

Mikroskopide Atipik Görünümlü Dış Kaynaklı İki Sıtma Olgusunda Hızlı Test, Serolojik ve Moleküler Yöntemlerin Tanıya Katkısının Önemi

The Importance of the Contribution of Rapid Test, Serological and Molecular Methods in the Diagnosis of Two Imported Malaria Cases with Atypical Microscopy

Orçun ZORBOZAN¹, Hüsnü PULLUKÇU², Esra ATALAY ŞAHAR¹, Muhammet KARAKAVUK¹, Hüseyin CAN³, Varol TUNALI¹, Mert DÖŞKAYA¹, Nevin TURGAY¹, Seray TÖZ¹, Ahmet ÖZBİLGİN⁴

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, İzmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey.

³ Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Ege University Faculty of Science, Department of Biology, Molecular Biology Section, İzmir, Turkey.

⁴ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

⁴ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Turkey.

* Bu çalışma, XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2016, Antalya)'nde tartışmalı poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 07.06.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 03.10.2017

ÖZ

Sıtma, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak görülen ve hayatı tehdit eden bir hastalıktır. Sıtmanın endemik olarak görüldüğü bölgelere seyahat öyküsü olan ve tipik klinik belirtileri olan hastalarda ön tanı olarak sıtma düşünülmektedir. Sıtmanın laboratuvar tanısının temelini boyalı preparatların mikroskopik incelemesi oluşturmaktadır. Fakat mikroskopik inceleme ile tanı ve *Plasmodium* tür ayrımının yapılmasında zorluklar yaşanabilmektedir. Birinci olguda; ateş, üşüme-titreme şikayetleri olan ve Nijerya seyahati öyküsü bulunan 26 yaşındaki erkek olguda, ince yayma kan preparatında %1 oranında saptanan enfekte eritrositlerde klasik *Plasmodium vivax* eritrositer formlarından farklı görünüm saptanmıştır. Parazitin çekirdekleri belirgin olmayıp, kromatin veya boya tanesi şeklinde düzensiz olarak sitoplazmada yer almış, bazı eritrositlerde dağınık ve granüler, sitoplazmada noktalar şeklinde Schüffner granüllerine

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Orçun Zorbozan, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye.

Tel (Phone): +90 232 390 4916, E-posta (E-mail): orcun-zorbozan@hotmail.com

benzer nükleus parçaları, bazı *Plasmodium* eritrositer formlarının sitoplazmalarının düzensiz olduğu ve nükleuslarının olmadığı gözlenmiştir. Enfekte olan eritrositlerin hiçbirinde Schüffner granüllerine rastlanmamıştır. Hastanın periferik kan örneğinde *Plasmodium* türlerine ait antijenleri saptayabilen hızlı tanı testi (OptiMAL, DiaMed, İsviçre) ile olgumuzda *P.vivax* saptanmıştır. Multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile *P.vivax* 18S rRNA geni gösterilmiştir. Hastanın serum örneğinde Pan Malaria Antibody CELISA (CeLLabs, Pty Ltd, Brookvale, Avustralya) kiti kullanılarak *Plasmodium* türlerine karşı antikor aranmış ve hasta örneğinin optik dansite (OD) değeri pozitif kontrolün OD değerinin beş katı olarak ölçülmüştür. İkinci olgu ise 31 yaşında Nijerya'da çalıştığı öğrenilen erkek hasta olup, düşmeyen ateş, şiddetli baş ağrısı, kulaklarda ve gözlerde ağrı şikayetleriyle başvurmuş ve ince yayma kan preparatında %12 oranında saptanan enfekte eritrositlerde klasik *P.falciparum* eritrositer formlarından farklı görünüm saptanmıştır. Bazı *Plasmodium* trofozoitlerinin, *P.vivax* gibi eritrositin 1/3'ü büyüklüğünde ve granüler olmayan sitoplazmaya sahip oldukları, bazı eritrositer formların yuvarlak olduğu ve nükleus ve sitoplazmasının zor ayrıldığı, bazılarının ise hilal şeklinde görülüp nükleusların sitoplazmanın ortasına yakın yer aldığı, bazı eritrositer formların *P.vivax*'ın olgun trofozoitlerine benzer şekilde tek nükleus ve dağınık bir sitoplazma ile karakteristik bir görünümde olduğu saptanmıştır. *Plasmodium* genç trofozoitlerinin büyüklük olarak *P.vivax*'a benzemesine rağmen özellikle nükleuslarının eritrosit çeperine yapışmış formları çok miktarda gözlenmiştir. *P.falciparum* gametosit formlarına rastlanılmamıştır. Yapılan dört yaymanın sadece birinde *P.falciparum* benzeri genç trofozoite rastlanılmıştır. Hızlı tanı testi ile *P.falciparum* saptanmış ve multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile *P.falciparum* 18S rRNA geni tespit edilmiştir. ELISA testinde *Plasmodium* türlerine karşı antikor saptanmamıştır. Bu olgu sunumunda dış kaynaklı iki sıtma olgusunun laboratuvar tanısı ve *Plasmodium* tür ayrımında antijen saptayan hızlı test, serolojik ve moleküler yöntemlerin mikroskopik tanıya desteğinin önemi ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: *Plasmodium*; polimeraz zincir reaksiyonu; hızlı tanı testi.

