

Türkiye'deki İlk Maymun Sıtması: Bir *Plasmodium knowlesi* Olgusu

The First Monkey Malaria in Turkey: A Case of *Plasmodium knowlesi*

Ahmet ÖZBİLGİN¹, İbrahim ÇAVUŞ¹, Ahmet YILDIRIM¹, Cumhur GÜNDÜZ²

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

¹ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Manisa, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, İzmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 26.02.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.07.2016

ÖZ

İnsanda sıtma etkeni olarak bilinen dört *Plasmodium* türüne (*P.vivax*, *P.falciparum*, *P.malariae*, *P.ovale*), son zamanlarda özellikle Güneydoğu Asya ülkelerinde bildirimi artmaya başlayan *P.knowlesi* de eklenmiştir. *P.knowlesi* makak maymunlarının (*Macaca fascicularis* ve *M.nemestrina*) sıtma etkeni olup, insana özellikle *Anopheles leucosphyrus* ve *An.hackeri* sivrisinekleri ile bulaşmaktadır. İlk kez Malezya'da ortaya çıkan *P.knowlesi* sıtması olgularının sayıları giderek yükselmiş; Tayland, Filipinler, Burma (Myanmar), Singapur ve Vietnam gibi birçok Güneydoğu Asya ülkesinden de olgular rapor edilmiş; batı ülkelerinde ise sadece az sayıda gezginde tanımlanmıştır. Bu raporda, ülkemizde ilk kez tanımlanan yurtdışı kaynaklı bir *P.knowlesi* sıtması olgusunun sunulması ve bundan sonra da görülebileceği konusuna dikkat çekilmesi amaçlanmıştır. Burma'dan ülkemize mülteci olarak gelmiş 33 yaşında erkek hasta, 24 saate bir yükselen ateş, kas ve eklem ağrıları, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık, boğaz ağrısı ve öksürük şikayetleriyle bir sağlık kuruluşuna başvurmuştur. Olguya üst solunum yolu enfeksiyonu ön tanısı konulmuş; ancak periyodik ateş ve yurtdışı öyküsü olması nedeniyle hazırlanan ince yayma ve kalın damla kan preparatları ileri inceleme için laboratuvarımıza gönderilmiştir. İnce yayma kan preparatlarının mikroskopik incelemesinde, *P.knowlesi*'ye uyan eritrositer formlar (bir eritrosit içinde üç adet büyük genç trofozoit formu, kompakt görünümlü üç adet olgun trofozoit ve bant formunda üç adet olgun trofozoit) görülmüştür. Bunun üzerine *Plasmodium* cinsine ait küçük altünite ribozomal RNA (SSU-rRNA) genini hedefleyen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ve ayrıca *P.knowlesi*'nin rRNA bölgesine DNA dizi analizi uygulanmıştır. Böylece mikroskopik olarak şüphelenilen *P.knowlesi* tanısı, Rt-PCR ve dizi analizi sonucunda doğrulanmıştır. Olguya klorokin ve primakin kombine tedavisi uygulanmış ve yedi gün sonra yapılan kontrolde parazitemisinin kaybolduğu ve şikayetlerinin geçtiği görülmüştür. Ülkemizde daha önce, farklı *Plasmodi-*

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Ahmet Özbilgin, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 532 134 3531, **E-posta (E-mail):** a.ozbilgin@yahoo.com

um türlerinin tespit edildiği yurtdışı kaynaklı birçok olgunun bildirilmesine rağmen, *P.knowlesi* sıtmasına hiç rastlanmamıştır. Bu raporda sunulan ilk olgu, özellikle artan göçler nedeniyle bundan sonra *P.knowlesi* sıtmasının da görülebileceğini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: Sıtma; *Plasmodium knowlesi*; Türkiye.

