

TC
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGELERİNDE
DOĞADAN İZOLE EDİLEN SERBEST YAŞAYAN
ACANTHAMOEBA TÜRLERİN TANISINDA
MİKROSKOBİ, KÜLTÜR VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Yasin GENİŞ

**PARAZİTOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ**

ADANA- 2016

TC
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOĞU VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGELERİNDE
DOĞADAN İZOLE EDİLEN SERBEST YAŞAYAN
ACANTHAMOEBA TÜRLERİN TANISINDA
MİKROSKOBİ, KÜLTÜR VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Yasin GENİŞ

**PARAZİTOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ**

Bu tez, ÖYP kapsamında aktarılan kaynak ile desteklenmiştir

ADANA- 2016

KABUL ve ONAY

Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde Doğadan İzole Edilen Serbest Yaşayan *Acanthamoeba* Türlerin Tanısında Mikroskopi, Kültür Ve Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 15/ 07 /2016

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yrd. Doç. Dr. Fadime EROĞLU
Zirve Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirim, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 15/07/2016

Yasin GENİŞ

Kayıtlı olunan Program : Yüksek Lisans
Tezin Konusu : Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde Doğadan İzole Edilen Serbest Yaşayan *Acanthamoeba* Türlerin Tanısında Mikroskopi, Kültür Ve Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması
Tezin Türü : Tezli Yüksek Lisans

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. İ. Soner KOLTAŞ
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : 0535 305 9393
E-Posta : koltas@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 0507 637 5627
E-Posta : yasingenis@yahoo.com
Adresi : Çukurova Üniversitesi Tıp
Parazitoloji ABD/ADANA

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda düşünce aşamasından tez sonuçlanmasına kadar ki süreçte bilimsel desteğini benden esirgemeyen, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı tez danışmanım, Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yanımda olan Parazitoloji Anabilim Dalından değerli mesai arkadaşlarım Biyolog Berrin ŐİMŐEK'e, Dr. Mehtap DEMİRKAZIK'a, Yrd. Doç. Dr. Bilge ÖZCAN'a, su örneklerini toplamama yardımcı olan öğretmen Fatih KAYA'ya ve her konuda yanımda olan ve sabır gösteren sevgili eşim Leyla KONAK GENİŞ'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	5
2.2. <i>Acanthamoeba</i> spp. Genotiplendirmesi.....	6
2.3. Morfolojisi.....	8
2.4. Yaşam Döngüsü ve Biyolojisi.....	8
2.5. Epidemiyoloji.....	11
2.6. Etkeni Olduğu Hastalıklar.....	11
2.6.1. Granülatöz Amibik Ensefalit (GAE).....	11
2.6.2. <i>Acanthamoeba Keratiti</i>	12
2.6.3. Kutanöz <i>Acanthamoebiasis</i>	12
2.6.4. AIDS’li Hastalarda <i>Acanthamoeba</i> Enfeksiyonu.....	13
2.6.5. Tanı.....	13
2.6.5.1. Kültür Yöntemi.....	13
2.6.5.2. PCR Yöntemi.....	14
2.6.6. Tedavi.....	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	16
3.2. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Malzemeler.....	16
3.3. Örneklerin Toplanması.....	17
3.4. Kaplıca Sularından ve Yüzme Havuzlarından Örneklerin Alınışı.....	17