ABSTRACT

Malaria is a widespread and life-threatening disease in tropical and subtropical regions. In patients with typical clinical symptoms, malaria is considered as a preliminary diagnosis if there is a travel history to malaria-endemic areas. The basis of the laboratory diagnosis of malaria is the microscopic examination of Giemsa stained smears. On the other hand, the diagnosis and differentiation of *Plasmodium* species with microscopic examination may have some difficulties. In the first case, a different appearance from the classical *Plasmodium vivax* erythrocytic forms in infected erythrocytes were detected in 1% of all erythrocytes in thin smear blood preparations of a 26-year-old male with complaints of fever and chills and a story of travel to Nigeria. It was observed that parasitic nuclei were not prominent, and were located in the cytoplasm irregularly as chromatin or dye particles, nucleus fragments similar to Schüffner's granules in the form of scattered and granular spots were present in some erythrocytes, the cytoplasm of some *Plasmodium* erythrocytic forms were irregular and nuclei were not seen. There were no Schüffner's granules in any of the infected erythrocytes. *P.vivax* was detected by the rapid diagnostic test (OptiMAL, DiaMed GmbH, Switzerland), which searches for the antigens of *Plasmodium* species, in the peripheral blood sample of the patients. The *P.vivax* 18S rRNA gene was also detected by the multiplex real-time polymerase chain reaction. Antibodies against *Plasmodium* species were searched by using the Pan Malaria Antibody CELISA (CeLLabs Pty Ltd, Brookvale, Australia) kit in the patient's serum sample and the optical density (OD) value of the patient sample was measured five times the OD value of the positive control. In the second case, a different appearance from the classical *P.falciparum* erythrocytic forms in infected erythrocytes were detected in 12% of all erythrocytes in thin smear blood preparations of a 31-year-old male who has been suffering from persistent fever, severe headache, pain in the eyes and was known to be working in Nigeria. It was observed that some *Plasmodium* trophozoites have 1/3 of the size of erythrocytes such as *P.vivax* and have non-granular cytoplasm, some erythrocytic forms were round and the nucleus and cytoplasm were hardly distinguished, some of them were seen as crescent and close to the nucleus of the cytoplasm and some erythrocytic forms had characteristically a single nucleus and a scattered cytoplasm, similar to mature trophozoites of *P.vivax*. Although the *Plasmodium*

young trophozoites were similar to *P.vivax* in means of magnitude, the forms in which the nuclei adhered to the erythrocyte wall were common. There were no *P.falciparum* gametocyte forms. *P.falciparum* like young trophozoite was observed only in one of the four smears. *P.falciparum* was detected by the commercial rapid diagnostic test and *P.falciparum* 18S rRNA gene was also detected by the multiplex real-time polymerase chain reaction. Antibody formation against *Plasmodium* species was not detected in the ELISA test. In these case reports, the importance of the support of rapid diagnostic tests, serological and molecular methods to microscopic diagnosis and species determination of two imported malaria cases were demonstrated.

Keywords: *Plasmodium*; polymerase chain reaction; rapid diagnostic test.