ABSTRACT

Plasmodium knowlesi is now added to the known four *Plasmodium* species (*P.vivax*, *P.falciparum*, *P.malariae*, *P.ovale*) as a cause of malaria in humans because of the recent increasing rate of cases reported from countries of southeastern Asia. *P.knowlesi* which infects macaque monkeys (*Macaca fascicularis* and *M.nemestrina*) is transmitted to humans especially by *Anopheles leucosphyrus* and *An.hackeri* mosquitos. First human cases of *P.knowlesi* malaria have been detected in Malaysia which have reached high numbers in recent years and also have been reported from countries of Southeast Asia such as Thailand, Philippines, Myanmar, Singapore and Vietnam. However the number of cases reported from western countries are rare and limited only within voyagers. This report is the first presentation of an imported case of *P.knowlesi* malaria in Turkey and aims to draw attention to the point that it could also be detected in future. A 33-year-old male patient from Myanmar who has migrated to Turkey as a refugee, was admitted to a health center with the complaints of fever with a periodicity of 24 hours, headache, fatigue, cough, sore throat, anorexia, myalgia and arthralgia. He was prediagnosed as upper respiratory tract infection, however because of his periodical fever and background in Myanmar, thick and thin blood films were prepared and sent to our laboratory for further examinations. Microscopic examination of the thin blood films revealed erythrocytic stages compatible with *P.knowlesi* (three large early trophozoites in an erythrocyte, three late trophozoites with compact view, and three late band-form trophozoites). Upon this, both real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) targeting the small subunit ribosomal RNA (SSU-rRNA) genes of *Plasmodium* genus and DNA sequence analysis targeting *P.knowlesi* rRNA gene were performed. As a result, the suspected identification of *P.knowlesi* by microscopy was confirmed by Rt-PCR and DNA sequencing. The patient was treated with chloroquine and primaquine combination and in the follow-up on the seventh day after the treatment, his parasitemia and symptoms had ceased. Although there were some previous reports concerning about imported patients infected with different *Plasmodium* species in our country, no cases of *P.knowlesi* have been reported. This first case presented here emphasizes the occurrence of *P.knowlesi* malaria in Turkey hereinafter due to the increasing number of refugees.

Keywords: Malaria; *Plasmodium knowlesi*; Turkey.

GİRİŞ

Sıtma, tropikal ve subtropikal bölgelerde sık görülen ve günümüzde dünyada en sık ölüme neden olan paraziter bir hastalıktır. Dünyada her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle hayatını kaybettiği, dünya nüfusunun %40'ının sıtma riski altında olduğu, her yıl 300 milyon insanın sıtma ile enfekte olduğu ve yaklaşık 1-3 milyon kişinin sıtma nedeniyle öldüğü bildirilmektedir¹. Dünya Sağlık Örgütü sıtmayı önemli bulaşıcı hastalıklar kapsamında tüberküloz ve AIDS ile birlikte ilk üç içinde değerlendirmektedir.

Sıtmaya neden olan *Plasmodium* cinsi içinde, günümüze kadar memeli, kuş ve sürgüngenleri enfekte eden 150'den fazla tür tanımlanmıştır². İnsan-dışı primatlarda sıtma etkenleri olan *P.cynomolgi* Güneydoğu Asya'da; *P.brasilianum* ve *P.simum* ise Güney Amerika'da sivrisinekler ile insanlara bulaşan önemli ve potansiyel zoonozlardır^{1,2}. İnsan-