3.5. Akarsu ve Göllerden Örnek Alınışı.....	18
3.6. Topraktan Örneğin Alınışı	19
3.7. Mikroskopik inceleme, Örnekler İçin Kültür Hazırlanması ve Ekilmesi	19
3.8. Örneklerin DNA İzolasyonu	20
3.9. DNA İzolasyon Protokolü (QIAmp® DNA Minikit, Almanya, QIAGEN)	20
3.10. DNA Amplifikasyonu İçin Gerekli Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler.....	21
3.10.1. Çözeltiler	21
3.10.2. PCR Karışımı.....	22
3.10.3. Primerler	22
3.10.4. Amplifikasyon Koşulları	22
3.11. Termal Cycler PCR Protokolü	22
3.12. Agaroz Jel Elektroforezi Hazırlanması	23
3.13. 5X TBE Tamponu:.....	24
3.14. Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP)	24
3.15. Real-Time PCR	25
4. BULGULAR	26
4.1. Mikroskopik İnceleme Sonuçları	26
4.2. Kültür İnceleme Sonuçları	27
4.3. Konvansiyonel PCR Yöntemi Sonuçları.....	28
4.4. Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP).....	29
4.5. Real Time PCR Yöntemi Sonuçları	29
4.6. Duyarlılık Ve Özgüllük Sonuçları	30
4.6.1. Mikroskopi ve Kültür İnceleme Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	30
4.6.2. Konvansiyonel PCR ve Kültür Sonuçlarının Karşılaştırılması	31
4.6.3. Real-Time PCR ve Kültür Sonuçların karşılaştırılması	31
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>		<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1.	<i>Acanthamoeba</i> spp. ait kistlerin büyüklük ve şekline göre ayrımı	4
Şekil 2.	<i>Acanthamoeba</i> spp. yaşam döngüsü ve insanda oluşturduğu enfeksiyon.....	9
Şekil 3.	<i>Acanthamoeba</i> trofozoitinin mikroskoptaki görünümü (x40)	10
Şekil 4.	<i>Acanthamoeba</i> kistinin mikroskoptaki görünümü (x40)	10
Şekil 5.	Sulama havuzundan örnek alınması	18
Şekil 6.	Kaynak suyundan örnek alınması.....	18
Şekil 7.	Park bahçelerinden toprak alınması.....	19
Şekil 8.	Thermal Cycler cihazı (Senquest)	23
Şekil 9.	A) Jel Görüntüleme Sistemi B) Elektroforez tankı.....	24
Şekil 10.	Real Time PCR Cihazı Rotorgene 3000 (Germany)	25
Şekil 11.	Mikroskopik inceleme sonucu 40x büyütmede <i>Acanthamoeba</i> spp.....	26
Şekil 12.	Kültür inceleme sonucu 40x büyütmede <i>Acanthamoeba</i> spp.....	28
Şekil 13.	Konvansiyonel PCR yönteminde örneklerin jel görüntüsü (1; Negatif kontrol, 2; Pozitif kontrol, 3, 4, 5 pozitif örnekler)	28
Şekil 14.	Real-Time PCR yönteminin sonuçları.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. <i>Acanthamoeba</i> spp.kist morfolojilerine göre yer aldığı gruplar ^{9,12}	5
Çizelge 2. <i>Acanthamoeba</i> , sınıflandırılması ⁶	6
Çizelge 3. Bilinen <i>Acanthamoeba</i> spp. genotipleri ve insan hastalıkları ile bağlantısı ¹⁶ . (NA; Henüz herhangi bir hastalıkla bağlantısı bulunmamıştır).....	7
Çizelge 5. PCR karışım oranları	22
Çizelge 6. PCR protokolü.....	23
Çizelge 1. Real Time PCR çalışma protokolu	26
Çizelge 8. Mikroskopik inceleme sonuçları	26
Çizelge 9. Kültür İnceleme Sonuçları.	27
Çizelge 10. Real-Time PCR Yöntemi Sonuçları	29
Çizelge 11. Mikroskopi ve kültür inceleme sonuçlarının karşılaştırılması.....	30
Çizelge 12. Konvansiyonel PCR ve kültür inceleme sonuçlarının karşılaştırılması.....	31
Çizelge 13. Kültür ve Real-Time PCR inceleme sonuçlarının karşılaştırılması.....	31

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SYA	: Serbest Yaşayan Amipler
GAE	: Granülomatoz amibik Ensefalit
AK	: <i>Acanthamoeba</i> Keratiti
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
WB	: Western Blot
IF	: İmmunofloresan
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
NNA	: Non-Nutrient Agar
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
°C	: Celcius
µm	: Mikrometre
%	: Yüzde
ml	: Mililitre

ÖZET

Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde Doğadan İzole Edilen Serbest Yaşayan *Acanthamoeba* Türlerinin Tanısında Mikroskopi, Kültür ve Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması

Acanthamoeba türlerinin doğal çevrede serbest halde bulunmasından dolayı, insanların bu parazitle enfekte olma riski büyüktür. *Acanthamoeba* türleri granüloamatöz amibik ensefalit (GAE), kutanöz acanthamoebiasis, *Acanthamoeba* keratiti oluştururken, AIDS'li hastalarda enfeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler.

Bu çalışmada Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu bölgelerinde bulunan Diyarbakır, Batman, Mardin, Siirt, Bitlis ve Van illerindeki yüzme havuzlarından, kaplıca sularından, hamamlardan, sulama kanalından, park ve bahçelerden alınan toplam 65 su ve toprak örneğinin 6 tanesi mikroskobik inceleme yöntemi ile, 11 tanesi kültür yöntemi ile ve 15 tanesi konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemi ile *Acanthamoeba* spp. pozitif bulundu.

