azaldığı, *Pf*crt mutasyonuyla ise sindirim vokuolünden dışarı atılımının arttığı düşünülmektedir. CQ direncinin ana belirleyicisi olarak *Pf*crt için K76T, *Pf*mdr1 için ise N86Y mutasyonu tanımlanmıştır.

*Pf*crt ve *Pf*mdr1 mutasyonun beraber bulunması ilaç direncinin fenotipik olarak ortaya çıkışını desteklemektedir (37).



Şekil 2.7. *P. falciparum*'un CQ (klorokin) ve LMF(lumefantrin) yanıtında *Pf*mdr1 ve *Pf*crt mekanizması (37)

*Pf*mrp (*P. falciparum* multidrug resistance protein) de bir ABC taşıyıcı proteindir. *Pf*mrp1 *ve Pf*mrp2 parazitin tüm aseksüel evrelerinde plazma membranında eksprese edilir. CQ, kinin, artemisinin gibi çeşitli antimalaryal ilaçlara duyarlılığı arttıran glukuronid ve konjuge sülfat bileşiklerinin taşınmasını sağlar. Effluks mekanizması ile bu bileşiklerin atılımının, antimalaryal ilaç direncini oluşturduğu varsayılır. H191Y ve S437A kodonlarındaki mutasyonlar kinolin direnci ile ilişkilidir (1).

2.6.3.3. Atovakuon İlaç Grubunda Direnç

Atovakuon, mitokondriyal elektron taşınmasına müdahale ederek parazitin hücresel solunumunu bloke eder. Bu ilaç grubunda direnç, sitokrom b′ *yi* kodlayan gendeki tek nokta mutasyonlarından kaynaklanır. 133. kodondaki ilk mutasyonun düşük dirence neden olduğu gösterilmiştir fakat 272. kodondan 280. kodona kadar ek bir mutasyon ile direnç seviyesi artabilir. Tek başına atovakuon ile tedavi edildiğinde, hastaların %33'ünde nüks saptanmıştır. Atovakuon kombinasyon halinde kullanıldığında ise kür oranları artmaktadır. Fakat atovakuon ve pirimetamin

tedavisinden sonra nükseden birkaç hastada *P. falciparum* sitokrom bc_1 geninde, kodon 268. kodonda mutasyon gösterilmiştir (38).

2.6.3.4. Artemisinin İlaç Grubunda Direnç

Artemisinin en iyi antimalaryal ilaçlardan biri olduğu için, AKT komplike olmayan sıtmanın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Artemisinin ile tedaviden sonra *P. falciparum* klirensinin gecikmesi artemisinin direnci olarak rapor edilmiştir. Artemisinin için birkaç antimalaryal direnç markerından söz edilebilir. *Pf*ATPaz 6 veya *Pf*SERCA (Sarkoplazmik/Endoplazmik retikulum Ca^{+2}- ATPaz) kalsiyum iyonunu taşıyan aktif bir pompadır. Bu proteini kodlayan gen 1. kromozomda bulunur. *Pf*ATPaz 6 geninde, S769N, Y243H, K431E, G110A, A2694T, E623A gibi çeşitli mutasyonlar bildirilmiştir. Bu mutasyonların özellikle artemisinin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (1,39). Yukarıda açıklanan *Pf*mdr1 ve *Pf*mrp markerları da artemisinin direncinde rol oynamaktadır.

Son zamanlarda birçok çalışmada *Pf*K13 polimorfizmleri identifiye edilmiştir. *Pf*K13 artemisinin direnç geni olarak tanımlanmıştır ve parazit klirensinin *in vivo* ve *in vitro* olarak gecikmesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bugüne kadar *P. falciparum* izolatlarının *Pf*K13 geninde 200'den fazla SNP tespit edilmiştir; bunlardan 9 SNP'nin *in vitro* ve *in vivo* verilerle direnç mutasyonları ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır: F446I, N458Y, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L, R561H, C580Y. 26 SNP ise parazitin temizlenmesinde gecikmeye neden olması ile dirence aday mutasyonlar olarak bildirilmiştir. *Pf*K13 mutasyonları Güneydoğu Asya'da daha sık saptanmıştır. Afrika'da hala nadirdir (40). Afrika Bölgesi'nde özellikle Ruanda (R561H) ve Uganda (C469Y ve A675V) ve Eritre'de (R622I) artemisinin kısmi direncinin ortaya çıktığına dair kanıtlar bulunmaktadır (3). Afrika'da en sık görülen allel ise A578S olmuştur (40). Ayrıca, bu mutasyonların tek başına hareket etmediği, çoğu zaman sinerjistik olarak hareket ettiği de ortaya çıkmıştır. Direnç, *Pf*dhfr genindeki anti-folat direnci gibi tek bir gende ardışık mutasyon birikimi yoluyla ortaya çıkabilir veya farklı genlerdeki mutasyonlar da sinerjik olarak hareket edebilir (31).

Mevcut direnç seviyelerinde, artemisinin türevleri hala önemli antimalaryal aktivite sağlar; bu nedenle mevcut veya yeni kombinasyonlarla daha uzun süreli tedaviler veya yeni ilaçlarla kombinasyon (örn. artesunat + pironaridin) tedavide etkili

olabilir. Artemisinin dirençli sıtma vakaları için en iyi tedavileri belirlemeye yönelik çalışmalara acil ihtiyaç duyulmaktadır (9).

2.7. KEMOPROFİLAKSİ

Kemoprofilaksi rejimleri, parazitin edinildiği bölge, direnç durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Tercih edilecek profilaktik ilaçların etkinlikleri açısından belirgin bir fark bulunmamaktadır ayrıca koruyuculuklari %100 olmadığından dolayı ateşli bir hastalık durumunda sıtma açısından değerlendirilme yapılmalıdır. CQ direnci olmayan ülkeler için CQ önerilebilmektedir. CQ dirençli *P. falciparum* olan bölgelere seyahat edeceklere meflokin önerilir. Meflokin direnci de mevcutsa veya şüphe ediliyorsa atovakuon-proguanil veya doksisiklin seçeneklerinden biri önerilebilir. Bu ilaçlar *P. vivax* ve *P. ovale*'nin hipnozoit formlarının relapslarını engelleyemeyeceği için, endemik bölgeye gidenlere primakin gerekebilir fakat primakinin profilaksideki etkinliği konusunda veriler sınırlıdır (17,41).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul İzni, Proje Fonu

Araştırma protokol kodu 2021/374 olan bu çalışma, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi (BEAH) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.08.2021 tarihinde, 2021-15-05 Karar Numarası ile etik olarak uygun görülmüştür. Tez çalışması, TÜBİTAK tarafından ‘‘1002-B Acil Destek Modülü’’ kapsamında 222S036 numaralı proje olarak kabul edilmiş ve desteklenmiştir. (Bkz. EKLER).

3.2. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi

Çalışma için 01.10.2017-01.08.2022 tarihleri aralığında BEAH Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği’nde takip edilen sıtma tanılı hastaların arşivlenen ince yayma ve/veya kalın damla preparatları ve İstanbul Halk Sağlığı Müdürlüğü Sıtma Savaş Birimi’nde sıtma tanısı konulan hastaların ince yayma ve/veya kalın damla preparatları/EDTA’lı tüpte saklanan tam kan örnekleri toplanmıştır. HTT ve/veya mikroskobik değerlendirme ile *P. falciparum* tanısı almış olan 100 hastanın örneği retrospektif olarak planlanan çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin ilk 45 tanesi kalın damla ve/veya ince yayma olup 1’den 45’e kadar, 55 tanesi ise EDTA’lı tam kan örneği olup 46’dan 100’e kadar numaralandırılmıştır. *P. falciparum* dışındaki *Plasmodium* türlerinin saptandığı örnekler çalışma dışı tutulmuştur. Hastaların seyahat ettiği ülkeler retrospektif olarak kayıtlardan araştırılarak kaydedilmiştir.

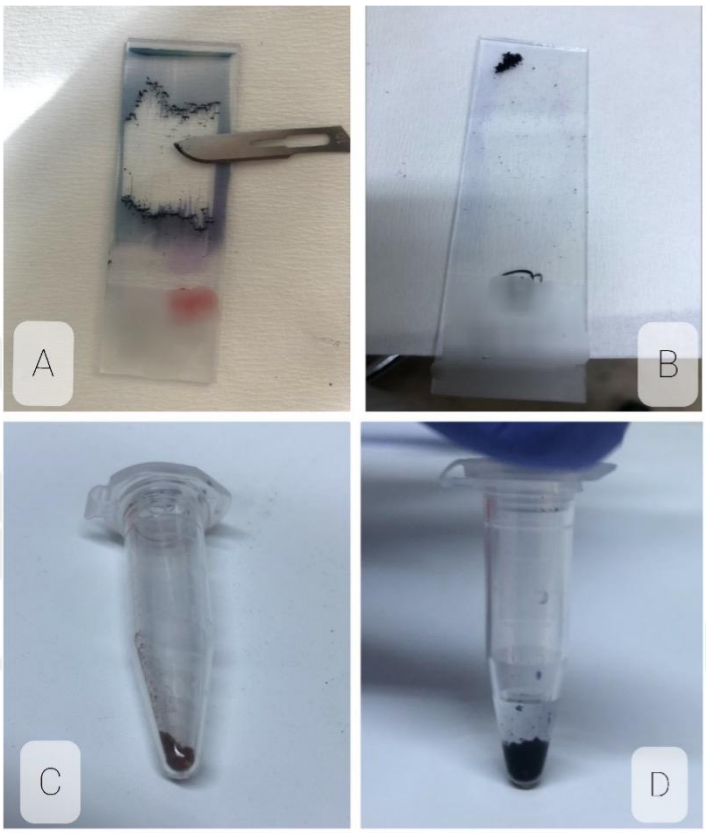
3.3. DNA İzolasyonu

Arşivlenmiş olan ince yayma ve/veya kalın damla preparatları işleme alınmadan önce x100’lük objektif ile ışık mikroskobunda incelendikten sonra lam üzerindeki içerik steril bistüri ucu yardımı ile lam üzerinden kazınmıştır. DNA esktraksiyonu için High Pure PCR template izolasyon kiti (Roche, Fransa) kullanılmış ve üretici firma talimatları doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

1. Lam üzerindeki kazınan içerik 1.5 ml’lik steril santrifüj tüpüne (eppendorf) aktarıldıktan sonra örnek hacmi 200 µl’ye tamamlanacak şekilde distile su eklenmiştir. EDTA’lı tüpte saklanan tam kandan çalışılacak örneklerden ise 200 µl alınarak eppendorf tüpüne eklenmiştir.

2. Ependorf tüplerdeki örnekler üzerine 200 µl binding buffer ve 40 µl proteinase K eklendikten sonra kapağı kapatılarak hemen vortekslenmiş ve +70˚C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

3. Örnek üzerine 100 µl isopropanol eklendikten sonra yeniden 10 saniye vortekslenmiştir.



Şekil 3.1: Lam üzerindeki örneğin edilde edilmesi A: Lam üzerindeki içerik steril bistüri ucu yardımı ile lam üzerinden kazınır. B-C: Lam üzerinde biriken içerik santrifüj tüpüne aktarılır, örnek kalıntısının kalmamasına özen gösterilir. D: Örnek hacmi 200 µl'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir ve DNA izolasyonuna hazır hale gelir.

4. Tüpteki içeriğin tamamı filtreli silika toplama tüpüne (high pure filter tube) aktarılmıştır, kapağı kapatılarak 8.000xg hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtreli silika tüpünün yerleştiği toplama tüpü içindeki atık ile atılmıştır. Silika tüp temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

5. 500 µl inhibitör removal buffer eklenip kapağı kapatılarak 8.000xg hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtreli silika tüpün yerleştiği toplama tüpü, içindeki atık ile beraber atılmıştır. Silika tüp temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

6. 500 µl wash buffer eklenip kapağı kapatılarak 8.000xg hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtreli silika tüpün yerleştiği toplama tüpü içindeki atık ile beraber atılmıştır. Silika tüp temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

7. İkinci kere 500 µl wash buffer eklenip kapağı kapatılarak 8.000xg hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtreli silika tüpün yerleştiği toplama tüpünün içindeki atık atıldıktan sonra silik tüp yeniden aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

8. Filtreli silika toplama tüpünün kapağı kapatılarak 13.000xg hızda 10 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılarak silika tüp yeni bir eppendorf tüpe yerleştirilmiştir.

9. +70˚C'ye ısıtılmış 200 µl elution buffer eklenip kapağı kapatılarak 8.000xg hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Silika tüp atılmıştır. İzole edilen DNA -20˚C'de saklanmıştır.

3.4. Real-Time PCR

İzolasyon sonrası elde edilen DNA'da, yüksek hassasiyet gücü olan minor groove binder (MGB) probe sistemi ile dizayn edilmiş *P. falciparum* tür spesifik primerler kullanılarak tür tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılması planlanan primer ve MGB probe dizileri sentetik oligo dizayn yöntemi ile çalışma öncesinde test edilmiş ve kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Aynı zamanda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edilen pozitif kontrol DNA örneği kullanılarak real-time PCR protokolü test edilmiş ve kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

PCR aşamasından önce PCR için gerekli malzemeler hazırlanmıştır.

[Örnek sayısı (N)+Pozitif Kontrol (PK)+ Negatif Kontrol (NK)+pipet hatası] x 15 µl miks formülü ile pipet hatası da göz önünde bulundurularak, her bir örnek reaksiyonu için 2 µl primer prob, 10 µl mastermix, 3 µl su (toplam 15 µl) olmak üzere reaktan hazırlanması planlanmıştır.

Tablo 3.1. *P. falciparum* Tür Spesifik Primerler

Forward Primer:	CCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTA
Reverse Primer	AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
MGB Probe:	FAM-TCTAAAAGTCACCTCGAAAGA-MGBNFQ

1. PCR için gerekli olan dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ ve enzimleri içeren Xpert Taq Mastermix (2x) solüsyonu oda sıcaklığında çözülmüştür. Yukarıdaki formül ile hesaplanarak (N+PK+NK+pipet hatası) 100 örnek için reaktan hazırlanmıştır.

Primer prob …… 2 µl x 110

Mastermix ……. 10 µl x 110

Distile su ……... 3 µl x110

2. Miks tüpünde hazırlanan primer prob, mastermix ve su karışımından 15 µl çekilerek 100 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır.

3. 15 µl PCR bileşeni içeren her bir PCR reaksiyon tüpüne, izole edilen DNA'lardan 5 µl eklenmiştir. Pozitif kontrol tüpüne *P. falciparum* DNA'sından 5 µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

4. PCR cihazına yerleştirmeden önce kısa süreli olarak santrifüj edilmiştir.

5. PCR karışımı ve izole edilen *Plasmodium* DNA'sı eklenerek oluşturulan toplam 20 µl hacimli tüplerden *P. falciparum*'un saptanması için real-time PCR yöntemi kullanılmıştır. Tüpler Biorad C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazına yüklenmiştir. Cihaz üreticisinin talimatlarına uygun şekilde ayarlamalar yapılarak cihaz çalıştırılmıştır.

1. Basamak: Denatürasyon …… 95°C'de 1 dakika

2. Basamak: Annealing (bağlanma) ……... 55°C'de 2 dakika

3. Basamak: Ekstansiyon (uzama) …… 72°C'de 2 dakika

Real-time PCR işlemi sonrasında erime eğrisi analizi ile *P. falciparum* olduğu kanıtlanan örnekler antimalaryal ilaç direnç markerları için test edilmek üzere saklanmıştır.

3.5. Nested PCR ve Klasik PCR

3.5.1. İlaç Direnci ile İlişkili Genlerin Primerlerinin Sulandırılması

Antimalaryal ilaç direnci markerlarından *Pf*crt'deki SNP'ler için bakılması planlanan 74, 75, 76. lokusların primerleri; *Pf*mdr1'deki SNP'ler için bakılması planlanan 86, 184, 1034, 1042, 1246. lokusların primerleri ve *Pf*K13 primerleri temin edilmiştir. Temin edilen firmanın önerileri doğrultusunda primerlerin sulandırma aşaması tamamlanmıştır.

1. Her oligo tüpüne (19 adet oligo tüpü) üretici firmanın o primer için belirlemiş olduğu miktarda steril su eklenmiştir ve volüm, her tüp için 100 µM'e tamamlanmıştır.

2. Çalışma aşamalarında oligo tüplerindeki kontaminasyonu da azaltmak amacıyla 10 µM'lük 2 adet farklı tüp hazırlanması planlanmıştır ve her oligo tüp için 2'şer adet eppendorf tüpü hazırlanmıştır.