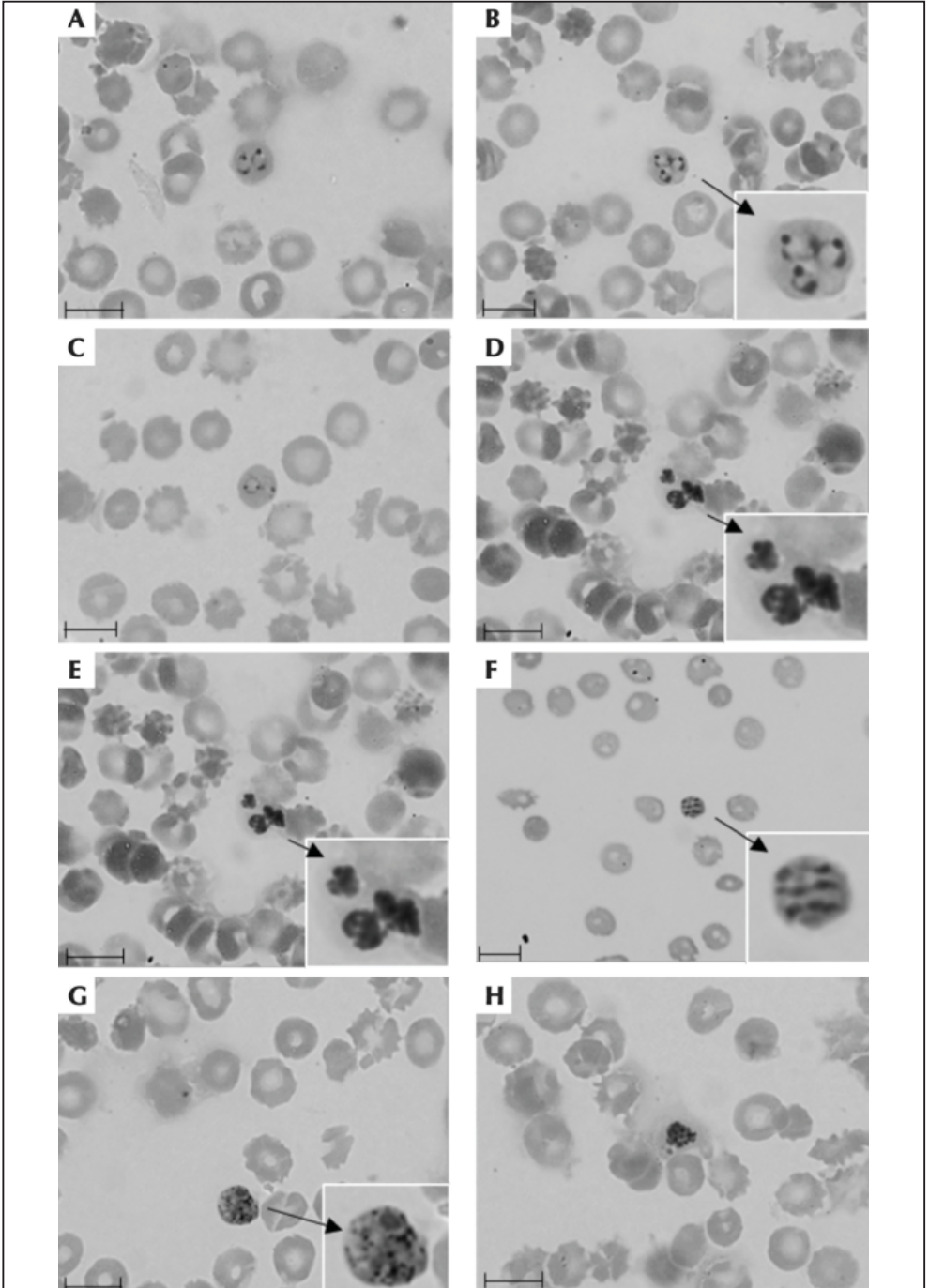
da sıtmaya neden olduğu bilinen dört *Plasmodium* türüne (*P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malaria* ve *P.ovale*) ilaveten, 2004 yılında Borneo (Malezya)'da *P.knowlesi* enfeksiyonlarına çok sayıda rastlanması ve Güneydoğu Asya ülkelerinde de insan olguları ile karşılaşılması nedeniyle, *P.knowlesi*'nin insanlarda sıtmaya neden olan beşinci tür olduğu bildirilmiştir^{3,4}. Sıtmanın ilk doğal konaklarının Malezya ve Singapur'da yaşayan makaklar (*Macaca fascicularis* ve *Macaca nemestrina*) olduğu belirtilmektedir⁵. Dağılım alanları makaklarla kesişen ormanlarda yaşayan *Anopheles leucosphyrus* ve *An.hackeri* sivrisinekleri, *P.knowlesi* sıtmasının vektörleridir ve deneysel enfeksiyonlarda *P.knowlesi* sıtmasının insandan insana, maymundan insana ve insandan maymuna geçişinde rol aldıkları saptanmıştır⁵⁻⁷. *P.knowlesi* sıtmasına genellikle çiftçiler, avcılar ve orman işçileri gibi orman ve orman kenarlarında zaman geçiren yetişkinlerde yüksek oranda rastlandığı bildirilmiştir⁸.

İnsanlarda *P.knowlesi* olgularının ilk olarak 2004 yılında Borneo'da ortaya çıkmasının ardından, benzer olgular Tayland, Filipinler, Burma (Myanmar), Singapur, Vietnam, Endonezya, Brunei ve Kamboçya'da da görülmüştür⁹⁻¹⁶. *P.knowlesi* enfeksiyonlarının mikroskobik olarak doğru teşhis edilememesi ve moleküler tanı yöntemlerini uygulayan merkezlerin az olması nedeniyle Güney Asya ülkelerinde *P.knowlesi*'nin yaygınlığı kesin olarak belirlenmiş değildir. *P.knowlesi* sıtması ile ilgili olarak epidemiyolojik ve klinik tabloları hakkında veriler sınırlı sayıdaki araştırmalara dayanmaktadır^{3,4,9,15,17}. Bu olgu, ülkemizde yurtdışı kaynaklı ilk maymun sıtması olgu olması ve bundan sonra da rastlanabileceğini vurgulamak amacıyla sunulmuştur.