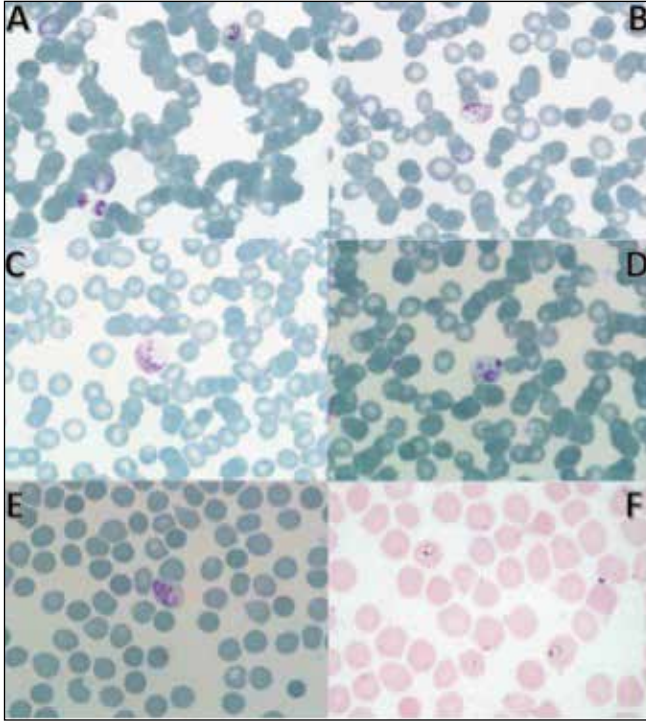
GİRİŞ

Sıtma, etkili tedavilere rağmen halen tropikal ve subtropikal bölgelerde en önemli mortalite nedenleri arasında bulunan bir hastalıktır¹. Klinik belirti ve bulguların tipik olduğu olgular ve endemik bölgelere seyahat öyküsü varlığında ön tanı olarak sıtma düşünülmektedir fakat sıtmanın kesin tanısı laboratuvar incelemeleriyle konulmaktadır. Laboratuvar tanısının esas ve ilk aşamasını boyalı preparatların mikroskopta incelenmesi oluşturmaktadır. Ancak mikroskopik inceleme ile sıtma tanısında ve *Plasmodium* tür ayrımının yapılmasında zorluklar yaşanabilmektedir². Bu çalışmada dış kaynaklı iki sıtma olgusunda etkenlerin laboratuvar tanısı ve tür ayrımında antijen saptayan hızlı test, serolojik ve moleküler yöntemlerin mikroskopik tanıya desteğinin önemi ortaya konulmuştur.

OLGU SUNUMLARI

Olgu 1

Yirmi altı yaşında erkek hasta 16.09.2016 tarihinde ateş ve titreme şikayetleriyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvurdu. Yakın dönemde Nijerya'ya seyahat ettiği öğrenilen hasta daha önce sıtma hastalığı geçirdiğini belirtti. Hastanın tetrasiklin kullandığı öğrenildi. Karaciğer enzimleri normal sınırlarda olan, trombosit sayısı 53.000/mm³ ve total bilirubin seviyesi yüksek ölçülen hasta sıtma ön tanısıyla enfeksiyon hastalıkları servisine yatırıldı. Öncelikle Giemsa ile boyalı kalın damla ve ince yayma kan preparatları incelendi. İnce yayma kan preparatlarında %1 oranında saptanan enfekte eritrositlerde klasik *Plasmodium vivax* eritrositer formlarından farklı görünüm saptandı (Resim 1F). Parazitin çekirdeklerinin belirgin olmayıp, kromatin veya boya tanesi şeklinde düzensiz olarak sitoplazmada yer aldığı gözlemlendi (Resim 1A). Bazı eritrositlerde dağınık ve granüler, sitoplazmada noktalar şeklinde Schüffner granüllerine benzer nükleus parçaları izlenirken (Resim 1B,1C) bazı *Plasmodium* eritrositer formlarının sitoplazmalarının düzensiz olduğu ve nükleuslarının görülmediği (Resim 1D,1E) tespit edildi. Enfekte olan eritrositlerin hiçbirinde Schüffner granüllerine rastlanmadı. Hastanın periferik kan örneğinde *Plasmodium* türlerine ait antijenleri saptayan hızlı tanı testi (OptiMAL, DiaMed GmbH, İsviçre) üretici firma önerileri doğrultusunda uygulandı. Bu test ile *P.vivax* saptandı (Resim 2). Multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) Şahar ve arkadaşlarının³ çalışmasında tarif edildiği şekilde uygulandı. Multipleks