3. 10 µM için 10 kat sulandırma yapılarak her eppendorf tüpüne 30 µM primer ve 270 µM steril su eklenmiştir. Kapakları kapatılarak kısa bir süre santrifüj edildikten sonra çalışmaya başlanana kadar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.2. Antimalaryal ilaç direnci için kullanılan primerler (2)

Gen/Lokus	Aşama	Primer	Sekans
*Pf*crt (74,75,76)	Nested 1	CRT1-F	CCGTTAATAATAAATACACGCAG
		CRT1-R	CGGATGTTACAAAACTATAGTTACC
	Nested 2	CRT2-F	TGTGCTCATGTGTTTAAACTT
		CRT2-R	CAAAACTATAGTTACCAATTTTG
*Pf*mdr1 (86,184)	Nested 1	MDR1–1F	TTAAATGTTTACCTGCACAACATAGAAAATT
		MDR1–1R	CTCCACAATAACTTGCAACAGTTCTTA
	Nested 2	MDR1–2F	TGTATGTGCTGTATTATCAGGA
		MDR1–2R	CTCTTCTATAATGGACATGGTA
*Pf*mdr1 (1034,1042)	Nested 1	1042-A	GTCGAAAAGACTATGAAACGTAGA
		1042-C	CTCAAATGATAATTTTGCAT
	Nested 2	1042-B	GATCCAAGTTTTTTAATACA
		1042-C	CTCAAATGATAATTTTGCAT
*Pf*mdr1 (1246)	Nested 1	1246-A	GTGGAAAATCAACTTTTATGA
		1246-B	TTAGGTTCTCTTAATAATGCT
	Nested 2	1246-C	GACTTGAAAAATGATCACATT
		1246-D	GTCCACCTGATATGCTTTT
*Pf*K13	Nested 1	K13–1-1	CGGAGTGACCAAATCTGGGA
		K13–1-2	GGGAATCTGGTGGTAACAGC
	Nested 2	K13–2-1	GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA
		K13–2-2	GCCAAGCTGCCATTCATTTG

3.5.2. Klasik PCR

*Pf*crt için CRT1-F ve CRT1-R primerleri ile nested 1.aşama PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir fakat, jelde yürütme sonrası sağlıklı bant

görünümleri elde edilememiş olduğundan *Pf*crt için doğrudan CRT2-F ve CRT2-R primerleri kullanılarak klasik PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

*Pf*K13 için K13–1-1 ve K13–1-2 primerleri ile nested 1. aşama PCR ürünü 2063 bp (2) olduğu için doğrudan K13–2-1 ve K13–2-2 primerleri kullanılarak klasik PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.1. *Pf*crt Gen Bölgesi

1. İnce yayma ve/veya kalın damla preparat örnekleri ve EDTA'lı kan örneklerinin toplamı olan 100 örnek için pipet hatası da hesaplanarak 110 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer ……	2 µl x 110 = 220 µl
Reverse primer ……	2 µl x 110 = 220 µl
Fast Start Enzim……...	12,5 µl x 110 = 1375 µl
Distile su ……...	7,5 µl x 110 = 825 µl

2. Santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 20 µl çekilerek 100 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır. Her bir PCR reaksiyon tüpüne, izole edilen DNA'lardan 5 µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

3.5.2.2. *Pf*K13 Gen Bölgesi

1. İnce yayma ve/veya kalın damla preparat örnekleri ve EDTA'lı kan örneklerinin toplamı olan 100 örnek için pipet hatası da hesaplanarak 110 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer ……	2 µl x 110 = 220 µl
Reverse primer …….	2 µl x 110 = 220 µl
Fast Start Enzim ……...	12,5 µl x 110 = 1375 µl
Distile su…….....	7,5 µl x 110 = 825 µl

2. Santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 20 µl çekilerek 100 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır. Her bir PCR reaksiyon tüpüne, izole edilen DNA'lardan 5 µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

3.5.3. Nested 1. Aşama PCR

*Pf*mdr1 (86,184) için MDR1-1F ve MDR1-1R primerleri, *Pf*mdr1 (1034,1042) için 1042-A ve 1042-C primerleri, *Pf*mdr1 (1246) için 1246-A ve 1246-B primerleri ile nested 1. aşama PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. İnce yayma ve/veya kalın damla preparatından izole edilen 45 örnek için pipet hatası da göz önüne alınarak 50 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır. DNA miktarının yoğunlaştırılması adına su eklenmemiştir.

Forward primer …… 2 µl x 50 = 100 µl

Reverse primer …… 2 µl x 50 = 100 µl

Fast Start Enzim ……... 12,5 µl x 50 = 625 µl

2. EDTA'lı kan tüplerinden izole edilen 55 örnek için pipet hatası da göz önüne alınarak 60 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer …… 2 µl x 60 = 120 µl

Reverse primer …… 2 µl x 60 = 120 µl

Fast Start Enzim ……... 12,5 µl x 60 = 750 µl

Distile su …….....3,5 µl x 60 = 210 µl

3. İnce yayma ve/veya kalın damla preparatından izole edilen örnekler için santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 16,5 µl çekilerek 45 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır.

4. EDTA'lı kan tüplerinden izole edilen örnekler için santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 20 µl çekilerek 55 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır.

5. PCR bileşeni içeren her bir PCR reaksiyon tüpüne, izole edilen DNA'lardan 5 µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

6. PCR cihazına yerleştirmeden önce kısa süreli olarak santrifüj edilmiştir.

7. PCR karışımı ve izole edilen *P. falciparum* DNA'sı eklenerek oluşturulan tüpler Biorad C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazına yüklenmiştir.

Her bir direnç markerı için farklı amplifikasyon reaksiyonu basamakları uygulanmıştır (**Tablo 3.3**).

Tablo 3.3. Nested 1. Aşama PCR (*Pf*mdr1) /Klasik PCR (*Pf*crt, *Pf*K13 Amplifikasyon Reaksiyonu Basamakları

Nested-1(N)/ Klasik(K)	CRT-2(K)	MDR1-1(N)	1042-A/C(N)	1046-A/B(N)	K13-2(K)
1.Basamak (Başlangıç Denatürasyon)	95°C'de 3 dak.	95°C'de 3 dak.	95°C'de 3 dak.	95°C'de 3 dak.	95°C'de 3 dak.
2.Basamak (Denatürasyon)	95°C'de 15 sn	95°C'de 15 sn	95°C'de 15 sn	95°C'de 15 sn	95°C'de 15 sn
3.Basamak (Bağlanma)	52°C'de 15 sn	56°C'de 15 sn	54°C'de 15 sn	53°C'de 15 sn	52°C'de 15 sn
4.Basamak (Uzama)	72°C'de 3 sn	72°C'de 3 sn	72°C'de 3 sn	72°C'de 3 sn	72°C'de 3 sn
5.Basamak	2-4 Basamakların tekrarı (40 döngü)	2-4 Basamakların tekrarı (40 döngü)	2-4 Basamakların tekrarı (40 döngü)	2-4 Basamakların tekrarı (40 döngü)	2-4 Basamakların tekrarı (40 döngü)
6.Basamak (son uzama)	72°C'de 3 dak.	72°C'de 3 dak.	72°C'de 3 dak.	72°C'de 3 dak.	72°C'de 3 dak.
7.Basamak	Reaksiyon, ısının 4°C'ye düşürülmesiyle tamamlanmıştır.				

3.5.4. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Analizi

1. TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponunun hazırlanması:

Adım 1: 93,05 gram EDTA disodyum tuzu tartılarak (MW=372.24 g/mol), 400 mililitre (ml) deiyonize suda çözdürülmüştür. pH sodyum hidroksit (NaOH) ile ayarlanmıştır, EDTA, pH'sı yaklaşık 8'e ayarlanana kadar tamamen çözelti haline gelmemektedir. Çözelti 500 ml nihai hacme kadar doldurulmuştur. 500 ml'lik, 0,5 M EDTA stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Adım 2: 242 gram Tris-bazı (MW = 121,14 g/mol) tartılmıştır ve yaklaşık 700 ml deiyonize suda çözdürülmüştür. Dikkatlice 57,1 ml %100 asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) eklenmiştir. Solüsyon 1 litrelik son hacme ayarlanmıştır. 1 litrelik, 50x TAE tamponu hazırlanmıştır. Bu tamponun pH'sı yaklaşık 8,5 olmalıdır. Jelde kullanılan 1x'lik TAE tamponu hazırlamak için, stok solüsyonu deiyonize suda 50 kat

seyreltilir (20 ml 50x'lik TAE solüsyonu, deiyonize su ile 1 litrelik hacme tamamlanır). Stok solüsyonu kullanılana kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

2. Jelin hazırlanması: %2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 250 ml hazırlanması planlandığı için 5 mg agaroz tartılmıştır. 1x'lik TAE tamponu ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. Mikrodalga fırında eritilmiştir. Eritilen solüsyona 1,5 µl Greenview DNA gel stain eklenmiştir. Hazırlanmış agaroz jel solüsyonu, elektroforez kabına taraklar yerleştirildikten sonra dökülmüştür ve oda ısısında katılaşması beklenmiştir. Daha sonra tarak çıkarılarak ve 1x'lik TAE tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankına jel yerleştirilmiştir.

3. Bir parafilm üzerinde her bir örnek için ayrı ayrı 2 µl loading dye ve 5 µl PCR ürünü karıştırıldıktan sonra pipetle çekilerek elektroforez cihazındaki jel kuyucuklara boşaltılmıştır.

4. Jeldeki birinci kuyucuğa 50 µg DNA Ladder yüklenmiştir.

5. Elektroforez işlemi 100 voltta yaklaşık 1,5-2 saat sürdükten sonra, jeldeki PCR ürünlerine ait bantlar UV ışık altında görüntüleme sistemiyle bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.5.5. Nested 2. Aşama PCR Amplifikasyonu

Çalışmada kullanılması planlanan nested 2. aşama primerleri ile seçilen birkaç yayma ve EDTA'lı örneklerin nested 1.aşama PCR amplifikasyon ürünleri çalışma öncesinde test edilmiş ve kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Nested 2. aşama PCR amplifikasyonu öncesi PCR için gerekli malzemeler oda sıcaklığında çözünmüştür. Bu aşamada PCR için gerekli olan dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ ve enzimleri içeren fast start enzim solüsyonu kullanılmıştır.

3.5.5.1. *Pf*mdr1 (86,184) Gen Bölgesi

*Pf*mdr1 (86,184) için MDR1-2F ve MDR1-2R primerleri kullanılarak nested 2. aşama PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. İnce yayma ve/veya kalın damla preparatından izole edilen 45 örnek için pipet hatası da hesaplanarak 50 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer ……	2 µl x 50 = 100 µl
Reverse primer ……	2 µl x 50 = 100 µl
Fast Start Enzim ……...	12,5 µl x 50 = 625 µl
Distile su ……...	7,5 µl x 50= 375 µl

2. İnce yayma ve/veya kalın damla preparatı örnekleri için santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 24 µl çekilerek 45 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır. Her bir PCR reaksiyon tüpüne, nested 1. aşama PCR amplifikasyon ürünlerinden 1'er µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

3. EDTA'lı kan tüplerinden elde edilen 55 örnek için pipet hatası da hesaplanarak 60 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer …… 2 µl x 60 = 120 µl

Reverse primer …… 2 µl x 60 = 120 µl

Fast Start Enzim ……... 12,5 µl x 60 = 750 µl

Distile su ……..... 3,5 µl x 60 = 210 µl

4. EDTA'lı kan tüplerinden elde edilen örnekler için santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 20 µl çekilerek 55 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır. Her bir PCR reaksiyon tüpüne, izole edilen DNA'lardan 5 µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

3.5.5.2. *Pf*mdr1 (1034,1042) Gen Bölgesi

*Pf*mdr1 (1034,1042) için 1042-B ve 1042-C primerleri kullanılarak nested 2.aşama PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. İnce yayma ve/veya kalın damla preparat örnekleri ve EDTA'lı kan örneklerinin toplamı olan 100 örnek için pipet hatası da hesaplanarak 110 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer …… 2 µl x 110 = 220 µl

Reverse primer ……. 2 µl x 110 = 220 µl

Fast Start Enzim ……... 12,5 µl x 110 = 1375 µl

Distile su ……..... 7,5 µl x 110 = 825 µl

2. Santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 20 µl çekilerek 100 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır. Her bir PCR reaksiyon tüpüne, izole edilen DNA'lardan 5 µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

3.5.5.3. *Pf*mdr1 (1246) Gen Bölgesi

*Pf*mdr1 (1246) için 1246-C ve 1246-D primerleri kullanılarak nested 2.aşama PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. İnce yayma ve/veya kalın damla preparatından izole edilen 45 örnek için pipet hatası da hesaplanarak 50 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer …… 2 µl x 50 = 100 µl

Reverse primer …… 2 µl x 50 = 100 µl

Fast Start Enzim ……... 12,5 µl x 52 = 650 µl

Distile su ……..... 7,5 µl x 52= 390 µl

2. İnce yayma ve/veya kalın damla preparatı örnekleri için santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 24 µl çekilerek 45 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır. Her bir PCR reaksiyon tüpüne, nested 1.aşama PCR amplifikasyon ürünlerinden 1'er µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

3. EDTA'lı kan tüplerinden elde edilen 55 örnek için pipet hatası da hesaplanarak 60 örnek hacimli reaktan santrifüj tüpünde hazırlanmıştır.

Forward primer …… 2 µl x 60 = 120 µl

Reverse primer …… 2 µl x 60 = 120 µl

Fast Start Enzim ……... 12,5 µl x 60 = 750 µl

Distile su ……..... 3,5 µl x 60 = 210 µl

4. EDTA'lı kan tüplerinden elde edilen örnekler için santrifüj tüpünde hazırlanan karışımdan 20 µl çekilerek 55 adet PCR reaksiyon tüplerine dağıtılmıştır. Her bir PCR reaksiyon tüpüne, izole edilen DNA'lardan 5 µl eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri sıkıca kapatılmıştır.

Beş farklı direnç marker gen bölgeleri için hazırlanan PCR reaksiyon tüpleri farklı seferlerde Biorad C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazına yüklenmiştir.

Nested 1 aşamasındaki gibi elektroforez aşamaları sonrası jeldeki PCR ürünlerine ait bantlar UV ışık altında görüntüleme sistemiyle bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Başarılı amplifikasyon gözlenen örnekler ileri aşamalarda kullanılmak üzere -20˚C'de saklanmıştır.

3.6. Sekans Analizi

Başarılı amplifikasyonların jel-elektroforez yöntemi ile gösterilmesinden sonra her bir örnek 20 µl hacimde olacak şekilde Sanger sekans yöntemi ile analiz edilmek üzere hazır hale getirilmiştir. Bu aşamadan sonra örneklerin sekanslama işlemi Macrogen (Seoul, Kore) firması laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Sekans verilerinin tarafımıza iletilmesinden sonra SBÜ Hamidiye tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında GenBank NCBI sisteminde kayıtlı referans izolat olan

P. falciparum clone 3D7 nolu izolat ile kıyaslamalı SNP analizi gerçekleştirilmiştir. Yabanıl tip (wild-type) olarak adlandırılan referans izolata ait sekans verisi ücretli bir biyoinformatik yazılımı olan ve Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında kullanım lisans hakkı bulunan Geneious R9 programı sayesinde incelenmiştir. Sekans verilerinin elde edilmesi ve ilgili yazılımın kullanımı ile çalışma kapsamında bulunan örneklerin (*Pf*crt, *Pf*mdr1, *Pf*K13 refseq verileri kullanılarak) hedef gen bölgeleri kıyaslanmış ve mevcut mutasyonlar aminoasit düzeyinde tespit edilmiştir.