OLGU SUNUMU

Avrupa'ya mülteci olarak geçmeyi planlayan 33 yaşında erkek olgu, Burma (Myitkyina, Myanmar)'dan ülkemize geldiğinin 12. gününde, dört gündür süren 24 saatte bir yükselen ateş, kas ve eklem ağrıları, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık, boğaz ağrısı ve öksürük şikayetleri ile bir sağlık kuruluşuna başvurmuştur. Olguya bu şikayetleri nedeniyle üst solunum yolu enfeksiyonu ön tanısı konulmuştur. Kan preparatlarında *Plasmodium*lara benzer yapılar görülmesi, ateş ve yurtdışı öyküsü olması nedeniyle ince yayma ve kalın damla preparatları laboratuvarımıza gönderilmiştir. Laboratuvarımıza ulaşan ince yayma kan preparatı metanol ile tespit sonrası, kalın damla preparatı ise direkt olarak Giemsa ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda (100X büyütme) *Plasmodium* varlığı açısından değerlendirilmiştir. İnce yayma preparatların mikroskobik incelemesinde *P.knowlesi*'ye uyan eritrositer formlar görülmüş (Resim 1), bunun üzerine *Plasmodium* cinsine ait küçük altünite (small-subunit) ribozomal RNA (SSU-rRNA) genini hedefleyen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) uygulanmıştır.

Materyalden DNA izolasyonu için, ince yayma ve kalın damla preparatları steril bir petri kabı içerisine steril bistüri ile kazınmış ve üzerine 200 µl serum fizyolojik konularak materyal pipet yardımıyla ependorf tüp içerisine aktarılmıştır. *Plasmodium* DNA'sı, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, ABD) ile kit kullanım klavuzuna göre izole edilmiştir. *P.falciparum*, *P.ovale*, *P.malariae* ve *P.vivax*'ın moleküler tanısı için Rougemont ve arkadaşlarının¹⁸ kullandığı 18S rRNA gen bölgesine özgül primer ve prob kullanılmış;



Resim 1. Olgunun ince yayma kan preparatında *P.knowlesi*, genç trofozoit (a-c), olgun trofozoit (d-f), genç şizont (g), Olgun şizont (h), ($\times 100$ büyütme, bar 10 μ m).

P.knowlesi için prob tarafımızdan tasarlanmıştır. Buna göre, ileri primer GTTAAGGGAGT-GAAGACGATCAGA; ters primer AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA ve prob FAM-AGAGTTTTCTTTCTCTCCGGAGATTAGAAC-TAMRA olarak kullanılmıştır. İki mikrolitre DNA, primer, prob ve LightCycler Taqman Master Mix'den (Roche, ABD) 7 µl kullanılarak, PCR ile amplifiye edilmiştir. Genotiplendirme 5' ekzonükleaz aktivitesi yöntemiyle Rt-PCR'da (LightCycler 480) amplifikasyonun belirlenmesi ile yapılmıştır. Ayrıca aynı primerler kullanılarak çoğaltılan amplicona Sanger dizilemesi de uygulanmıştır.

Moleküler inceleme sonunda, tür ayrımı için yapılan *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* ve *P.malariae* Rt-PCR negatif sonuç verirken, *P.knowlesi*'nin SSU-rRNA genini hedefleyen Rt-PCR pozitif bulunmuştur. PCR ürününe yapılan gen dizi analizinin de *P.knowlesi* ile uyumlu olduğunun saptanması üzerine, etken *P.knowlesi* olarak tanımlanmıştır.

Olguya klorokin+primakin tedavisi (1 ve 2. günlerde, günde 600 mg klorokin baz, 3. gün 300 mg klorokin baz; bu tedaviye ek olarak 1. günden başlayarak klorokin'le birlikte 14 gün, günde 15 mg baz primakin) uygulanmıştır. Tedavi bitiminden sonra yedinci günde incelenen kontrol preparatlarında parazitemisinin kaybolduğu ve şikâyetlerinin geçtiği görülmüştür.