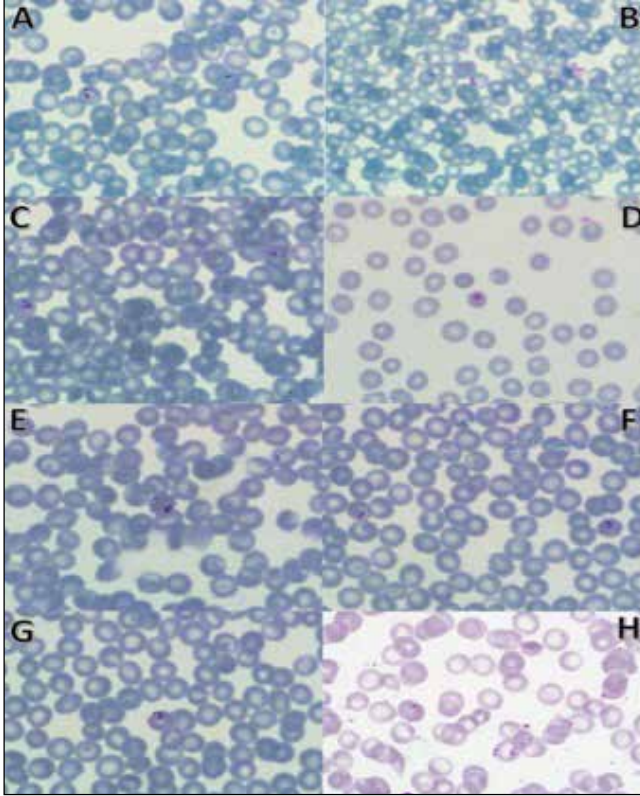
Resim 1. (A-E) Olgu 1'e ait Giemsa ile boyalı ince kan yayması preparatı görüntüleri (x1000 büyütme), (F) tipik *P.vivax* genç trofozoiti.

Rt-PCR ile *P.vivax* 18S rRNA geni saptandı (Resim 3A). Hastanın serum örneğinde ticari ELISA kiti (CellLabs Pty Ltd, Brookvale, Avustralya) kullanılarak *Plasmodium* türlerine karşı antikor arandı. Üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilen ELISA testinde 450 nm dalga boyunda hasta örneğinin optik dansite (OD) değeri pozitif kontrolün OD değerinin beş katı olarak ölçüldü. Hastaya kinin-sülfat 300 mg/gün, primakin 100 mg/gün ve doksisisiklin 100 mg/gün tedavileri 14 gün süreyle uygulandı.

Olgu 2

Otuz bir yaşında erkek hasta 03.10.2016 tarihinde düşmeyen ateş, şiddetli baş ağrısı, kulaklarda ve gözlerde ağrı şikayetleriyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvurdu. Hasta günde sekiz kez parasetamol (4 g/gün) kullanmasına rağmen ateşinin düşmediğini belirtti. Hastanın bir yıldır Nijerya'da çalıştığı öğrenildi. Karaciğer enzimleri normal sınırlarda, trombosit sayısı 53.000/mm³ olan hasta sıtma ön tanısı ile enfeksiyon hastalıkları servisine yatırıldı. İnce yayma kan preparatlarında %12 oranında saptanan enfekte eritrositlerde klasik *P.falciparum* eritrositer formlarından farklı görünüm saptandı (Resim 2H). Bazı *P.falciparum* trofozoitlerinin, *P.vivax* gibi eritrositin 1/3'ü büyüklüğünde ve granüler olmayan sitoplazmaya sahip oldukları