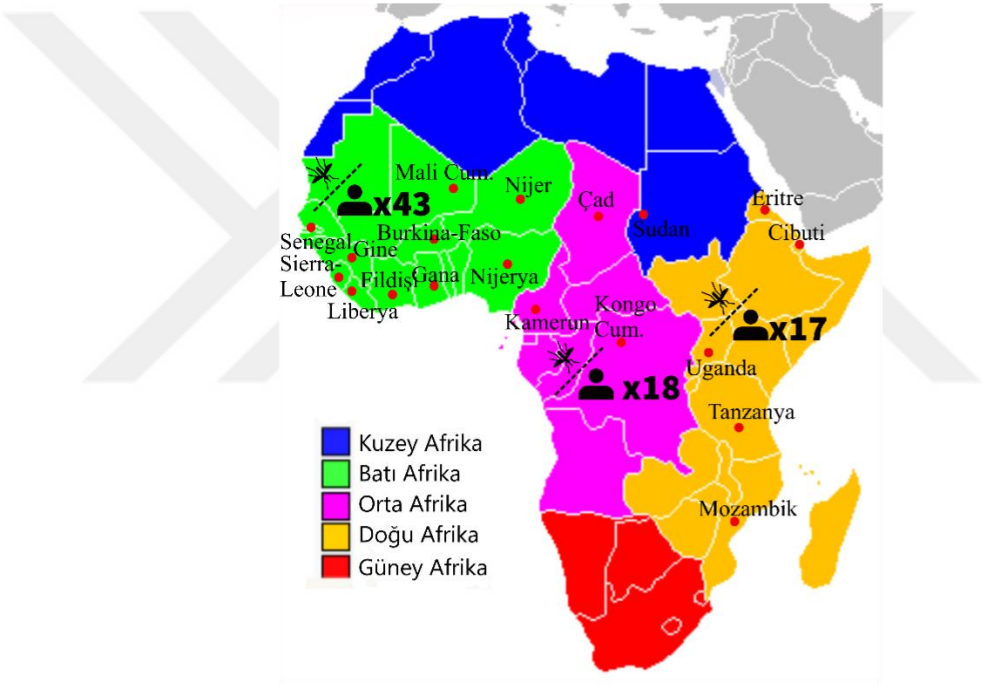
3.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (sıklık, oran) yanısıra niteliksel veriler için Fisher–Freeman Halton ($p<0.05$) ve Ki Kare testi ($p<0.01$) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Dağılımı

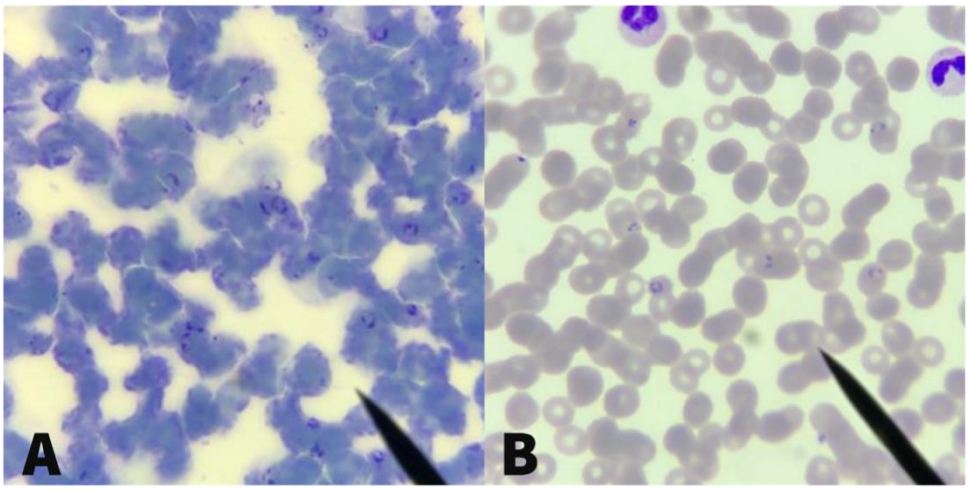
HTT ve/veya mikroskobik değerlendirme ile *P. falciparum* tanısı almış olan ve arşivlenen örneklerin ilk 45 tanesi ince yayma ve/veya kalın damla örnekler olup 1'den 45'e kadar, 55 tanesi ise EDTA'lı tam kan örneği olup 46'dan 100'e kadar numaralandırılmıştır. Hastaların seyahat ettiği ülkeler retrospektif olarak kayıtlardan araştırılmıştır. Örnekleri incelenen 78 hastanın seyahat ettiği ülke verisine ulaşılabilmiştir. Hastaların 43'ünün Batı Afrika, 18'inin Orta Afrika, 17'sinin de Doğu Afrika ülkeleri olmak üzere sadece Afrika'ya seyahatlerinin olduğu öğrenilmiştir. Afrikaya seyahat ettiği bilinen 22 hastanın ise ülke bilgisine ulaşılamamıştır.



Şekil 4.1. Afrika Kıtası Örneklerin Dağılımı

4.2. Mikroskobi Bulguları

İnce yayma ve/veya kalın damla olarak saklanmış olan Giemsa boyalı örnekler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi (x100) altında incelenmiştir. İnce yayma preparatlarında eritrositler içinde, yer yer tek hücrede 2 tane de olabilen taşlı yüzük hücre görünümünde trofozoitler gözlenmiştir. İnce yayma preparatlardaki parazit görüntüleri Şekil 4.2.'de görülmektedir.

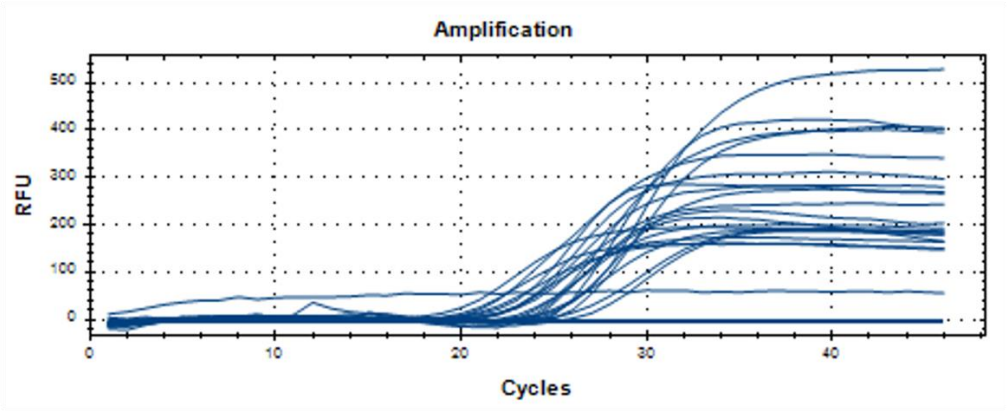


Şekil 4.2. Mikroskopi örneği. İnce yayma preparatlarında *P. falciparum* formları (Giemsa), Parazit yükünün daha fazla (A) ve daha az (B) olduğu yaymalardan örnekler

En eskisi 4 yıl öncesine ait olan preparatlar arasında bazı preparatlarda parazit yükünün daha fazla bazılarında ise daha az olduğu gözlenmiştir.

4.3. Real-Time PCR Analiz Bulguları

Çalışmada kullanılması planlanan *P. falciparum* tür spesifik primerler ve MGB probe dizileri sentetik oligo dizayn yöntemi ile çalışma öncesinde test edilmiştir, aynı zamanda pozitif kontrol DNA örneği kullanılarak real-time PCR protokolü test edilerek kullanılabilir oldukları belirlenmiştir. Real-time PCR işlemi uygulanan 55 EDTA'lı örneğin amplifikasyon eğrilerinde Cq değerleri 15-25 arasında bulunmuştur. Yayma şeklinde olan 45 örneğin 8 tanesinde (%17,7) amplifikasyon sinyali elde edilememiştir. Kan yayma örneklerinde real-time PCR'ın duyarlılığı %82,2 olarak saptanmıştır. Ancak real-time PCR ile amplifiye edilemeyen 8 örnek nested PCR yöntemiyle ile elde edilebilmiştir. EDTA'lı örneklerimizin hepsinde ise amplifikasyon oluşmuştur (PCR duyarlılığı %100).



Şekil 4.3. *P. falciparum* tür spesifik primerler ile belirlenen amplifikasyon eğrileri

Amplifiye edilebilen 37 yayma ve 55 EDTA'lı örneğin Cq değerleri 19-35 arasında değişmekteydi.

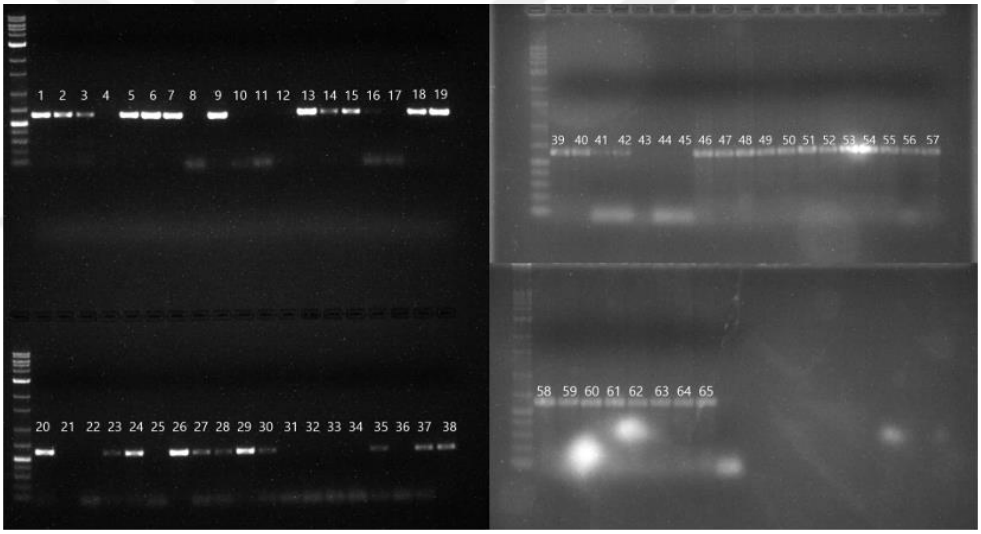
4.4. Nested PCR Analiz Bulguları

4.4.1. Nested 1. Aşama PCR Analiz Bulguları

*Pf*mdr1 (86,184) için MDR1-1F ve MDR1-1R primerleri, *Pf*mdr1 (1034,1042) için 1042-A ve 1042-C primerleri, *Pf*mdr1 (1246) için 1246-A ve 1246-B primerleri kullanılarak 100 örneğin nested 1. aşama PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir ve PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

***Pf*mdr1 (86,184) Nested 1. Aşama PCR Analiz Bulguları:**

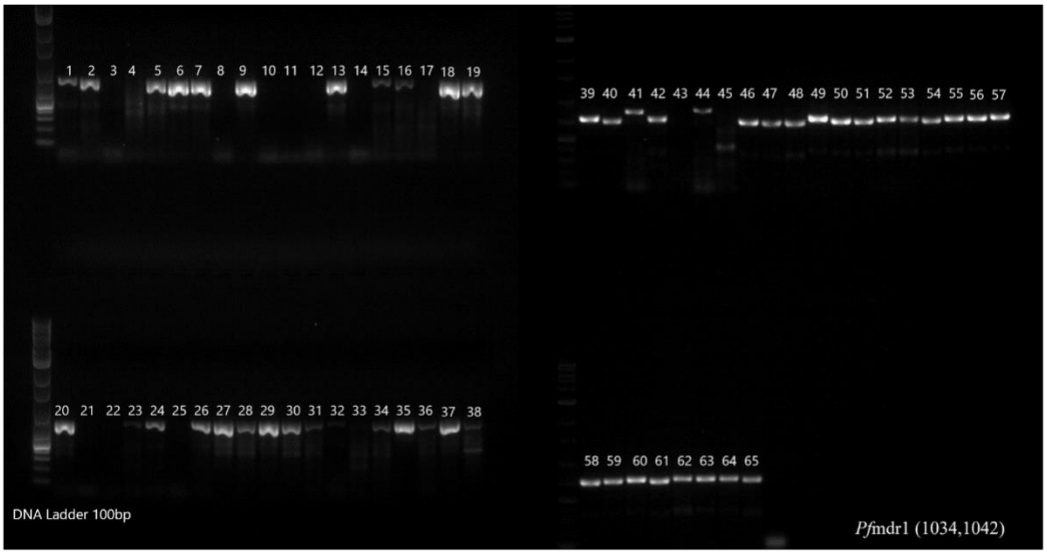
*Pf*mdr1 (86,184) için nested 1. aşama PCR ürününde bant 612 bp'dir. Nested 1.aşamada EDTA'lı örneklerin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir fakat yayma örneklerinden 17 tanesinde gözle görülür bant oluşmamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *Pf*mdr1(86,184) nested 1.aşama PCR ürününün jel-elektroforez ile görüntülenmesi (DNA ladder 100 bp)

***Pf*mdr1 (1034,1042) Nested 1. Aşama PCR Analiz Bulguları:**

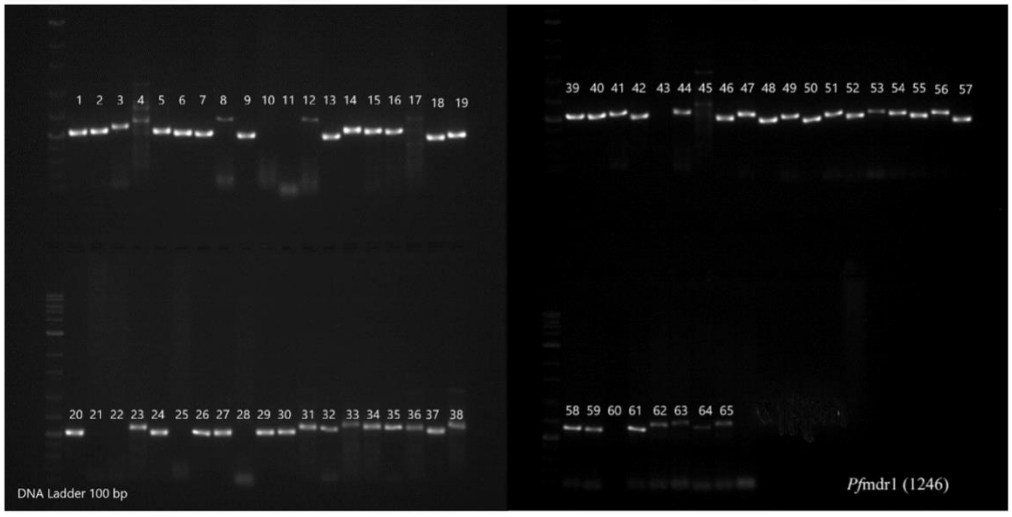
*Pf*mdr1 (1034,1042) için nested 1.aşama PCR ürününde bant 390 bp'dir. Nested 1.aşamada EDTA'lı örneklerin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir fakat yayma örneklerinden 13 tanesinde gözle görülür bant oluşmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. *Pf*mdr1(1034,1042) nested 1.aşama PCR ürününün jel-elektroforez ile görüntülenmesi

***Pf*mdr1 (1246) Nested 1. Aşama PCR Analiz Bulguları:**

*Pf*mdr1 (1246) için için nested 1.aşama PCR ürününde bant 410 bp'dir. Nested 1.aşamada 60 nolu örnek dışında EDTA'lı örneklerin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir fakat yayma örneklerinden 9 tanesinde gözle görülür bant oluşmamıştır (Şekil 4.6).