TARTIŞMA

İnsanda bildirilen ilk *P.knowlesi* enfeksiyonuna bağlı sıtma olgusu¹⁹, 1965 yılında Malezya'dan Amerika'ya dönen bir turist olup, son 10 yıl içerisinde bildirilen 120 insan olgusunun da büyük çoğunluğu Borneo (Malezya) kaynaklıdır^{3,20,21}. Son yıllarda Güney Asya'da *P.knowlesi* enfeksiyonlarının insandaki sıklığında bir artış görüldüğü bildirilmekle birlikte, batı ülkelerinde *P.knowlesi* enfeksiyonu 10 kadar turistte tanımlanmıştır^{3,22}. Malezya'da *P.knowlesi* sıtması olan hastalarda, 24 saatte bir ateş ve üşüme belirtilerinin görüldüğü; özgül olmayan bir febril hastalık tablosu ile baş ağrısı, titreme, halsizlik, kas ağrısı, karın ağrısı, nefes darlığı ve öksürüğün de diğer yaygın bulgular arasında yer aldığı bildirilmiştir^{20,23,24}. Sunulan bu olguda da *P.knowlesi* sıtmasına ait bulgular görülmüş olmakla birlikte, olguya her gün yükselen ateş, kas ve eklem ağrıları, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık, boğaz ağrısı ve öksürük şikâyetleri nedeniyle üst solunum yolu enfeksiyonu ön tanısı konmuştur.

P.knowlesi'nin eritrositer formları, morfolojik olarak *P.malariae* ve *P.falciparum*'un eritrositer formlarına büyük benzerlik göstermektedir. *P.knowlesi* genç trofozoitlerinin *P.falciparum*'a ve diğer tüm aşamalarının *P.malariae*'ya benzemesi nedeniyle, mikroskopik incelemede yanlış olarak *P.malariae* tanısının kolaylıkla konulabildiği bildirilmektedir^{3,20,22-26}. Bizim olgumuzun ince yayma kan preparatının incelenmesinde, *P.falciparum*'un genç trofozoitlerine benzer morfolojik yapıya sahip, bir eritrosit içerisinde birden fazla genç trofozoitin bulunduğu, ancak bu formların *P.falciparum* genç trofozoitlerine oranla daha büyük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca olgun trofozoit formlarının, *P.malariae*'nin olgun trofozoit formlarında olduğu gibi bant şeklinde gözlenmesi ve olgunun Güney Asya'dan gelmiş olması nedeniyle *P.knowlesi* enfeksiyonundan şüphelenilmiştir. Dolayısıyla, ince yayma kan preparatında; bir eritrositte *P.falciparum*'dan büyük üç adet genç trofozoit formunun olması (Resim 1.b), kompakt görünümlü üç adet olgun trofozoitin bulunması

(Resim 1.d) ve eritrositi boydan boya kat eden kuşak şeklinde üç adet olgun trofozoitin görülmesi (Resim 1.f), bu parazitin *P. malaria* ve *P. falciparum*'dan farklı olarak *P. knowlesi* olabileceğini düşündürmüştür²⁶. Kısacası, bizi *P. falciparum* ve *P. malaria* sıtmasından uzaklaştıran noktalar; periferik kanda *P. falciparum*'un genç trofozoit ve gametosit formlarının dışında normalde diğer formlarının görülmemesi ve bir eritrositte üçlü yoğun boya alan yapıda ve yine üçlü bant şeklindeki genç trofozoitlerin görülmesi¹⁷ olmuştur. Kesin tanı amacıyla Rt-PCR ve gen dizi analizi yapılarak olguya *P. knowlesi*'ye bağlı maymun sıtması tanısı konmuştur.

P. knowlesi sıtmasının tedavisinde ilk olarak klorokin kullanılmış¹⁹, ancak Malezya'dan bildirilen olgularda, başlıca gametosidal etkili ilaç olarak bilinen primakin ile klorokin kombinasyonunun daha etkili olduğu bildirilmiştir^{3,24,25}. Bizim olgumuza da klorokin+primakin oral tedavisi uygulanmış ve yedi gün sonra yapılan kan preparatlarında parazitemiye rastlanmamıştır.