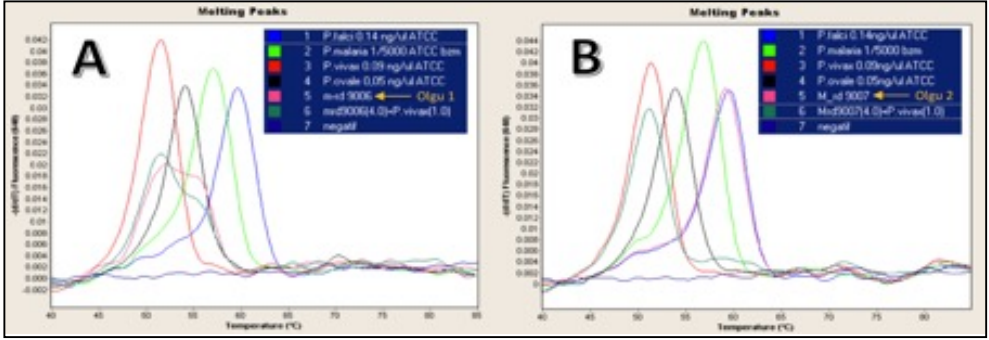
görüldü. Yapılan dört yaymanın sadece birinde *P.falciparum* benzeri genç trofozoide rastlandı (Resim 2A-2C). Bazı eritrositer formların yuvarlak olduğu ve nükleus ve sitoplazmasının zor ayrıldığı, bazılarının ise hilal şeklinde olup nükleusların sitoplazmanın ortasına yakın olarak yer aldığı gözlemlendi (Resim 2D,2E,2F). *P.falciparum* genç trofozoitleri büyüklük olarak *P.vivax*'a benzemesine rağmen özellikle nükleuslarının eritrosit çeperine yapışmış formlarının çok miktarda olduğu gözlemlendi (Resim 2G). Bazı eritrositer formların



Resim 2. (A-G) Olgu 2'ye ait Giemsa ile boyalı ince kan yayması preparatı görüntüleri (x1000 büyütme), (H) tipik *P.falciparum* genç trofozoiti.



Resim 3. Olgu 1 ve olgu 2'ye ait hızlı tanı testi sonuçları.



Resim 4. (A) Olgu 1'e ve (B) olgu 2'ye ait multipleks Rt-PCR sonuçları.

P.vivax'ın olgun trofozoitlerine benzer şekilde tek nükleus ve dağınık bir sitoplazma ile karakteristik bir görünümde olduğu saptandı. Yayma preparatlarında *P.falciparum* gametosit formlarına rastlanmadı.

Olgu 1'de uygulanan hızlı tanı testi ile *P.falciparum* (Resim 3) saptanan hastada yine olgu 1'de uygulanan multipleks Rt-PCR ile *P.falciparum* 18S rRNA geni saptandı (Resim 4B). Olgu 1'de de uygulanan ELISA testinde *Plasmodium* türlerine karşı antikor saptanmadı. Hastaya doksisisiklin 100 mg/gün 14 gün süreyle ve artemether 480 mg/gün intramusküler olarak 5 gün süreyle uygulandı. Tedavinin üçüncü gününde trombosit sayısının $34.000/\text{mm}^3$ 'e düşmesi nedeniyle intravenöz immünglobulin tedavisi 1 mg/kg dozunda verildi. Tedavinin 4. gününde hastanın ateşi düştü.

TARTIŞMA

P.vivax sıtması Türkiye'de çok uzun yıllar endemik olmasına rağmen, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2012 raporunda Türkiye sıtmadan arındırılmış olarak gösterilmiş ve 2016 raporunda yer almamıştır^{4,5}. Ancak 2012 yılında Mardin ili Savur ilçesinin Başkavak köyünde mikroskopi ile doğrulanmış 206 *P.vivax* olgusunu içeren bir salgın görülmüştür⁶. *P.falciparum* sıtması ise Türkiye'de sadece yurt dışı kaynaklı olgular olarak görülmüştür⁷. Günümüzde Türkiye'de yerli olgu rapor edilmemekle birlikte, *P.knowlesi*, *P.vivax* ve *P.falciparum* türleri yurt dışı kaynaklı sporadik olgular olarak bildirilmiştir⁸⁻¹⁰.

Sıtmanın kesin tanısı ve tür ayrımı periferik kandan hazırlanan ve Giemsa ile boyanan kalın damla ve ince yayma preparatlarının mikroskopik incelenmesiyle konmaktadır. Gelişmiş ülkelerin çoğunda moleküler ve serolojik yöntemler mikroskopik incelemenin yerine kullanılmaktaysa da yüksek maliyet, teknolojik alt yapının gerekliliği ve saha koşullarına uyum sağlanmasında yaşanan sıkıntılar bu yöntemlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Sıtmanın mikroskopik tanısında yaşanabilecek sıkıntıların en başında örneği hazırlayan ve/veya inceleyen personelin bu alanda yeterli deneyime sahip olmaması gelmektedir. Mikroskop tanısında ortaya çıkabilecek başka bir sorun ise *Plasmodium* türlerinin boyalı mikroskopik incelemede atipik morfolojide görülebilmesinden kaynaklanmaktadır^{11,12}.