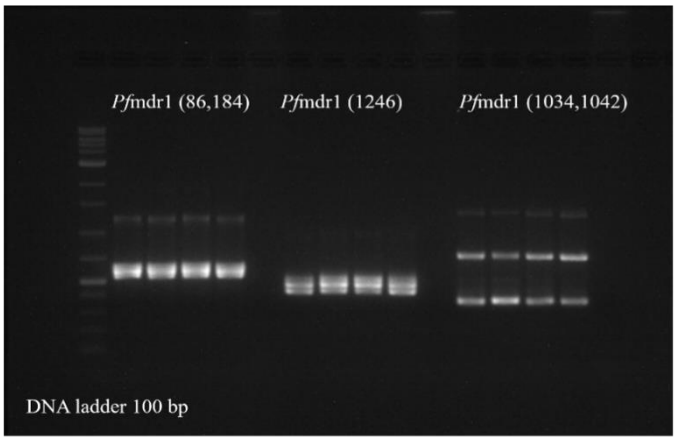
Şekil 4.6. *Pf*mdr1(1246) nested 1. aşama PCR ürününün jel-elektroforez ile görüntülenmesi

4.4.2. Nested 2.Aşama PCR Analiz Bulguları

***Pf*mdr1 (86,184) Nested 2. Aşama PCR Analiz Bulguları:**

*Pf*mdr1 (86,184) için MDR1-2F ve MDR1-2R primerleri, *Pf*mdr1 (1034,1042) için 1042-B ve 1042-C primerleri, *Pf*mdr1 (1246) için 1246-C ve 1246-D primerleri ile 1.aşama nested PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak nested 2.aşama PCR

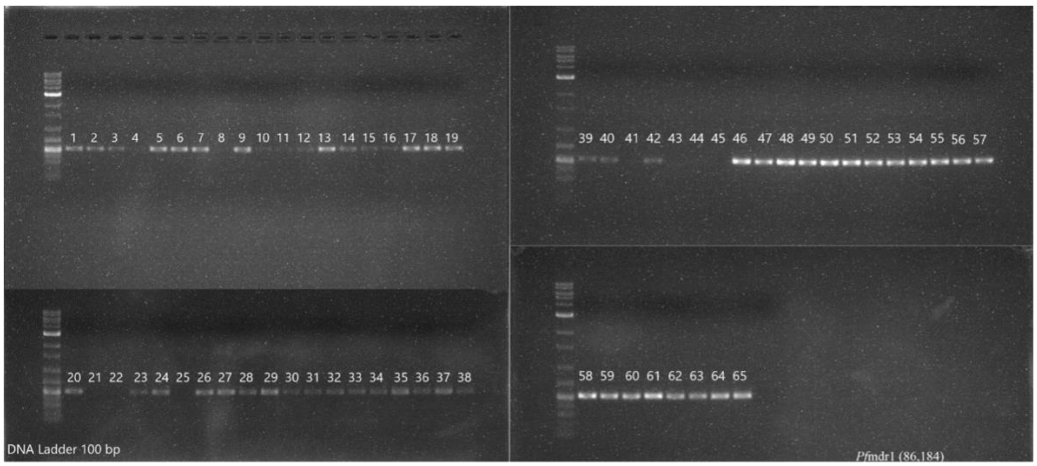
amplifikasyonu rastgele EDTA'lı 4 örnek ile denenmiştir ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. *Pf*mdr1 (86,184), *Pf*mdr1 (1034,1042), *Pf*mdr1 (1246)'de 1.aşama nested PCR ürünleri ile 2.aşama nested PCR denemesi

*Pf*mdr1 (86,184)'nin bu rastgele örnekler ile denenmesinde üstte silik bant görünümleri oluşmuştur. Yeniden aynı numaralı örneklerin hem 1.aşama nested PCR ürünleri hem de DNA numuneleri ile nested 2.aşama PCR'ı çalışılmıştır. DNA ile çalışılan örneklerde üstte silik bant görünümü gözlenmediğinden 55 EDTA'lı örneğin 2.aşama nested PCR'ları 1.aşama PCR ürünleri ile değil DNA numuneleri ile çalışılmıştır. Yayma örneklerinde ise 1.aşama nested PCR ürünleri kalıp olarak kullanılmıştır.

*Pf*mdr1 (86,184)'in 2.aşama nested PCR ürününde bant 460 bp'dir. Nested 2. aşamada EDTA'lı örneklerin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir fakat yayma örneklerinden 9 tanesinde gözle görülür bant oluşmamıştır. İlk aşama nested jel-elektroforez görüntüsünde 17 örnekte bant oluşumu yok iken, 10,11,12,17,31,32,33,34,36 nolu bu 9 örnekte 2.aşama nested ile bant görünümü elde edilmiştir. 41 nolu örnek ise ilk aşama PCR'da silik bant vermiş olmakla birlikte son aşama PCR'da bant oluşturmamıştır. Nihai olarak 2. aşama nested ile 9 örnekte bant oluşmamıştır. (Şekil 4.8)

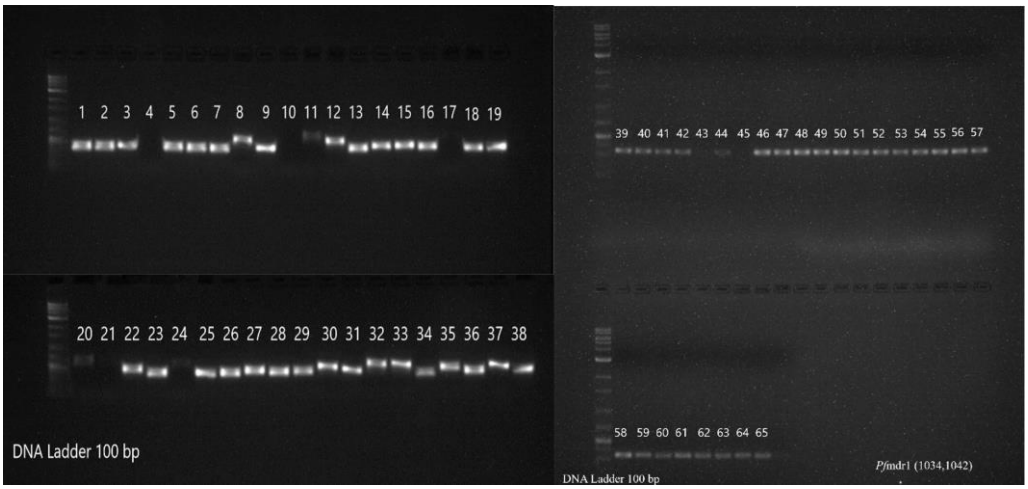


Şekil 4.8. *Pf*mdr1 (86,184)'in 2.aşama nested PCR jel-elektroforez görüntüsü

*Pf*mdr1 (1034,1042) Nested 2. Aşama PCR Analiz Bulguları:

*Pf*mdr1 (1034,1042) için 1042-B ve 1042-C primerleri ile 1.aşama nested PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak nested 2.aşama PCR amplifikasyonu rastgele EDTA'lı 4 örnek ile denenmiştir ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. *Pf*mdr1 (1034,1042)'nin rastgele örnekler ile 1.aşama nested PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak nested 2.aşama PCR denemesinde üç şerit şeklinde farklı bp değerlerinde bant görünümleri oluşmuştur (Bkz. Şekil 4.7). İlk aşama PCR ürünleri kalıp olarak kullanıldığı için 1042-A ve 1042-C primerlerinin artmış olabileceği ve 2. aşama PCR (seminested PCR) için 1042-B ve 1042-C primerleri de eklenince A-B/B-C/A-C bölgelerinin amplifikasyon bantlarının bu üç şeridi oluşturmuş olabileceği düşünülmüştür. *Pf*mdr1 (1034,1042) PCR'ında hem yayma hem de EDTA'lı örneklerde, 1042-B ve 1042-C primerleri ile birlikte kalıp olarak 1. aşama nested PCR ürünleri kullanılmamış sadece DNA ile çalışılmıştır.

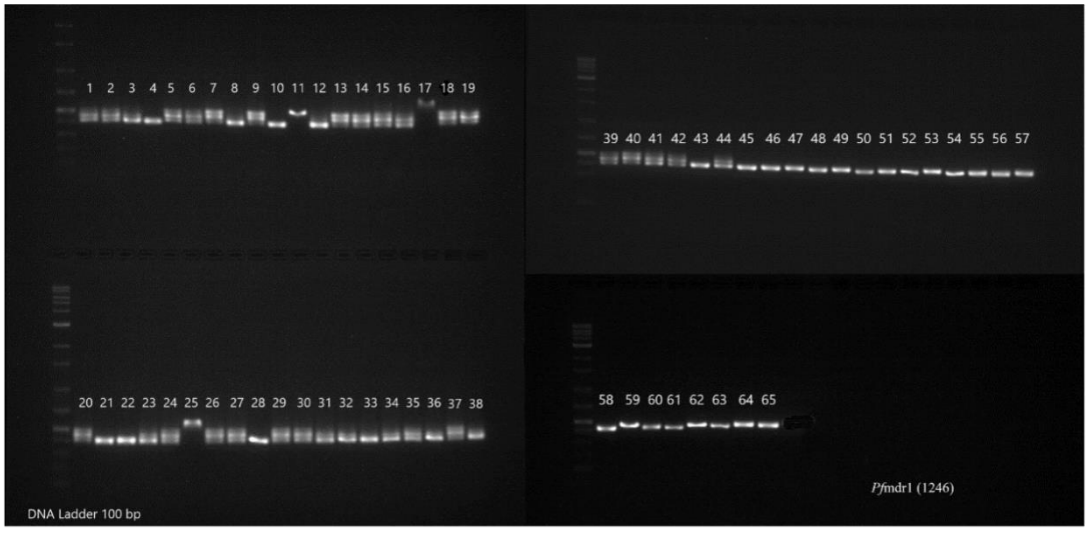
*Pf*mdr1 (1034,1042)'in PCR ürününde bant 318 bp'dir. EDTA'lı örneklerin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir fakat yayma örneklerinden 6 tanesinde gözle görülür bant oluşmamıştır. İlk aşama nested jel-elektroforez görüntüsünde 3,8,11,12,14,17,22,25 nolu örneklerde bant oluşumu gözlenmemiş iken 2. PCR'da bu 7 örnekte bant görünümü elde edilmiştir (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. *Pf*mdr1 (1034,1042)'in 2.aşama nested PCR jel-elektroforez görüntüsü

*Pf*mdr1 (1246) Nested 2. Aşama PCR Analiz Bulguları:

*Pf*mdr1 (1246) için 1246-C ve 1246-D primerleri ile 1. aşama nested PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak nested 2.aşama PCR amplifikasyonu rastgele EDTA'lı 4 örnek ile denenmiştir ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Bu PCR denemesinin jel-elektroforez görüntüsünde tek şerit şeklinde bant görünümleri oluşmuştur (Bkz. Şekil 4.8). Fakat EDTA'lı örneklerde yayma örneklerine nispeten DNA yükü fazla olduğu için ve 1.aşama nested PCR ile amplifikasyon bölgeleri daha da artmış olacağından; EDTA'lı örnekler için bu aşamada kalıp olarak DNA numuneleri, yayma örnekleri için ise kalıp olarak 1. aşama nested PCR amplifikasyon ürünleri kullanılmıştır.



Şekil 4.10. *Pf*mdr1 (1246)'in 2.aşama nested PCR jel-elektroforez görüntüsü

*Pf*mdr1 (1246)'in PCR ürününde bant 372 bp'dir. Hem EDTA'lı hem de yayma örneklerin 2. aşama PCR ürünlerinin hiçbirinin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir İlk aşama nested jel-elektroforez görüntüsünde 10,11,17,21,22,25,28,43,45,60 nolu örneklerde bant oluşumu gözlenmemiş iken 2. PCR'da bu 10 örnekte bant görünümü elde edilmiştir (Şekil 4.10)

4.5. Klasik PCR Analiz Bulguları

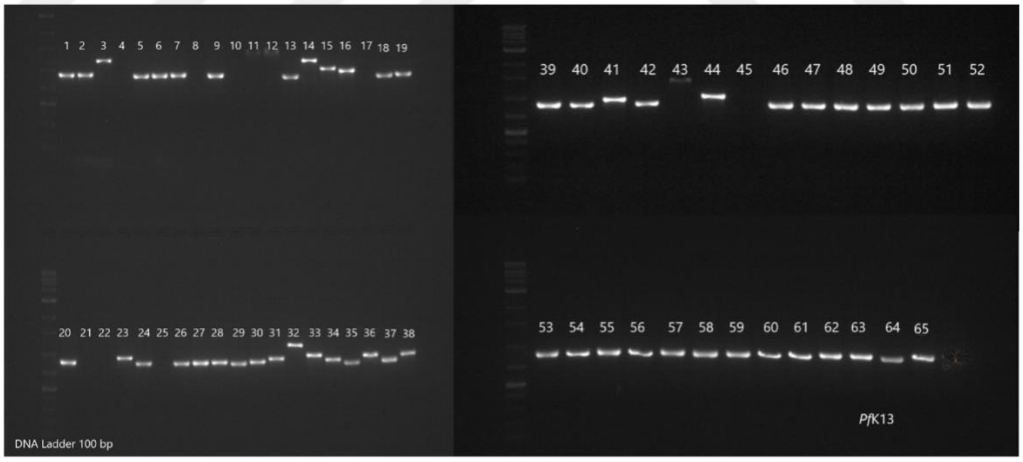
*Pf*crt için CRT2-F ve CRT2-R primerleri, *Pf*K13 için ise K13–2-1 ve K13–2-2 primerleri kullanılarak klasik PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

_Pf_crt Klasik PCR Analiz Bulguları:

*Pf*crt için nested 1. aşama PCR ürününde bant 537 bp'dir. EDTA'lı örneklerin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir fakat yayma örneklerinden 8 tanesinde gözle görülür bant oluşmamıştır.

_Pf_K13 Klasik PCR Analiz Bulguları:

*Pf*K13'ün K13–2-1 ve K13–2-2 primerleri ile PCR ürününde bant 801 bp'dir. EDTA'lı örneklerin jel-elektroforez görüntülerinde sinyal kaybı gözlenmemiştir fakat yayma örneklerinden 8 tanesinde gözle görülür bant oluşmamıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *Pf*K13'ün PCR amplifikasyon ürünlerinin jel-elektroforez görüntüsü

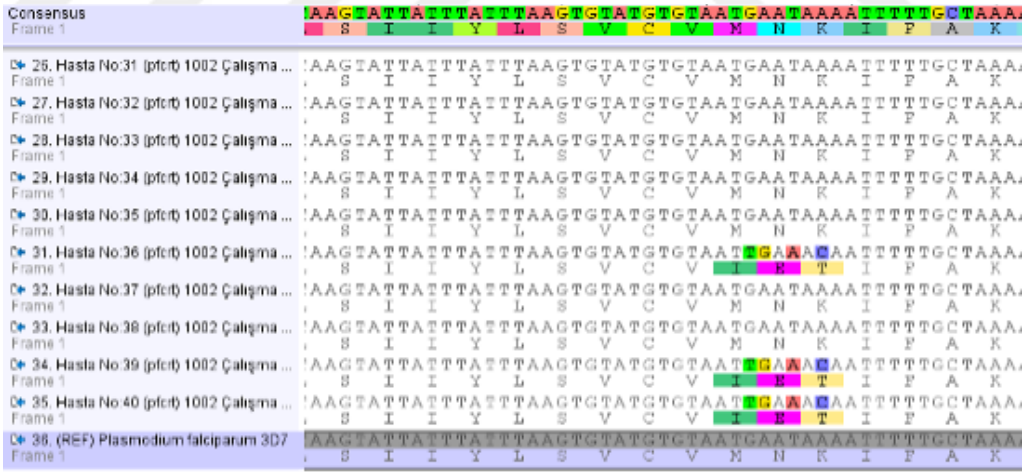
4.6. Sekans Analiz Bulguları

4.6.1. _Pf_crt Sekans Analiz Bulguları

Antimalaryal ilaç direnci markerlarından *Pf*crt'deki SNP'ler için 74, 75 ve 76. kodonlarda mutasyon analizi yapılmıştır. GenBank NCBI sisteminde kayıtlı referans

izolat olan *P. falciparum* clone 3D7 nolu izolat (yabanıl tip–wild type olarak adlandırılan referans izolat) ile kıyaslamalı olarak incelenmiştir.

*Pf*crt geninin amplifiye edilemediği 10 örnekte sekans analizi de yapılamamıştır. Başarı ile sekanslanan 90 örneğin (90/100-%90) 74,75 ve76. kodonlar için veriler GenBank NCBI sisteminde kayıtlı yabanıl izolat ile kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Yabanıl izolatta 74. kodon; 220, 221 ve 222. nükleotidlerindeki 'ATG' bazlarına denk gelmektedir ve M (metiyonin) aminoasitini kodlamaktadır. 75. kodon; 223, 224 ve 225. nükleotidlerindeki 'AAT' bazlarına denk gelmektedir ve N (asparajin) aminoasitini kodlamaktadır. 76. kodon; 226, 227 ve 228. nükleotidlerindeki 'AAA' bazlarına denk gelmektedir ve K (lizin) aminoasitini kodlamaktadır. *Pf*crt primeri ile amplifiye edilebilen 90 örneğin 11 tanesinde (%12,2) 74, 75 ve 76. kodonlarda SNP tespit edilmiştir. 74. kodondaki 'ATG' kodonu 'ATT'ye değişerek metiyonin yerine izolösin kodlamaya başlamıştır. 75. kodonda 'AAT' kodonu ise 'GAA'ya değişerek asparajin yerine glutamik asit kodlamaya başlamıştır. 76. kodondaki 'AAA' kodonu da 'ACA'ya değişerek lizin yerine treonin kodlamaya başlamıştır. Aminoasit değişimi ile 11 örnekte M74I, N75E, K76T anlamlı mutasyonu saptanmıştır.