Bilindiği üzere, son yıllarda gerek turistik seyahatlerde, gerekse komşu ülkelerdeki iç karışıklıklar ve savaşlara bağlı olarak göçlerde büyük artış yaşanmaktadır. Ülkemiz, içinde bulunduğu coğrafi konum nedeniyle, göç edenler için uygun bir geçiş ve konaklama noktası olma durumundadır. Bu nedenle ülkemizde ilk defa görülen bu olgu, bundan sonra karşılaşılabilecek bu tür sıtma enfeksiyonlarının da *P. knowlesi*'ye bağlı olabileceğinin akla getirilmesi amacıyla sunulmuştur.

TEŞEKKÜR

Moleküler tanıdaki yardım ve yönlendirmelerinden dolayı Hollanda Amsterdam Üniversitesi Tıp Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümünden Dr. Albert Bart ve Prof. Dr. Tom van Gool'a ve moleküler tanıda referans suşları sağladıklarından dolayı Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Ramasamy R. Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. Front Public Health 2014; 2:123.
2. Faust C, Dobson AP. Primate malaras: Diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium*. One Health 2015; 1: 66-75.
3. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 2004; 363(9414): 1017-24.
4. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis 2008; 46(2): 172-3.
5. Vythilingam I, Jeffery Hii J. Simian malaria parasites: Special emphasis on *Plasmodium knowlesi* and their *Anopheles* vectors in Southeast Asia. In: Manguin S (ed), *Anopheles Mosquitoes - New Insights Into Malaria Vectors*, 2013. Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/43960.pdf>
6. Peyton EL. A new classification for the *Leucosphyrus* group of *Anopheles* (Cellia). Mosq Syst 1989; 21(3): 197-205.
7. Wharton RH, Eyles DE. *Anopheles hackeri*, a vector of *Plasmodium knowlesi* in Malaya. Science 1961; 134(3474): 279-80.

8. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet 2014; 383(9918): 723-35.
9. Kantele A, Marti H, Felger I, Müller D, Jokiranta TS. Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. Emerg Infect Dis 2008; 14(9): 1434-6.
10. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. Emerg Infect Dis 2004; 10(12):2211-3.
11. Kuo MC, Chiang TY, Chan CW, Tsai WS, Ji DD. A case report of simian malaria *Plasmodium knowlesi*, in a Taiwanese traveler from Palawan Island. Taiwan Epidemiol Bull 2009; 25(3):178-91.
12. Jiang N, Chang Q, Sun X, et al. Co-infections with *Plasmodium knowlesi* and other malaria parasites, Myanmar. Emerg Infect Dis 2010; 16(9): 1476-8.
13. Jeslyn WP, Huat TC, Vernon L, et al. Molecular epidemiological investigation of *Plasmodium knowlesi* in humans and macaques in Singapore. Vector Borne Zoonotic Dis 2011; 11(2):131-5.
14. Van den Eede P, Van HN, Van Overmeir C, et al. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. Malar J 2009; 8: 249.
15. Sulistyaningsih E, Fitri LE, Löscher T, Berens-Riha N. Diagnostic difficulties with *Plasmodium knowlesi* infection in humans. Emerg Infect Dis 2010; 16(6): 1033-4.
16. Khim N, Siv S, Kim S, et al. *Plasmodium knowlesi* infection in humans, Cambodia, 2007-2010. Emerg Infect Dis 2011; 17(10): 1900-2.
17. Lee KS, Cox-Singh J, Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. Malar J 2009; 8:73.
18. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatón 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.
19. Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. Science 1965; 149(3686): 865.
20. Kantele A, Jokiranta TS. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis 2011; 52(11): 1356-62.
21. Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. *Plasmodium knowlesi*: from Malaysia, a novel health care threat. Infez Med 2012; 20(1): 5-11.
22. Müller M, Schlagenhauf P. *Plasmodium knowlesi* in travellers, update 2014. Int J Infect Dis 2014; 22: 55-64.
23. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. Clin Microbiol Rev 2013; 26(2): 165-84.
24. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, et al. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. Clin Infect Dis 2009; 49(6): 852-60.
25. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, et al. Clinical and parasitological response to oral klorokin and primakin in uncomplicated human *Plasmodium knowlesi* infections. Malar J 2010; 9: 238.
26. Barber BE, William T, Grigg MJ, et al. A prospective comparative study of knowlesi, falciparum and vivax malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium knowlesi* and *P.vivax* but no mortality with early referral and artesunate therapy. Clin Infect Dis 2013; 56(3): 383-97.