Atipik morfolojiye sahip türlerin görülmesinin sebepleri arasında olası genotipik değişiklikler, yetersiz/uygunsuz tedavi, hastadan örneğin tedavi sırasında alınmış olması gibi faktörler yer almaktadır¹³. Atipik morfoloji nedeniyle *Plasmodium* tür ayırımının yapılamadığı durumlarda antijen varlığını gösteren hızlı testler ve/veya moleküler yöntemlere başvurulmalıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilmiş çok merkezli bir çalışmada, mikroskopi ile sıtma tanısı konmuş 43 sıtma olgusunun sonuçları OptiMal hızlı tanı testiyle karşılaştırılmış ve testin duyarlılığı %98, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %99 olarak bildirilmiştir¹⁴. Gana'da yapılan bir başka çalışmada ise OptiMal hızlı tanı testinin hamile kadınlardaki duyarlılığı %50.5, özgüllüğü %82.5, pozitif prediktif değeri %75.7, negatif prediktif değeri %60.6 olarak saptanmıştır¹⁵.

Sıtmanın akut tanısında serolojik yöntemlerle antikor tayini önerilmemektedir ancak antikor saptanması retrospektif sıtma tanısında, kronik sıtma tablolarının takibinde ve donörlerin taranmasında kullanılabilir. CelLabs Pan Malaria Antibody CELISA (CelLabs, Pty Ltd, Brookvale, Avustralya) kitinin immünfloresan antikor ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, söz konusu kitin duyarlılığı %95.5, özgüllüğü %92.2 olarak bildirilmiştir¹⁶. Sunulan ilk olgumuzda daha önce de sıtma hastalığı geçirdiğini belirten hastanın tıbbi özgeçmişi ile uyumlu olarak, ELISA testinde OD değeri pozitif kontrolün OD değerinin beş katı değerinde saptanmıştır. İkinci olgumuzda ELISA testinde *Plasmodium* türlerine karşı antikor saptanmaması enfeksiyon tablosunun akut olduğu ve hastanın daha önce *Plasmodium* türleri ile karşılaşmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Sıtmalı hastada, sıtma tanısının yanı sıra tür tayini yapılması ve tanımlanan türün ilaçlara karşı direncinin hasta anamnezi temel alınarak belirlenmesi, tedavi yaklaşımının şekillenmesinde ve prognozda temel kriterdir¹⁷. Sıtmada ilaç direnci, özellikle *P.falciparum* sıtmasında görülen ilaç direnci, dünyada belli bölgelerde mevcut tüm sıtma ilaçlarına karşı gelişen bir direnç varlığını göstermektedir¹⁸. *P.vivax* sıtmasında ise klorokin direnci gün geçtikçe artmakta, özellikle karışık enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlara yol açabilmektedir¹⁹. Sunulan olgularda saptanan *Plasmodium* türlerinin atipik morfoloji göstermesi ve alınan anamnezler göz önünde bulundurularak ve hızlı test, serolojik ve moleküler testlerin sonuçlarıyla birlikte değerlendirilerek; *P.vivax* ile enfekte hastaya kinin sülfat, primakin ve doksisisiklin, *P.falciparum* enfeksiyonu olan hastaya ise doksisisiklin-artemether kombine tedavisi uygulanmıştır. Her iki hastada da tam iyileşme görülmüş ve tedavi sonrasında geçen beş aylık sürede relaps saptanmamıştır.

Türkiye'de görülen sıtma olgularının tamamının dış kaynaklı olgu olması yanında, sıtmanın morbidite ve mortalitesi yüksek bir hastalık olma özelliği göz önünde bulundurularak, kliniklere başvuran hastalardan ayrıntılı bir seyahat öyküsü alınmasının sıtma tanısı konmasında temel bir öneme sahip olduğu görülmektedir.