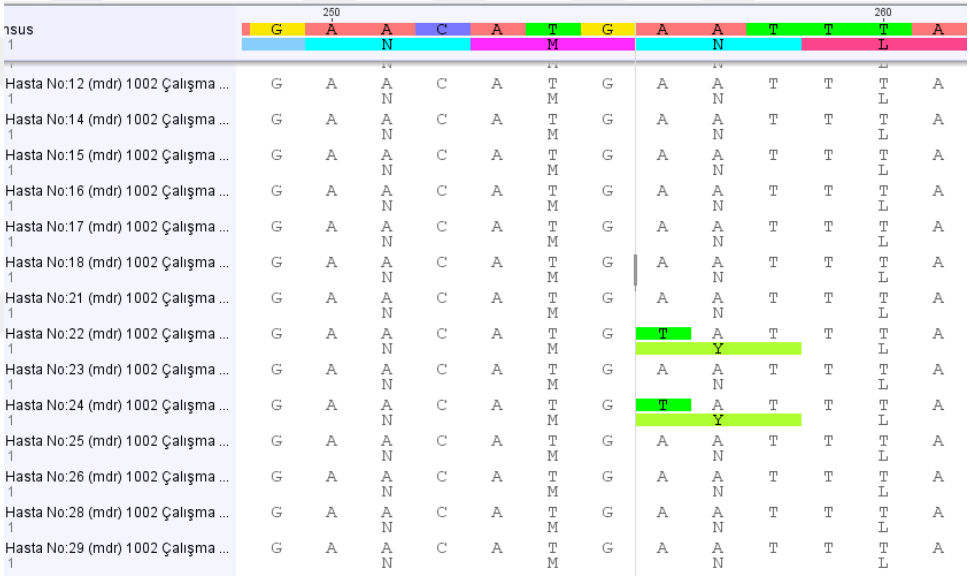
Şekil 4.12. *Pf*crt geninin 74,75,76. kodonlarındaki anlamlı mutasyon örnekleri (Sondaki örnek: Referans izolat)

4.6.2. *Pf*mdr1 Sekans Analiz Bulguları

Antimalaryal ilaç direnci markerlarından *Pf*mdr1'deki SNP'ler için *Pf*mdr1 (86,184), *Pf*mdr1 (1034,1042), *Pf*mdr1 (1246) primerleri ile amplifikasyon sonrası

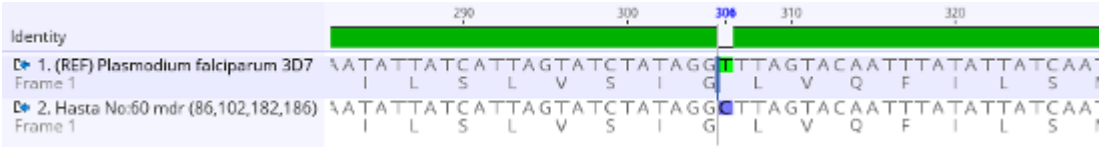
sekans analizinde 86,182,184,1034,1042 ve 1246. kodonlarda mutasyon analizi yapılmıştır.

*Pf*mdr1 (86,184) geninin amplifiye edilemediği 9 örnekte sekans analizi de yapılamamıştır. Başarı ile sekanslanan 91 örneğin (%91) 86, 182 ve 184. kodonlar için veriler GenBank NCBI sisteminde kayıtlı yabanıl izolat ile kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Yabanıl izolatta 86. kodon; 256, 257 ve 258. nükleotidlerindeki 'AAT' bazlarına denk gelmektedir ve N (asparajin) aminoasitini kodlamaktadır. Amplifiye edilen 91 örneğin Sudan, Çad, Sierre-Leone'den gelen hastaya ait 3 tanesinde (%3,3) 86. kodonda SNP tespit edilmiştir. 'AAT' kodonu 'TAT'ye değişerek asparajin yerine tirozin (Tyr) kodlamaya başlamıştır. Aminoasit değişimi ile 3 örnekte N86Y anlamlı mutasyonu saptanmıştır **(Şekil 4.13)**.



Şekil 4.13. *Pf*mdr geninin 86. kodonlarındaki anlamlı mutasyon örnekleri

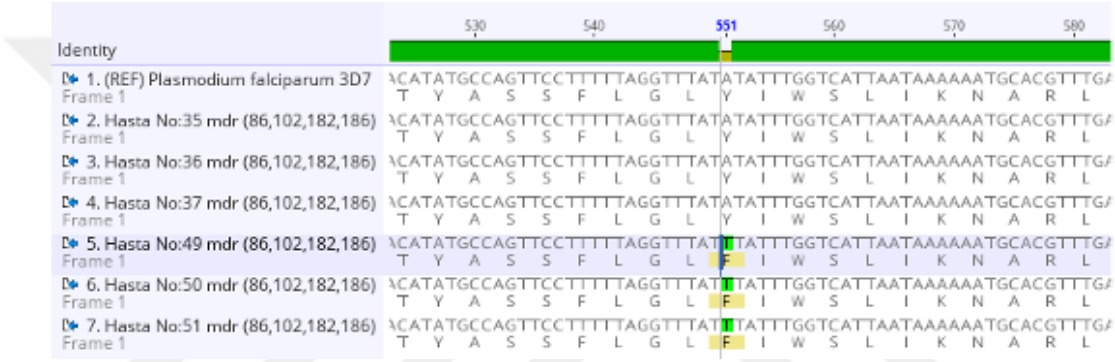
Yabanıl izolatta 102. lokus; 304., 305. ve 306. nükleotidlerindeki 'GGT' bazlarına denk gelmektedir ve G (Gly-glisin) aminoasitini kodlamaktadır. Taramalarımızda Nijerya, Çad ve Sierra-Leone kaynaklı 3 örnekte rastlantısal olarak 'GGT' bazındaki timinin sitozin ile değişerek 'GGC'ye dönüştüğü saptanmıştır. 'GGC' kodonu da glisin aminoasitini kodladığı için 102. lokusta aminoasit değişimine neden olacak bir mutasyon saptanmamış olup, gözlenen SNP (G102G) sinonim yani sessiz mutasyondur (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Pf*mdr1 geninin 102. kodonundaki sessiz mutasyon örnekleri

Yabanıl izolatta 182. lokus; 544, 545 ve 546. nükleotidlerindeki ‘GGT’ bazlarına denk gelmektedir ve G (glisin) aminoasitini kodlamaktadır. 91 örneğimizin hiçbirinde 182. kodondaki bu bazlarda SNP saptanmamıştır.

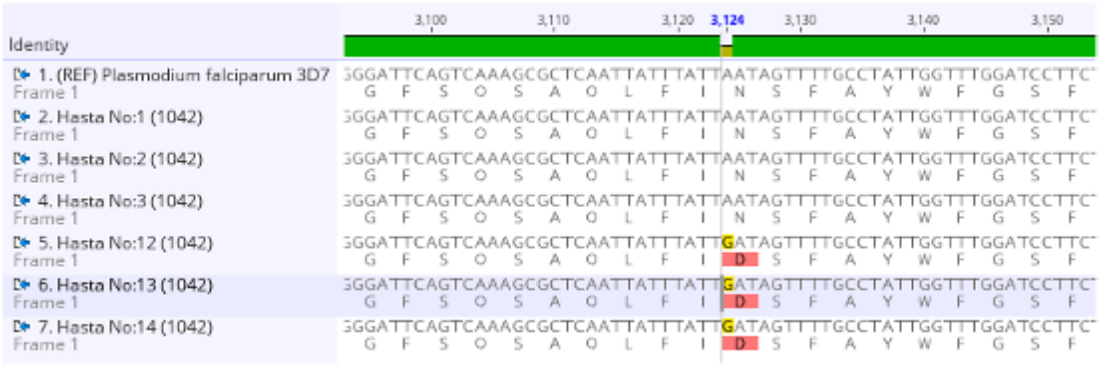
Yabanıl izolatta 184. lokus; 551, 552 ve 553. nükleotidlerindeki ‘TAT’ bazlarına denk gelmektedir ve Y (tirozin) aminoasitini kodlamaktadır. *Pf*mdr1 (86,184) primeri ile amplifiye edilebilen 91 örneğin 68 tanesinde (%74,7) 184. kodonda SNP tespit edilmiştir. ‘TAT’ kodonundaki adenin timin ile değişerek ‘TTT’ ye dönüşmüştür. ‘TTT’ kodonu da F (fenilalanin) aminoasitini kodladığı için, 68 örnekte Y184F anlamlı mutasyonu saptanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *Pf*mdr1 geninin 184. kodonundaki anlamlı mutasyon örnekleri

*Pf*mdr1 (1034-1042) geni için PCR ile amplifikasyonun sağlanamadığı 6 örneğe ek olarak 8. ve 45. numaralı örneklerle toplam 8 örnekte sekans verileri elde edilememiştir. Başarı ile sekanslanan 92 örneğin (%92) verileri yabanıl izolat ile kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Yabanıl izolatta 1034. kodonun 3100, 3101 ve 3102. nükleotidlerindeki ‘AGT’ kodonuna denk gelmektedir ve S (serin) aminoasitini kodlamaktadır. 92 örneğin 1034. kodon verilerinin yabanıl tip ile kıyaslamalı incelemesinde SNP saptanmamıştır.

Yabanıl izolatta 1042. kodonun 3124, 3125 ve 3126. nükleotidlerindeki ‘AAT’ bazlarına denk gelmektedir ve N (asparajin) aminoasitini kodlamaktadır. *Pf*mdr1 (1034,1042) primer ile amplifiye edilebilen 92 örneğin 16 tanesinde (%17,4) 1042. kodonda SNP tespit edilmiştir. ‘AAT’ bazındaki adenin guanin ile değişerek ‘GAT’ ye dönüşmüştür. ‘GAT’ kodonu da D (aspartat) aminoasitini kodladığı için, 16 örnekte N1042D anlamlı mutasyonu saptanmıştır (Şekil 4.16).

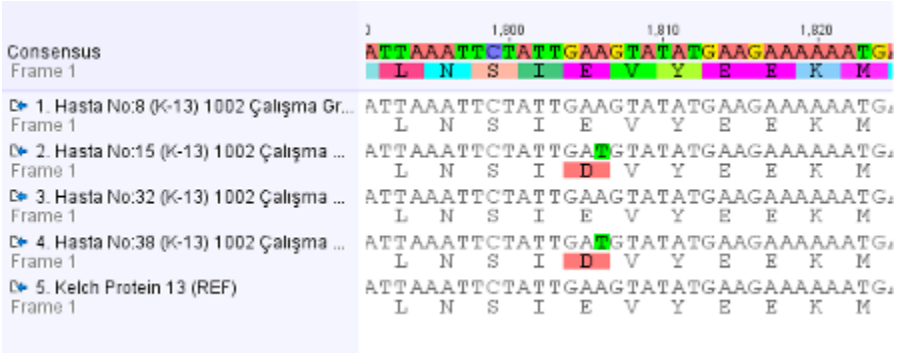


Şekil 4.16. *Pf*mdr1 geninin 1042. kodonundaki anlamlı mutasyon örnekleri

*Pf*mdr1 (1246) geni örneklerin hepsinde amplifiye edilebildiği için tüm örneklere sekans analizi yapılabilmiştir. Referans izolatta 1246. kodonun 3736, 3737 ve 3738. nükleotidlerindeki 'GAT' bazlarına denk gelmektedir ve D (aspartat) aminoasitini kodlamaktadır. 100 örneğimizin hiçbirinde 1246. kodondaki bu bazlarda SNP saptanmamıştır.

4.6.3. *Pf*K13 Sekans Analiz Bulguları

*Pf*K13 geni 8 örnekte amplifiye edilememiş olup 92 örneğin sekans analizi yapılmıştır. Antimalaryal ilaç direnci ile ilişkili olan 446, 458, 476, 493, 539, 543, 553, 561 ve 580. kodonlar da dahil olmak üzere 440.'ncı kodondan 700. kodona kadar *Pf*K13 geninde SNP taranmıştır. Örneklerin Nijerya ve Fildişi Sahilleri kaynaklı 2 tanesinde 602. kodonda baz değişimi saptanmıştır. Referans izolatta 602. kodon; 1804, 1805 ve 1806. nükleotidlerindeki 'GAA' bazlarına denk gelmektedir ve E (glutamik asit) aminoasitini kodlamaktadır. 'GAA' bazındaki adenin timine değişerek 'GAT' ye dönüşmüştür. 'GAT' kodonu da D (aspartat) aminoasitini kodladığı için, 2 örnekte E602D anlamlı mutasyonu saptanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *Pf*K13 geninin 602. kodonundaki anlamlı mutasyon örnekleri

4.7. İstatistiksel Veriler

Tablo 4.1. Bölgelere Göre Tek Nükleotid Polimorfizm Sonuçlarının Dağılımı

		BÖLGE								
		ÜLKESİ BELLİ OLMAYAN		BATI AFRİKA		ORTA AFRİKA		DOĞU AFRİKA		p *(Ülkesi Belli Olanlar)*
		N	%	N	%	N	%	N	%	
GEN 74 (N:90)	M (79)	18	94,7%	32	80,0%	16	94,1%	13	92,9%	**0,328**
	I (11)	1	5.3%	8	20,0%	1	5,9%	1	7,1%	
GEN 75 (N:90)	N (79)	18	94,7%	32	80,0%	16	94,1%	13	92,9%	**0,328**
	E (11)	1	5.3%	8	20,0%	1	5,9%	1	7,1%	
GEN 76 (N:90)	K (79)	18	94,7%	32	80,0%	16	94,1%	13	92,9%	**0,328**
	T (11)	1	5.3%	8	20,0%	1	5,9%	1	7,1%	
GEN 86 (N:91)	N (88)	20	100%	38	97,4%	16	94,1%	14	93,3%	**0,589**
	Y (3)	0	0,0%	1	5,9%	1	5,9%	1	6,7%	
GEN 102 (N:91)	G (88)	20	100,0%	37	94,9%	16	94,1%	15	100,0%	**1,000**
	G102G(3)	0	0,0%	2	5,1%	1	5,9%	0	0,0%	
GEN 184(N:91)	Y (23)	5	25.0%	11	28,2%	6	35,3%	1	6,7%	**0,150**
	F (68)	15	75.0%	28	71,8%	11	64,7%	14	93,3%	
GEN 1042 (N:92)	N (76)	17	85.0%	33	82,5%	12	70,6%	14	93,3%	**0,270**
	D (16)	3	15.0%	7	17,5%	5	29,4%	1	6,7%	
GEN 602 (N:92)	E (90)	21	100,0%	39	97,5%	16	94,1%	14	100,0%	**0,684**
	D (2)	0	0,0%	1	2,5%	1	5,9%	0	0,0%	

Fisher Freeman Halton test

Bölgelere göre 74,75,76,86,102,184,1042 genlerinin dağılımları ayrı ayrı incelendiğinde wild kodon ve SNP dağılımları arasında anlamlılık saptanmamıştır (p>0,05) (Tablo 4.1.)

Tablo 4.2. Bölgelere ve Ülkelere Göre Örnek Sayıları ve Mutasyonların Dağılımı

ÜLKE	Toplam	*Pf*crt (IET)/ Amplifiye edilebilen	Y184F/ Amplifiye edilebilen	N1042D/ Amplifiye edilebilen	p
ULKESI BELLI OLMAYAN	**22**	**1/18 (5.6%)**	**15/20 (75%)**	**3/20 (15%)**	**0,001****
BATI AFRIKA	**43**	**8/40 (20%)**	**28/39 (71,8%)**	**7/40 (17,5%)**	**0,001****
BURKİNA FASO	2	0	2/2 (100%)	0	
FİLDİŞİ SAHİLİ	5	0	2/5 (40%)	1/5 (20%)	
GANA	4	0	¾ (75%)	¼ (25%)	
GİNE	13	3/11 (27,2%)	8/10 (80%)	1/11 (9,1%)	
LİBERYA	4	1/4 (25%)	2/4 (50%)	0	
MALİ CUMHURİYETİ	2	0	2/2 (100%)	½ (50%)	
MALİ-SENEGEAL	1	1/1 (100%)	0	0	
NİJER	2	0	½ (50%)	0	
NİJERYA	6	2/6 (33,3%)	5/6 (83,3%)	2/6 (33,3%)	
SİERRA LEONE	4	1/3 (33,3%)	3/3 (100%)	1/3 (33,3%)	
ORTA AFRİKA	**18**	**1/17 (5,9%)**	**12/18 (66,7%)**	**5/17 (29,4%)**	**0,001****
ÇAD	10	0/9	8/10 (80%)	2/9 (22,2%)	
KAMERUN	6	1 (16,6%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	
KONGO	2	0	½ (50%)	0	
DOĞU AFRİKA	**17**	**1/14 (7,1%)**	**13/14 (92,9%)**	**1/15 (6,6%)**	**0,001****
CİBUTİ	1	0	1/1 (100%)	0	
ERİTRE	2	0	1/1 (100%)	0	
MOZAMBİK	1	0	0	0	
SUDAN	6	0	6/6 (100%)	0	
TANZANYA	3	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)	
UGANDA	4	0	3/3 (100%)	0	
Genel Toplam	**100**	**11/89 (12,4%)**	**68/91 (74,7%)**	**16/92 (17,4%)**	**0,001****

Ki kare test ***p<0,01*

Bölgelere göre ve genel toplamda Y184F/ Amplifiye edilebilen oranı, *Pf*crt (IET) ve N1042D den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,01$).

*Pf*mdr1 genotiplendirmesinde 86, 184 ve 1042 kodonlarında mutasyon tanımlanmıştır. 86, 184 ve 1042'nin en az birinin başarı ile sekanslandığı 94 örnekte *Pf*mdr1 ilaç direnci prevalansı %74,5'dir. Y184F mutasyonu %74,7 (68/91) prevalans oranı ile en sık saptanan mutasyon olmuştur. İkinci en sık saptanan mutasyon %17,4 (16/92) prevalans oranı ile N1042D'dir. N86Y mutasyonunun prevalansı %3,3 (3/91) bulunmuştur. *Pf*crt genotiplendirmesinde üç mutasyon (M74I, N75E, K76T) beraber bulunmaktadır ve prevalansı %12,2 (11/90) saptanmıştır. *Pf*K13 geninde amplifiye edilebilen 92 örneğin sadece 2 tanesinde (%2,2) E602D mutasyonu saptanmıştır.

SNP'lerin bölgesel dağılımlarına bakıldığında 11 örnekte saptanan *Pf*crt mutasyonunun sekizi Batı Afrika örneklerinde amplifiye edilmiştir. Y184F mutasyonunun prevalansı tüm Afrika'da %74,7 iken sadece Doğu Afrika örneklerinde %92,9 olarak daha yüksek bulunmuştur. Batı Afrika, Orta Afrika, Doğu Afrika'da, Y184F oranı, *Pf*crt (IET) ve N1042D den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,01$) (Tablo 4.2.). Genel toplama bakıldığında da tüm Afrika'da, Y184F/ Amplifiye edilebilen oranı, *Pf*crt (IET) ve N1042D den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,01$) (Tablo 4.2.).

Tablo 4.3. Bölgelere göre *Pf*crt ve *Pf*mdr1 SNP haplotipleri

		BÖLGE							
		ULKESI BELLI OLMAYAN		BATI AFRİKA		ORTA AFRİKA		DOĞU AFRİKA	
		N	%	N	%	N	%	N	%
PFCRT (90)	MNK (79)	18	94,7%	32	80,0%	16	94,1%	13	92,9%
	IET (11)	1	5,3%	8	20,0%	1	5,9%	1	7,1%
PFMDR (89)	NYN (20)	4	21,1%	10	25,6%	5	29.4%	1	7.1%
	NFN (50)	12	63,2%	21	53.8%	6	35.3%	11	78.6%
	NYD (2)	0	0,0%	1	2.6%	1	5.9%	0	0%
	NFD (14)	3	15,8%	6	15.4%	4	23.5%	1	7.1%
	YYN (0)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	YFN (3)	0	0,0%	1	2,6%	1	5.9%	1	7.1%
	YYD (0)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	YFD (0)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

*Pf*mdr1 için 5 haplotip saptanmıştır; NYN, NFN, NYD, NFD, YFN. Bunlardan NYN yabanıl haplotip olup, mutasyon olan NFN, NYD, NFD, YFN 4 haplotipin prevalansları sırasıyla %56,2, %2,2, %15,7, %3,4 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.4. *Pf*crt ve *Pf*mdr1 haplotip dağılımı

*Pf*crt			*Pf*mdr1			Sayı
74	75	76	86	184	1042	N(%)
M	N	K	N	Y	D	0
M	N	K	N	F	N	46 (%51,7)
M	N	K	N	F	D	14 (%15,7)
M	N	K	Y	F	N	2 (%2,2)
I	E	T	N	Y	D	2 (%2,2)
I	E	T	N	F	N	4 (%4,5)
I	E	T	N	F	D	0
I	E	T	N	Y	N	4 (%4,5)
I	E	T	Y	F	N	1 (%1,1)

Örneklerin 89'unda hem *Pf*crt geni hem de *Pf*mdr1 geni başarılı bir şekilde sekanslanmıştır. Kombine 7 haplotip belirlenmiştir: MNKNFN, MNKNFD, MNKYFN, IETNYD, IETNFN, IETNYN, IETYFN. Sırasıyla %51,7 ve %15,7 prevalans ile MNKNFN ve MNKNFD'nin baskın olduğu saptanmıştır. *Pf*crt mutasyon haplotipi IET ve *Pf*mdr1 mutasyon haplotipi olarak NYD, NFN, YFN'den birinin olduğu kombinasyonun prevalansı %7,9 bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Sıtma tanısında mikroskopik değerlendirme hala altın standart test olarak kullanılmaya devam etmektedir. Öte yandan epidemiyolojik çalışmalar, aşı araştırmaları, antimalaryal ilaç direnç analizi gibi durumlarda PCR bazlı tetkiklere gereksinim olmaktadır. PCR ile antimalaryal ilaçlara karşı mutasyon genlerinin saptanması, yaygınlığının belirlenmesi, antimalaryal ilaç direnç profillerinin ortaya çıkarılması ve böylece tedavi protokollerinin belirlenebilmesi önem arz etmektedir. Real-time PCR ile parazitin identifikasyonu düşük düzey parazitemi (en az %0,01 veya 1 parazit/µl) seviyelerinde bile yüksek duyarlılığa sahiptir (42,43). Fakat bu duyarlılık örneğin saklanma koşullarına göre değişebilmektedir. Kassaza ve ark.'nın yaptığı çalışmada, arşivlenmiş kan yaymalarının DNA ekstraksiyonu ile yapılan PCR'ın duyarlılığı %93, son 72 saat içindeki kan örnekleriyle yapılan PCR'ın duyarlılığı ise %100 bulunmuştur (44). Çalışmamızda yayma mikroskopik olarak *P. falciparum* tanısı konularak arşivlenmiş olan 45 yayma örneğinin 8 tanesinde (%17,8) *P. falciparum* tür spesifik primerler kullanılarak uygulanan real-time PCR ile amplifikasyon sinyali elde edilememiştir. Kan yayma örneklerinde real-time PCR'ın duyarlılığı çalışmamızda %82,2 olarak saptanmıştır. EDTA'lı örneklerimizin hepsinde ise amplifikasyon oluşmuştur ve EDTA'lı kan örneklerinde real-time PCR'ın duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır. Bu farklılığın muhtemel nedeni, kan yaymalarına kıyasla EDTA'lı örneklerdeki DNA miktarının fazlalığı olabilir. Çalışmamızda pozitif yaymalardan elde edilen DNA ekstraktlarının bazılarında amplifikasyonun yetersiz olmasının sebebi ise; 4 yıla dek uzamış saklama süresine bağlı *Plasmodium* DNA'sında nitelik ve nicelik kaybı olabilir. Ayrıca DNA izolasyon prosedürlerinin işlenmesi sırasında da DNA kaybı yaşanabilir. Yaymaların saklanma koşulları, süreleri, DNA izolasyon prosedürleri gibi faktörler PCR işlemlerinde testin duyarlılığını etkileyebilmektedir. Direnç markerlarının amplifikasyonu ise klasik ve nested PCR ile gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR ile identifiye edilemeyen 8 örnek daha sonra antimalaryal ilaç direnç markerları olan *Pf*crt, *Pf*mdr1, *Pf*K13 lokusları nested PCR ve klasik PCR yöntemi ile çalışıldığında amplifiye edilebilmiştir. Real-time PCR ile amplifiye edilebilen yayma örneklerininin bazılarında, bazı direnç markerları amplifiye edilememiş ya da amplifiye edilmesine rağmen sekanslama yapılamamıştır. *Plasmodium* tanısı için nested PCR ve real-time PCR duyarlılığının

%100 olarak benzer olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (45,46). Bu çalışmalarla çalışmamızdaki real-time PCR sonuçları arasındaki farklılığın nedeni, real-time PCR'da tek bir hedef DNA molekülüne kıyasla nested/klasik PCR'da amplifiye edilecek *Pf*crt, *Pf*mdr1, *Pf*K13 genlerinin daha küçük bir bölge olması yanında, yaymadaki *Plasmodium* DNA'sında nitelik ve nicelik kaybı olsa da iki aşamalı nested PCR amplifikasyonları ile çok sayıda amplikon elde edilebilmesi olabilir. Bu verilere dayanarak tüpte saklanan tam kan örneklerinin PCR için uygun materyaller olduğu, yayma şeklinde arşivlenen numunelerde ise, yanlış negatif sonuçların saptanabileceği söylenebilir. Yayma şeklinde arşivlenen numunelerde; uygun koşullarda ve sürede saklanmış olması, yüksek parazit ve DNA içermeleri halinde daha düşük oranda yanlış negatif sonuçlar görülebilir.

DSÖ'nün 2021 Dünya Sıtma Raporu'na göre 2020 yılında sıtma açısından endemik olan 85 ülkede 241 milyon sıtma vakası bildirilmiştir. 2019 yılında 227 milyon olan vaka sayısı 2020 yılında artmıştır. 2020'deki artış, genel olarak Afrika Bölgesi kaynaklıdır. Afrika Bölgesi, tahmini 228 milyon ile vakaların yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Son yıllarda antimalariyal tedavilere dirençli *Plasmodium* suşlarının ortaya çıkması; yetersiz tedavi, nüksler, komplikasyonlar gibi tedavide gözlenen başarısızlıklar yanında istatistiksel verilerde gözlenen vaka artışının da sebebidir. Afrika Bölgesi'nde artemisinin kısmi direncinin ortaya çıktığına dair son kanıtlar küresel endişeye sebep olmaktadır ve direncin terapötik etkinlik ve genotipik sürveyans kapsamını belirleme çalışmaları, DSÖ tarafından acil bir öncelik olarak ileri sürülmektedir (3). Çalışmamızda sıtmanın elimine edildiği Türkiye'ye, endemik Afrika ülkelerinden seyahat ile gelerek tanı alan vakaların arşivlenmiş numuneleri kullanılmıştır ve *P. falciparum*'un ilaç direnci ile ilişkili *Pf*crt, *Pf*mdr1, *Pf*K13 mutasyonları çalışılmıştır. Bugüne kadarki bilgilerimize göre çalışmamız; ülkemizde bu türde klinik örneklerden izole edilen örneklerde genetik antimalaryal direnç analizi anlamında yapılmış ilk çalışmadır. Bu tez çalışması kapsamında analiz edilen direnç markerları içinden *Pf*mdr1 %74,5 prevalans değeri ile en yüksek mutasyon oranı olarak saptanmıştır. Çalışmamızda *Pf*mdr1'de dirençle ilişkili olan 5 SNP'den (N86Y, Y184F, S1034C, N1042D, D1246Y) sadece N86Y, Y184F ve N1042D tespit edilmiştir ve prevalans değerleri sırası ile %3,3, %74,7 ve %17,4 olarak bulunmuştur. Bu polimorfizmler; kinin, klorokin, meflokin, lumefantrin, halofantrin, artemisinin

grubu ilaçlara karşı antimalaryal direnç ile ilişkilidir (1). Y184F, Asya ve Afrika orjinli izolatlarda daha sık görülürken, N1042D Güney Amerika izolatlarında daha sık bulunur (37). Yabanıl tip N86, D1246 ve mutant 184F, AL'yi birinci basamak antimalaryal ilaç olarak kullanan Afrika ülkelerinde yaygındır (47). CQ tedavisi yerine AL kullanımı ile N86Y mutasyonunda da yıllar içinde azalma olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Wamae ve ark. Kenya'da 20 yıl boyunca değişen antimalaryal ilaç direnç belirteçlerinin allel frekanslarındaki değişiklikleri analiz etmişlerdir. 1995/96 yıllarında N86Y frekansı %57 iken yıllar geçtikçe bu frekans azalmış ve 2017/18 yılında %1,2 olarak saptanmıştır (48). Mbogo ve ark. *Pf*mdr1 polimorfizmleri için 2003-2012 yılları arasında toplanan 982 arşivlenmiş örneğin genotiplendirmesi ile zaman içinde *Pf*mdr1 N86Y ve D1246Y allellerinde dramatik bir azalma bildirmişlerdir (49). Çalışmamız sonuçlarına göre D1246Y mutasyonu saptanmamış ve N86Y mutasyon prevalansı düşük (%3,3) saptanmış olduğundan, sonuçlarımızın benzer çalışmalar ile uyumlu olduğu söylenebilir. Afrika'da sıtma tedavisinde CQ kullanımının azalıp AL kullanımının yaygınlaşması da yabanıl tip olan N86 oranlarının artışıyla sonuçlanmıştır. Ayrıca sonuçlarımıza göre, örneklerimizde Y184F mutasyonlu izolatların yabanıl tipe göre daha baskın bulunması (prevalans %74,7), N1042D mutasyonlu izolatların ise yabanıl tipe göre daha az oranda saptanması, diğer çalışmalardaki *Pf*mdr1 genetik profil sonuçlarıyla uyumludur.

*Pf*mdr1 ve *Pf*crt sindirim vakuolünün zarında bulunan bir ABC taşıyıcı protein olup *Pf*mdr1 mutasyonu ile CQ'in sindirim vokuolüne taşınma aktivitesinin azaldığı, *Pf*crt mutasyonuyla ise sindirim vokuolünden dışarı atılımının arttığı düşünülmektedir. Böylece *Pf*mdr1 ve *Pf*crt allellerinin kombinasyonu ile ilaç direnç fenotipleri daha belirgin hale gelebilir (37). Literatürdeki çoğu çalışma sinerjik olarak hareket edebilen birden fazla belirteç yerine öncelikle tek genlere ve belirteçlere odaklanmıştır. Fakat ilaç direncini farklı belirteçler sinerjik olarak etkileyebildiği için tüm bu belirteçlerin tek başına değerlendirilmesi gerçek verileri tam anlamıyla yansıtmayabilir. Dolayısıyla bu allellerin haplotip sıklıklarının belirlenmesi, antimalaryal ilaç direnç profilinin tanımlanmasında daha doğru ve kuvvetli veriler sağlayacaktır. Çalışmamızda *Pf*mdr1 ve *Pf*crt için 7 kombine haplotip (MNKNFN, MNKNFD, MNKYFN, IETNYD, IETNFN, IETNYN, IETYFN) belirlenmiştir. MNKNFN ve MNKNFD haplotiplerinin %51,7 ve %15,7 prevalans oranlarıyla baskın olduğu

saptanmıştır. *Pf*crt mutasyon haplotipi IET ve *Pf*mdr1 mutasyon haplotipi olarak NYD, NFN, YFN'den birinin olduğu kombinasyonun prevalansı ise %7,9 idi. Çalışmalar *Pf*mdr1 (özellikle N86Y, Y184F mutasyonları) ile *Pf*crt mutasyon birlikteliğinin CQ direncinde önemli bir rol oynayacağını göstermiştir. *Pf*mdr1 Y184F mutasyonu varlığında antimalaryal ilaç direncinin ortaya çıkmasında N86Y'nin eşliği ve *Pf*crt mutasyonları ile kombinasyon faktörlerinin de belirleyici olduğu düşünülmektedir (32,37). Çalışmamızda Y184F'nin tek başına prevalansı %74,7 olmasına rağmen, N86Y eşliği olmadan *Pf*crt ile IETNFN haplotipi sadece 4 örnekte (%4,5) saptanmıştır. Bu nedenle N86Y olmadan *Pf*mdr1 Y184F ile *Pf*crt birlikte mutasyonunun yaygın olmadığı düşünülebilir. Y184F'e sadece N86Y'nin eşlik ettiği, *Pf*crt mutasyonunun bulunmadığı MNKYFN haplotipi sadece iki örnekte (%2,2); Y184F'e N86Y ve *Pf*crt'nin birlikte eşlik ettiği IETYFN haplotipi ise sadece bir örnekte saptanmıştır. CQ kullanımının azalması ve birinci basamak tedavi olarak AL'nin kullanılması ile Afrika'da *Pf*crt K76 yabanıl tip ve *Pf*mdr1 N86 ve D1246 yabanıl tip prevalanslarının arttığı, ayrıca CQ direncinde de azalma olduğu gösterilmiştir (50). Bu nedenle elde ettiğimiz bulgular, *Pf*crt'de yaygın K76T mutasyonlarının olmayışı veya *Pf*mdr1'de destekleyici ek mutasyonların azlığı veya olmayışı ile tek başına Y184F mutasyonunun varlığının antimalaryal ilaç direncine büyük ölçüde katkıda bulunmayacağını düşündürmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz bu veriler CQ direncindeki azalmayı genotipik olarak destekleyici bulgulardır.