Ülkemizde sıtmada temel tanı yöntemi olarak kullanılan Giemsa boyalı ince yayma kan preparatlarının mikroskopik incelenmesi gerek yetişmiş personel sıkıntısı gerekse de olgu sunumumuzda belirtildiği gibi atipik morfolojideki sıtma etkenlerinin varlığı nedeniyle, tek başına sıtma tanısı konması ve tür tayini için yetersiz olabilmektedir. Bu nedenle,

tanının serolojik ve/veya moleküler yöntemlerle desteklenmesi tanısal özgüllük ve duyarlılığı artırarak doğru tedavi stratejisinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır^{3,20}.

KAYNAKLAR

1. Brunette GW (ed), CDC health information for international travel 2016: The yellow book. Oxford University Press, New York, USA.
2. Walker NF, Nadjm B, Whitty CJM. Malaria. Medicine 2010; 38(1): 41-6.
3. Şahar EA, Karakavuk M, Can H, et al. Real time polimeraz zincir reaksiyonu ile pozitif sıtma örneklerinin tanısı ve tür ayrımı. Türkiye Parazitol Derg 2016; 40(3): 126-31.
4. World Health Organization. World Malaria Report 2012, Country profiles: Turkey, 2013; 188.
5. World Health Organization. World Malaria Report 2016.
6. Eskioçak M, Karababa AO, Ceylan A, Saka G, Çiçek M. Mardin-Savur ilçesi sıtma salgınına inceleme ve değerlendirme raporu. 2012, Türk Tabipler Birliği Yayınları, Ankara.
7. Özbilgin A, Topluoğlu S, Es S, İşlek E, Mollahaliloğlu S, Erkoç Y. Malaria in Turkey: successful control and strategies for achieving elimination. Acta Trop 2011; 120(1-2): 15-23.
8. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Gündüz C. Türkiye'deki ilk maymun sıtması: bir *Plasmodium knowlesi* olgusu. Mikrobiyol Bul 2016; 50(3): 484-90.
9. Hatipoğlu M, Ulcay A, Turhan V, et al. Dış kaynaklı iki relaps *Plasmodium vivax* olgusu ve profilakside primakin. Türkiye Parazitol Derg 2014; 38(2): 120-3.
10. Sargin Altunok E, Aynioğlu A, Azak Karalı E, Mutlu B, Willke A. Kocaeli ilinde yurtdışı kaynaklı *Plasmodium falciparum* sıtması: 16 olgunun değerlendirilmesi. Klimik Dergisi 2016; 29(2): 87-90.
11. Barber BE, William T, Grigg MJ, Yeo TW, Anstey NM. Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region co-endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. Malar J 2013; 12: 8.
12. Gautret P, Legros F, Koulmann P, Rodier MH, Jacquemin JL. Imported *Plasmodium vivax* malaria in France: geographical origin and report of an atypical case acquired in Central or Western Africa. Acta Trop 2001; 78(2): 177-81.
13. Khan T, van Brummelen AC, Parkinson CJ, Hoppe HC. ATP and luciferase assays to determine the rate of drug action in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. Malar J 2012; 11: 369.
14. Palmer CJ, Bonilla JA, Bruckner DA, et al. Multicenter study to evaluate the OptiMAL test for rapid diagnosis of malaria in U.S. Hospitals. J Clin Microbiol 2003; 41(11): 5178-82.
15. Ayeh-Kumi PF, Akalifa BG, Obeng Nkrumah N, Asmah RH, Dayie NTKD. Performance of rapid DiaMed OptiMal-IT® malaria test in an endemic Ghanaian setting. J Parasit Dis 2011; 35(2): 129-33.
16. She RC, Rawlins ML, Mohl R, Perkins SL, Hill HR, Litwin CM. Comparison of immunofluorescence antibody testing and two enzyme immunoassays in the serologic diagnosis of malaria. J Travel Med 2007; 14(2): 105-11.
17. World Health Organization. Guidelines for The Treatment of Malaria. Guidelines for The Treatment of Malaria 2015; 71-88.
18. Wongsrichanalai C, Sibley CH. Fighting drug-resistant *Plasmodium falciparum*: the challenge of artemisinin resistance. Clin Microbiol Infect 2013; 19(10): 908-16.
19. Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2014; 14(10): 982-91.
20. Aslan G, Seyrek A, Kocagoz T, Ulukanligil M, Erguven S, Gunalp A. The diagnosis of malaria and identification of *Plasmodium* species by polymerase chain reaction in Turkey. Parasitol Int 2007; 56(3): 217-20.