Nijerya'da 2020 yılında yapılan bir çalışmada N86Y, Y184F ve D1246Y SNP'lerinin haplotiplerinden NFD %69,81 prevalans ile en yüksek haplotip olarak saptanmıştır (47). Çalışmamızda ise NFD haplotip prevalansı %74,7 bulunmuştur. Bazı yayınlarda NFD (N86, 184F, 1246D) haplotipi taşıyan izolatlarda piperakine karşı önemli bir direnç gösterilmiştir (37,51). Çalışmamızda NFD prevalansı diğer çalışmalara göre daha yüksek bulunmuş olup (2) tedavide birinci basamak sıtma önleyici ilaçlardan olan dihidroartemisinin-piperakin kombinasyonu kullanılıyorsa, bu vakaların izleminin dikkatle yapılması önerilir.

N86Y mutasyonunun; parazitleri lumefantrin, meflokin, halofantrin ve dihidroartemisinine daha duyarlı hale getirdiği, CQ ve amodiakine karşı ise daha dirençli hale getirdiği çalışmalarda gösterilmiştir (37,52). *Pf*mdr1 SNP çalışmalarından elde edilen sonuçlar, CQ direncinde N86Y'nin diğer *Pf*mdr1 SNP

varyantlarına göre daha belirgin rol oynadığını göstermiştir (47,53). N86Y mutasyonu ile karşılaştırıldığında, Y184F mutasyonunun *in vivo* antimalaryal etkinlik ile daha zayıf bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Y184F'nin CQ direncindeki rolü konusunda literatürde bir fikir birliği bulunmamaktadır fakat lumefantrin ve/veya artemisinine karşı duyarlılık azalması ile ilişkilendirilmiştir (47). Bu çalışmada elde edilen *Pf*mdr1 Y184F'nin yüksek, N86Y'nin düşük prevalans değerleri, Afrika'da AL tedavisinin yaygın kullanımının yansıması olarak mutasyon seçilimini destekliyor olabilir.

Sahraaltı Afrika ülkelerinde de ilk basamak ilaç olarak yaygın kullanılmaya başlanan AL tedavisi sonrası rekürrenslerin olduğu söylenmiştir (54,55). N86Y mutasyonunun parazitleri artemisinin kombine tedavisinde sıklıkla kombinlenen dihidroartemisinin, lumefantrin ilaçlarına daha duyarlı hale getirdiği gözlenmiştir (37,55). Diğer çalışmalar N86 yabanıl tip allelinin AL tedavisi sonrası nükslerde daha baskın olduğunu bildirmiştir (2,50,56) Çalışmamızda N86Y mutasyonunun azlığı AL kullanımının artması sonucu yabanıl tipin seçilimini düşündürmektedir. *Pf*crt K76T mutasyonu taşıyan izolatlarda lumefantrine dolayısıyla AL'ye duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. AL ile tedavi sonrası rekürrensin, K76T taşıyan izolatların prevalansındaki azalma ile ilişkisi kurulmuştur (50,54). Çalışmamız sonuçları ve literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak *Pf*crt K76T'nin ve *Pf*mdr1 N86Y mutasyon oranlarının genel olarak azalmasının; artemisin ve lumefantrinin antimalaryal aktivitesinde bir miktar azalma ile, birinci basamak tedavi rejimi olan AL'nin antimalaryal tedavideki rolünü tehdit edebileceği düşünülmektedir. Bu durum AL kombinasyon tedavileri sonrası gözlenen nükslerin artışını da açıklayabilir. Küresel sıtma eliminasyon stratejileri için bu ilişkinin inceleneceği daha büyük çalışmalarla konuyu aydınlatıcı daha güvenli veriler sağlanacaktır.

Çalışmamızda %17,4 prevalans oranı ile saptadığımız *Pf*mdr1 N1042D mutasyonunun kinin ve onun türevi kinidine karşı dirençte önemli bir rolü olduğu fakat CQ direnci üzerine minimal etkisinin olduğu bilinmektedir (37,52). Sıtma tedavisinde kullanılması gereken ilk ilaçlardan olmamakla beraber DSÖ tarafından gebelik gibi özel durumlarda önerilen kinin ile ilişkili N1042D mutasyonunun sürveyansı önemlidir. 1034 ve 1042 kodonlarındaki mutasyonların, meflokin direncini ortadan kaldırdığı veya azalttığı bildirilmiştir (57). Sidhu ve ark.'nın yaptığı çalışma ile S1034C, N1042, D1246Y mutasyonlarının parazitin meflokine duyarlılığını daha da

arttırdığını, özellikle N1042D mutasyonunun S1034C ve D1246Y'ye göre meflokin duyarlılığını arttırıcı etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (52). CDC komplikasyonsuz *P. falciparum* vakaları için CQ direnci olan bölgelerde meflokini alternatif ilaç olarak önermektedir. Çalışmamız verilerine göre N1042D sıklığının %17,4 şeklinde nispeten düşük saptanması sebebiyle, meflokin kullanımında dikkatli olunması gerektiği düşünülebilir.

Çalışmamızda Nijerya, Çad ve Sierra-Leone kaynaklı 3 örnekte 102. kodonda 'GGT' bazındaki timin sitozin ile değişerek 'GGC' ye dönüşmüştür. Fakat ikisi de glisin aminoasitini kodladığı için 102. lokusta bulunan mutasyon sinonim yani sessiz mutasyon olup aminoasit değişikliği oluşturmamıştır. Kenya'da 20 yıl boyunca değişen antimalaryal ilaç direnç belirteçlerinin allel frekanslarındaki değişikliklerin analiz edildiği bir çalışmada, 1995'ten 2013'e kadar *Pf*mdr1 102. kodonda mutasyon saptanmamış olup 2015/16 yılında frekansı %1,9, 2017/18 yılında ise frekansı %7,4 olarak G102G mutasyonu raporlanmıştır ve belirtilen mutasyonların hepsi sessiz mutasyondur (48). Literatürde de çalışmamızla benzer şekilde 102. kodonda aminoasit değişimine neden olan SNP bulunamamıştır.

CQ direncinin ana belirleyicisi olarak *Pf*crt K76T mutasyonu birçok çalışmada tanımlanmıştır. CQ, *Pf*crt K76T mutasyonlu vakaların tedavisinde tercih edilmemektedir (2,31,36,58). *Pf*crt'nin CQ dışındaki kinin, kinidin, amodiakin, halofantrin, meflokin gibi antimalaryal ilaçlara direnci etkilediğini destekleyen güçlü kanıtlar vardır (59). Ayrıca potansiyel olarak lumefantrin duyarlılığı ile ilişkisi bildirilmiştir (60) Dimbu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tedavi başarısız vakalardan alınan örnekler *Pf*crt açısından genotiplendirildiğinde; artesunat-amodiakin ile tedavi sonrası tedavi başarısız örneklerin %92'sinde, AL ile tedavi sonrası tedavi başarısız örneklerin ise sadece %16'sında K76T mutasyonu saptanmıştır (60). Çalışmamızda K76T mutasyon oranının düşük oranda (%12,2) saptanması sebebiyle, amodiakin ile kombine tedavilerle sıtma tedavisinde başarı şansının yüksek olacağı öngörülebilir.

Afrika'da en yaygın bulunan klorokin dirençli haplotip CVIET'tir (1,2,61). 1996 ve 2001 yılları arasında Ariey ve ark.'nın Afrika'nın farklı bölgelerinden 249 örnekle yaptıkları çalışmada 124 (%50) CQ duyarlı yabanıl haplotip olan CVMNK izolatı, 125 (%50,2) CQ dirençli haplotip CVIET izolatı saptanmıştır (62). Bizim

çalışmamızda ise 2 çeşit *Pf*crt haplotipi bulunmuştur: IET ve MNK. IET haplotip prevalansı %12,2 olup wild tip MNK %87,8 ile baskın haplotip olarak saptanmıştır. Yayılan CQ direnci sonrası artemisinin kombine tedavisi, komplike olmayan *P. falciparum* sıtmasının birinci basamak tedavisi olarak belirlenmiş, CQ kullanımı azalmıştır. Son çalışmalarda, CQ ilaç kullanımının azalması ile CQ direncinde azalma, CQ duyarlı fenotiplere geri dönüş olduğu vurgulanmıştır (51,63). Wamae ve ark. Kenya'da 20 yıl boyunca değişen antimalaryal ilaç direnç belirteçlerinin allel frekanslarındaki değişiklikleri analiz etmişlerdir. 1995/96 yıllarında IET frekansı %62.3 iken yıllar geçtikçe bu frekans azalmış ve 2017/18 yılında %1,1 olarak saptanmıştır (48). Mbogo ve ark. *Pf*crt K76T polimorfizmi için 2003-2012 yılları arasında toplanan 982 arşivlenmiş örneğin genotiplendirmesi ile zaman içinde ciddi bir azalma bildirmişlerdir (49). Çalışmamız kapsamında MNK prevalansının yüksek saptanması; diğer çalışmalara benzer şekilde yabanıl tipe geri dönüşü destekler niteliktedir. Bu sonuç ile Afrika'da direncin görülmediği CQ duyarlı *P. falciparum* varlığının arttığı pekiştirilmiştir. Afrika popülasyonunda dolaşan CQ'ya duyarlı parazitlerin artması, gelecekte sıtma tedavisi için CQ'nun kombinasyon tedavisine yeniden dahil edilebileceğini düşündürmektedir. CQ kullanımı yaygın olmasa da *Pf*crt moleküler direnç sürveyans çalışmalarının devam etmesi, bu durumun tespiti açısından önem arz etmektedir. Daha önceki çalışmalarda *Pf*crt K76T allelinin prevalansının yüksek olması dolayısı ile bu SNP'nin AL direncine olası katılımı ile ilgili herhangi bir sonuca varılamamıştır (54). Artemisinin ilaç kombinasyonunun *Pf*crt allellerinin seçilimindeki etkisini, *Pf*crt'nin CQ dışındaki ilaçlara *in vitro* duyarlılık etkisini saptayabilmek için daha ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

Çalışmamızda Y184F oranı, Batı Afrika, Orta Afrika, Doğu Afrika'da ve totalde tüm Afrika'da, *Pf*crt (IET) ve N1042D den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,01$). Bu sonuç AL'yi birinci basamak antimalaryal ilaç olarak kullanan Afrika'da Y184F seçilimini desteklemektedir (47). Birkaç epidemiyolojik çalışma, Y184 allelinin ağırlıklı olarak Doğu ve Orta Afrika ile sınırlı olduğunu, mutant 184F allelinin ise Batı Afrika'da baskın olduğunu göstermiştir (47). Doğu Afrika menşeli amplifiye edilebilen 14 örneğin 13 tanesinde (%92,9) mutant 184F saptanmıştır. Bu saptanma yüzdesi Batı Afrika'da %71,8 (28/39), Orta Afrika'da %66,7(12/18) bulunmuştur. Çalışmamızda Y184F'in Doğu Afrika bölgesinde diğer

bölgelere nazaran daha yüksek oranda olduğu gözlenmiştir. *Pf*crt mutasyonu ise Batı Afrika menşeli örneklerde daha fazla sayıda (amplifiye edilen 40 örneğin 8 tanesinde-%20) bulunmuştur. Bu saptanma yüzdesi Orta Afrika'da %5,9 (1/17), Doğu Afrika'da %7,1 (1/14) bulunmuştur. Bölgelere göre 74,75,76,86,102,184,1042 genlerinin dağılımları ayrı ayrı incelendiğinde wild kodon ve SNP dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ($p>0,05$) Mutasyonların yüzdesel olarak bölgelerdeki kümelenme farklılıklarına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamayışı, olgularımızın sınırlı örneklem büyüklüğü ve bölgeler arasındaki örneklem eşitsizliği ile ilişkili olabilir. Çalışmalarda örnek sayısının artırılması ve bölgeler arası eşitliğin sağlanması epidemiyolojik veriler ve kliniğe yansıyacak etkileri açısından önemlidir.

*Pf*K13 mutasyonlarının; sıtma tedavisinde birincil ilaç olan artemisinin parazit klirensinin *in vivo* ve *in vitro* olarak gecikmesine neden olduğu ve artemisin direncinde rol oynadığı belirlenmiştir. Bugüne kadar *P. falciparum* izolatlarının *Pf*K13 geninde 200'den fazla SNP tespit edilmiştir; bunlardan 9 SNP'nin *in vitro* ve *in vivo* verilerle direnç mutasyonları ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Güneydoğu Asya'da daha sık saptanan *Pf*K13 mutasyonları Afrika'da hala nadir görülmektedir (40). Doğu Afrika Bölgesi'nde Ruanda (R561H) ve Uganda (C469Y ve A675V) ve Eritre'de (R622I) artemisinin kısmi direncinin ortaya çıktığına dair kanıtlar bulunmaktadır (3). Artemisinin direnci ile ilişkisi henüz raporlanamamış olmasına rağmen Afrika'da en sık görülen allel ise A578S olmuştur (40). Farklı çalışmalar ile Afrika'da bildirilen bu mutasyonlar, Afrika *Plasmodium* popülasyonlarında henüz yaygınlaşamamıştır. Çalışmamızdaki örneklerde *Pf*K13 geninin 440.'ncı kodondan 700. kodona kadar sekans verileri incelenmiştir ve sadece Nijerya ve Fildişi Sahilleri kaynaklı 2 örnekte 602. kodonda SNP saptanmıştır. Kamerun'da E602D'nin tanımlandığı bir örnekte dihidroartemisinin *in vitro* IC_{50} (the calculation of 50% inhibitory concentration) değerinin saptandığı bir çalışmada E602D'nin artemisinin direncindeki rolü belirlenememiştir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan örnek 2003 yılına ait olduğundan ve Kamerun'da AKT kullanımına 2004 yılından sonra başlandığından AKT'nin bu E602D seçilimi üzerindeki etkisi bilinmemektedir (30). Tanzanya'da AKT terapötik etkinliğin değerlendirildiği bir çalışmada E602D'nin saptandığı bir örnekte artemisinin direnci görülmemiştir (64). Çalışmamızın verileri de göstermektedir ki;

AKT'lerinin yaygın kullanımına rağmen artemisinin direncinde rol alan *Pf*K13 mutasyonları Afrika'da henüz seçilime uğramamıştır. Afrika'da Asya'ya göre *Pf*K13 mutasyonlarının yayılımının daha az olmasının altında yatan sebeplerden biri DNA onarım genlerindeki mutasyonların eksikliği olabilir. Xiong ve ark.'nın artemisinin direncinin daha fazla görüldüğü Güneydoğu Asya'da dirençli suşlar üzerine yaptıkları çalışmada artemisinine direnç gelişimini destekleyecek DNA hasar onarım genlerinde genetik farklılıklar bildirilmiştir. Bu ek mutasyonlar ile artemisinin kaynaklı oluşan DNA hasarının onarılabilmesi, mutant suşların canlılığını devam ettirebilmelerinde etkilidir (65). Stokes ve ark.'nın çalışmasında ise Afrika'daki *Pf*K13 mutantları Asya'daki mutantlarla karşılaştırıldığında, çoğu Afrika suşunda *in vitro* ''fitness costs-parazitin direnç göstermesine gerekli enerji gereksinimi'' daha yüksek saptanmıştır ve bu da Afrika'daki artemisinine direncin daha yavaş yayılmasının nedenlerinden biri olabilir (66). Artemisinin direncinin Afrika'da yayılım sonuçları ağır olacağından Asya'daki ve Afrika'daki direnç suşlarının olası farklılıklarının çalışmalarla gösterilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızın sonuçları ile de desteklenen, artemisinin direncine sebep olabilecek *Pf*K13 mutasyonlarının Afrika'da yaygın olmayışı ile artemisinin kombine tedavisi; hala sıtma tedavisinde en etkin ilaç olma özelliğini korumaktadır. *Pf*K13 mutasyonlarını saptayan genetik analizler ile artemisinin direncinin takibi kolaylaşacaktır. Ancak bu mutasyonların tek başına hareket etmediği, çoğu zaman farklı genlerdeki mutasyonlar ile sinerjistik olarak hareket ettiği de göz önünde bulundurulmalıdır (31). Artemisinin kombine tedavisinde artemisininin partner ilaçlarına karşı ek polimorfizmler de, *P. falciparum* ilaç direncine aracılık etmektedir (50). Bu sinerjik ilişkinin netleştirilebilmesi için de terapötik etkinlik ve genotipik sürveyans kapsamını belirleme çalışmalarının beraber yürütülmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, sadece laboratuvar örneklerindeki direnç mutasyonlarının irdelenip; klinik verilerle terapötik etkinliğe işaret edecek verilerin bulunmaması çalışmamızın kısıtlılıklarındandır. Klinik ayağı olan bu tür çalışmaların yapılması, artemisinin direncindeki mekanizmaları aydınlatarak tedavi politikalarında zamanında gerekli değişikliklerin yapılabilmesine imkân sağlayacaktır.

6. SONUÇ

Sıtmanın elimine edildiği Türkiye'ye, endemik olan Afrika ülkelerinden seyahat ile gelerek tanı alan vakaların arşivlenmiş olan numunelerinin kullanıldığı bu tez çalışmamızda, *P. falciparum*'un ilaç direnci ile ilişkili *Pf*crt, *Pf*mdr1, *Pf*K13 mutasyonları analiz edilmiştir.

1. *Pf*mdr1 %74,5 prevalans değeri ile en yüksek mutasyon oranı olarak saptanmıştır.
2. *Pf*crt prevalansı %12,2 saptanmıştır.
3. *Pf*K13 geninde ise sadece 2 örnekte E602D mutasyonu saptanmıştır.
4. Çalışmamız kapsamında Afrika kıtası örneklerinde 1246. kodonlarda mutasyon saptanmaması ve Y184F mutasyonlu izolatların yabanıl tipe göre daha baskın bulunması (prevalans %74,7), N86Y, N1042D ve *Pf*crt mutasyonlu izolatların ise yabanıl tipe göre daha az oranda saptanması, diğer çalışmalardaki genetik profil sonuçlarını desteklemektedir.
5. CQ kullanımının azalması ve birinci basamak tedavi olarak AL'nin kullanılması zaman içindeki CQ duyarlı fenotiplere geri dönüşü vurgular niteliktedir. Aynı zamanda AL kullanımının artması ile bu kombinasyondaki ilaçları duyarlılaştıran mutasyonların azalması yönündeki seçilim ilerleyen dönemde AKT ile tedavi sonrası başarısızlık oranlarının artışını gündeme getirebilir.
6. Çalışmamızda artemisin ilaç direnci ile ilişkilendirilemeyen E602D SNP'sinin sadece 2 örnekte saptanması yanında; artemisinin ilaç direnci ile ilişkili olan *Pf*K13 mutasyonlarının saptanamamış olması bu mutasyonların, Afrika kaynaklı *Plasmodium falciparum* popülasyonunda henüz yaygın olmadığını ve AKT tedavilerinin hala en etkin ilaç olma özelliğini koruduğunu göstermektedir. *Pf*K13 mutasyonlarını saptayan genetik analizlerin devamı, artemisinin direncinin takibi ve tedavi politikalarında da zamanında değişiklikler yapılabilmesini sağlayacaktır.
7. Çalışmamızda Y184F'in Doğu Afrika bölgesinde diğer bölgelere nazaran daha yüksek oranda olduğu gözlenmiştir. *Pf*crt mutasyonu ise Batı Afrika menşeli örneklerde daha fazla sayıda bulunmuştur. Bölgelere göre 74,75,76,86,102,184,1042 genlerinin dağılımları ayrı ayrı incelendiğinde wild kodon ve SNP dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. Mutasyonların yüzdesel olarak bölgelerdeki kümelenme farklılıklarına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamayışı, olgularımızın sınırlı örneklem

büyüklüğü ve bölgeler arasındaki örneklem eşitsizliği ile ilişkili olabilir. Çalışmalarda örnek sayısının artırılması ve bölgeler arası eşitliğin sağlanması epidemiyolojik veriler ve kliniğe yansıyacak etkileri açısından önemlidir.

Antimalaryal ilaç direnç markerlarında bulunan SNP çeşitliliği, kullanılan kombine ilaçlar ve SNP'lerin bu ilaçların terapötik etkinlikleri ile ilişkileri animalaryal ilaç direnç çalışmalarını komplike hale getirmektedir. Direncin yayılmasının ciddi sonuçları olacağından bu analizin bir ayağını oluşturan SNP'lerin saptanması ve bu çalışmaların düzenli olarak uygulanması; sıtma tedavisinde etkili olan ilaçların dolayısı ile küresel sıtma eliminasyon stratejilerinin belirlenmesine önemli veriler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lekana-Douki JB, Boundenga L. Genotyping for Plasmodium spp.: Diagnosis and Monitoring of Antimalarial Drug Resistance. Genotyping. 2018;
2. She D, Wang Z, Liang Q, Lu L, Huang Y, Zhang K, et al. propeller genes in imported falciparum malaria isolates from Africa in Guizhou province , China. BMC Infect Dis. 2020;513(20):1–8.
3. WHO. Word Malaria Report 2021. Word Malaria report Geneva: World Health Organization. (2021). Licence: CC. 2021.
4. T.C Sağlık Bakanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları BULAŞICI HASTALIKLAR LABORATUVAR TANI REHBERİ. 2014.
5. White NJ. Malaria. Manson's Trop Dis Twenty-Third Ed. 2013;532–600.
6. Recep Akdur Ankara Üniversitesi Halk Sağlığı AD Başkanı PT. Sıtma Ve Sıtma Salgınları Tarihi. 2006.
7. Özbilgin A, Topluoglu S, Es S, Islek E, Mollahaliloglu S, Erkoc Y. Malaria in Turkey: Successful control and strategies for achieving elimination. Acta Trop. 2011;120(1–2):15–23.
8. WHO. World Malaria Report 2020. World Health Organization. World Health. 2020.
9. World Health Organization. Guidelines for he treatment of malaria. WHO. 2015;
10. World Health Organization. WHO Guidelines for malaria - 16 february 2021. 2021;210. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-UCN-GMP-2021.01
11. Koruk ST. Sıtma. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hast ve Mikrobiyolojisi 4 baskı. 2017;887–903.
12. Özcel MA. Sıtma. Özcel'in Tıbbi Parazit Hast. 2007;79–133.
13. Sosa N, Suarez JA. Malaria. Conn's Curr Ther 2021. 2021;(Figure 2):606–15.
14. Miman Ö, Saygı G. Bölüm 2: Protozoonlar. Temel Tıbbi Parazitoloji. 2017;88–108.
15. Fritsche TR, Pritt BS. Chapter 63 - Medical Parasitology [Internet]. Twenty Thi. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Inc.; 2017. 1231-1283.e3 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-

323-29568-0.00063-2

16. Dondorp AM, Seidlein L Von. SECTION 6 International Medicine: Major Tropical Syndromes: Systemic Infections, Malaria. Infect Dis Ed. 2017;1014–25.
17. Fairhursta RM, Wellems TE. Plasmodium Species (Malaria). Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis Ninth Ed [Internet]. Ninth Edit. 2019;3299–320. Available from: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48255-4.00274-5
18. Who. Universal access to malaria diagnostic testing: An operational manual. WHO Press. 2011;12(1):31A.
19. Arı Ş. DNA'nın PCR ile Çoğatılması. In: Temizkan G, Arda N, editors. Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri- Genomik ve Proteomik Analizler. 2017. p. 291–307.
20. Andy V. Principle of the PCR [Internet]. [cited 2021 Sep 4]. Available from: https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html
21. SevİndİK E. Nested PCR ve Kullanım Alanları Nested PCR and Applications Area. 2013;6(2):22–6.
22. Nolte FS, Hill CE. Polymerase Chain Reaction and Other Nucleic Acid Amplification Technology [Internet]. Twenty Fou. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier; 2011. 1271–1281 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-67320-4.00069-9
23. Gürel F. Gerçek Zamanlı PCR ile Gen Anlatımının Analizi. In: Temizkan G, Arda N, editors. Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri- Genomik ve Proteomik Analizler. 2017. p. 399–412.
24. Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase chain reaction. Vol. 58, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 1996. 275–292 p.
25. Introduction to PCR Primer & Probe Chemistries | Bio-Rad Laboratories [Internet]. [cited 2021 Sep 4]. Available from: https://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/introduction-pcr-primer-probe-chemistries?ID=LUSOJW3Q3
26. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611–22.

27. The phases and components of a PCR curves: (1) baseline, (2)... | Download Scientific Diagram [Internet]. [cited 2021 Sep 4]. Available from: https://www.researchgate.net/figure/The-phases-and-components-of-a-PCR-curves-1-baseline-2-exponential-phase-3_fig6_281382551
28. Cdc CFDC and P. Treatment of Malaria (Guidelines For Clinicians). Treat Malar (Guidelines Clin. 2020;(July):1–8.
29. Brody's Human Pharmacology - ClinicalKey [Internet]. [cited 2021 Sep 10]. Available from: https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323476522000636?scrollTo=%23hl0000330
30. Djaman JA, Olefongo D, Ako AB, Roman J, Ngane VF, Basco LK, et al. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon and Côte d'Ivoire. XXXI. Kelch 13 propeller sequences in plasmodium falciparum isolates before and after implementation of artemisinin-based combination therapy. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(1):222–4.
31. Marfurt J, Smith TA, Hastings IM, Müller I, Sie A, Oa O, et al. Plasmodium falciparum resistance to anti-malarial drugs in Papua New Guinea: Evaluation of a community-based approach for the molecular monitoring of resistance. Malar J. 2010;9(1):1–11.
32. Elbadry MA, Existe A, Victor YS, Memnon G, Fukuda M, Dame JB, et al. Survey of Plasmodium falciparum multidrug resistance-1 and chloroquine resistance transporter alleles in Haiti. Malar J. 2013;12(1):1–6.
33. Mkulama MAP, Chishimba S, Sikalima J, Rouse P, Thuma PE, Mharakurwa S. Escalating Plasmodium falciparum antifolate drug resistance mutations in Macha, rural Zambia. Malar J. 2008;7:4–7.
34. Gadalla NB, Elzaki SE, Mukhtar E, Warhurst DC, El-Sayed B, Sutherland CJ. Dynamics of pfcrt alleles CVMNK and CVIET in chloroquine-treated Sudanese patients infected with Plasmodium falciparum. Malar J. 2010;9(1):1–10.
35. Gadalla NB, Elzaki SE, Mukhtar E, Warhurst DC, El-Sayed B, Sutherland CJ. Dynamics of pfcrt alleles CVMNK and CVIET in chloroquine-treated Sudanese patients infected with Plasmodium falciparum. Malar J 2010 91 [Internet]. 2010 Mar 12 [cited 2021 Sep 23];9(1):1–10. Available from: https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-9-74

36. Chaijaroenkul W, Ward SA, Mungthin M, Johnson D, Owen A, Bray PG, et al. Sequence and gene expression of chloroquine resistance transporter (pfcrt) in the association of in vitro drugs resistance of Plasmodium falciparum. Malar J. 2011;10:1–9.
37. Veiga MI, Dhingra SK, Henrich PP, Straimer J, Gnädig N, Uhlemann AC, et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate Plasmodium falciparum susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun. 2016;7(May).
38. Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. Different mutation patterns of atovaquone resistance to Plasmodium falciparum in vitro and in vivo: Rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential in vivo resistance marker. Malar J. 2003;2:1–7.
39. Mugittu K, Genton B, Mshinda H, Beck HP. Molecular monitoring of Plasmodium falciparum resistance to artemisinin in Tanzania. Malar J. 2006;5:3–5.
40. WHO. Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy (August 2018). World Heal Organ [Internet]. 2018;(August):10. Available from: https://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin-resistance-august2018/en/
41. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - Travelers - Choosing a Drug to Prevent Malaria. 2019;
42. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium spp. J Clin Microbiol [Internet]. 2005;43(5):2435–40. Available from: https://journals.asm.org/journal/jcm
43. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5636–43.
44. Kassaza K, Operario DJ, Nyehangane D, Coffey KC, Namugosa M, Turkheimer L, et al. Detection of plasmodium species by high-resolution melt analysis of DNA from blood smears acquired in Southwestern Uganda. J Clin Microbiol

[Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Jul 14];56(1). Available from: https://doi.org/10.1128/JCM

45. Lima A. Malaria diagnosis from pooled samples • Giselle FMC.
46. Iglesias N, Subirats M, Trevisi P, Ramírez-Olivencia G, Castán P, Puente S, et al. Performance of a new gelled nested PCR test for the diagnosis of imported malaria: Comparison with microscopy, rapid diagnostic test, and real-time PCR. Parasitol Res. 2014;113(7):2587–91.
47. Adamu A, Jada MS, Haruna HMS, Yakubu BO, Ibrahim MA, Balogun EO, et al. Plasmodium falciparum multidrug resistance gene-1 polymorphisms in Northern Nigeria: implications for the continued use of artemether-lumefantrine in the region. Malar J. 2020;19(1).
48. Wamea K. crossm Resistance-Conferring Mutations over a 24-Year Analysis in Coastal Kenya but a Near Complete Reversion to Chloroquine-. 2019;63(12):1–12.
49. Mbogo GW, Nankoberanyi S, Tukwasibwe S, Baliraine FN, Nsobya SL, Conrad MD, et al. Temporal changes in prevalence of molecular markers mediating antimalarial drug resistance in a high malaria transmission setting in Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2014;91(1):54–61.
50. Asua V, Conrad MD, Aydemir O, Duvalsaint M, Legac J, Duarte E, et al. Changing Prevalence of Potential Mediators of Aminoquinoline, Antifolate, and Artemisinin Resistance across Uganda. J Infect Dis. 2021;223(6):985–94.
51. Picot S, Olliaro P, De Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria. Malar J. 2009;8(1):1–15.
52. Sidhu ABS, Valderramos SG, Fidock DA. pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum. Mol Microbiol. 2005 Aug;57(4):913–26.
53. Jalousian F, Dalimi A, Samiee SM, Ghaffarifar F, Soleymanloo F, Naghizadeh R. Mutation in pfmdr1 gene in chloroquine-resistant Plasmodium falciparum isolates, Southeast Iran. Int J Infect Dis. 2008;12(6):630–4.
54. Sisowath C, Petersen I, Veiga MI, Mårtensson A, Premji Z, Björkman A, et al.

In Vivo Selection of Plasmodium falciparum Parasites Carrying the Chloroquine-Susceptible pfcrt K76 Allele after Treatment with Artemether-Lumefantrine in Africa. 2009; Available from: https://academic.oup.com/jid/article/199/5/750/903128

55. Mårtensson A, Strömberg J, Sisowath C, Msellem MI, Gil JP, Montgomery SM, et al. Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood Plasmodium falciparum malaria in Zanzibar, Tanzania. Clin Infect Dis. 2005;41(8):1079–86.
56. Dokomajilar C, Nsobya SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G. Selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(5):1893–5.
57. Duah NO, Matrevi SA, De Souza DK, Binnah DD, Tamakloe MM, Opoku VS, et al. Increased pfmdr1 gene copy number and the decline in pfcrt and pfmdr1 resistance alleles in Ghanaian Plasmodium falciparum isolates after the change of anti-malarial drug treatment policy. Malar J. 2013;12(1):1–10.
58. Fidock D. Mutations in the P. falciparum Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. Mol Cell. 2000;6(4):861–71.
59. Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in Plasmodium falciparum. Int J Parasitol [Internet]. 2010;40(10):1109–18. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.001
60. Rasmussen C, Ringwald P. Continued low efficacy of artemether-lumefantrine in Angola? Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(6):1–7.
61. Sa JM, Twu O. Protecting the malaria drug arsenal: halting the rise and spread of amodiaquine resistance by monitoring the PfCRT SVMNT type. Malar J [Internet]. 2010;9:374. Available from: http://www.malariajournal.com/content/9/1/374
62. Ariey F, Fandeur T, Durand R, Randrianarivelojosia M, Jambou R, Legrand E, et al. Invasion of Africa by a single pfcrt allele of South East Asian type. Malar J. 2006;5:1–5.

63. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam RAG, Wirima JJ, Kazembe PN, et al. Reemergence of Chloroquine-Sensitive Plasmodium falciparum Malaria after Cessation of Chloroquine Use in Malawi [Internet]. Vol. 187, The Journal of Infectious Diseases. 2003. Available from: https://academic.oup.com/jid/article/187/12/1870/2191300

64. Kakolwa MA, Mahende MK, Ishengoma DS, Mandara CI, Ngasala B, Kamugisha E, et al. Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy, and molecular markers for artemisinin and piperaquine resistance in Mainland Tanzania ACTRN12615000159550 ACTRN. Malar J [Internet]. 2018;17(1):1–10. Available from: https://doi.org/10.1186/s12936-018-2524-x

65. Xiong A, Prakash P, Gao X, Chew M, Tay IJJ, Woodrow CJ, et al. K13-Mediated Reduced Susceptibility to Artemisinin in Plasmodium falciparum Is Overlaid on a Trait of Enhanced DNA Damage Repair. Cell Rep [Internet]. 2020;32(5):107996. Available from: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107996

66. Stokes BH, Dhingra SK, Rubiano K, Mok S, Straimer J, Gnädig NF, et al. Plasmodium falciparum k13 mutations in africa and asia impact artemisinin resistance and parasite fitness. Elife. 2021;10:1–29.