Çalışmada *Acanthamoeba* spp. laboratuvar tanı yöntemlerinden kültür metodu; mikroskopi, konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemleri ile karşılaştırıldı. Kültür yönteminin mikroskopi, konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemlerine göre duyarlılığı sırası ile %100, %73,33, %73,33 ve özgüllüğü sırası ile %91,53, %100, %100 olarak saptandı.

İncelenmesi yapılan ve *Acanthamoeba* spp. tanısı alan 15 örneğin kist yapılarını ve moleküler analizlerini değerlendirdiğimizde 4 (%26,67) *Acanthamoeba castellanii*, 3 (%20) *Acanthamoeba polyphaga* ve 8 tanesinin (%53,33) *Acanthamoeba palestinensis* olduğu belirlendi. Çalışmamız Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılan *Acanthamoeba* spp. ile ilgili ilk saha çalışması olup *Acanthamoeba* keratiti için doğal çevrede risk oluşturan türler tanımlandı.

Anahtar Kelimeler: *Acanthamoeba*, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Su ve Toprak örnekleri, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*

ABSTRACT

The Comparison Of Microscopy, Culture And Molecular Methods Used In Diagnosis Of Free-Living *Acanthamoeba* Species Isolated From Environment In East And South East Anatolia Regions

Due to the presence of *Acanthamoeba* species in the natural environment, people at risk of becoming infected with this parasite. *Acanthamoeba* species occur such as granulomatous amoebic encephalitis (GAE), cutaneous acanthamoebiasis, *Acanthamoeba* keratitis, AIDS, chronic sinusitis due to spread to various organs of the infection in patients with otitis, cutaneous lesions, sinus lesions, and skin ulcers.

In this study, It was collected 65 water and soil samples from the environment in East and South East Anatolia regions located in Diyarbakir, Batman, Mardin, Siirt, Bitlis and Van provinces in Turkey of the swimming pool in the thermal springs, the baths, the irrigation canals, parks and the gardens. Six, 11 and 15 *Acanthamoeba* species found by microscopic examination, culture and conventional PCR and real time PCR methods, respectively.

The sensitivity and specificity of culture methods were compared with microscopy, conventional PCR and real time PCR method for *Acanthamoeba* spp.; The sensitivity was found as 100%, 73,33%, 73,33% and specificity was found as 91,53%, 100% and 100%, respectively.

When the investigation made and positively found by culture and molecular analysis 15 samples were evaluated in 4 (%26,67) *Acanthamoeba castellanii*, in 3 (%20) with *Acanthamoeba polyphaga* and in 8 (%53,33) with *Acanthamoeba palestinensis*. This is the first field study was conducted in South-East Anatolia on *Acanthamoeba* spp. at the molecular level and the positive samples were genotyped from the natural environment that pose a risk for *Acanthamoeba* keratitis.

Key Words: *Acanthamoeba*, East Anatolia, South East Anatolia, Water and Soil Samples, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*

1. GİRİŞ

Çevremizde yaygın olarak bulunan, protozoon sınıfında yer alan ve serbest yaşayan amipler (SYA) dünyada geniş bir dağılım gösterir. İnsanda hastalık oluşturan bu amipler *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* ve *Sappinia* cinslerine aittir. *Acanthamoeba* spp. ve *Balamuthia* spp. immun sistemi baskılanmış kişilerde akciğer ve deri enfeksiyonları yanı sıra kronik ve çoğunlukla ölümcül Granülomatöz Amibik Ensefalit'e (GAE) neden olmaktadır¹.

Günümüzde *Acanthamoeba* spp. kaynaklı enfeksiyonların görülme sıklığı artmıştır. Özellikle, 1980'li yıllara kadar çok nadir olarak görülen *Acanthamoeba* keratiti (AK), yumuşak kontakt lens kullanımının yaygınlaşmasına bağlı olarak son yıllarda artış göstermiştir. *Acanthamoeba* keratiti, korneadaki travma, kontakt lens kullanımı, kontakt lenslerin kontamine lens solüsyonlarıyla temizlenmesi gibi etkilerle meydana gelen, kornea ile amibin direkt teması sonucu oluşmaktadır². Enfeksiyonda halka şeklinde stromal infiltrasyon, şiddetli oküler ağrı, yangı ve görme bozukluğu görülür. Kornea kazıntısı lam lamel arası preparatın direkt incelenmesinde amibi saptayarak, bu materyalden etkeni kültürde üreterek ya da patolojik kesitlerde paraziti görerek tanı konur. Bu hastalık tedavi edilmediğinde görmenin ya da gözün kaybı söz konusudur^{1,2}.

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde, AIDS hastalarında, deri lezyonlarında ve sinüzitte bu parazit saptanmıştır. Günümüzde GAE ve AK vakalarının tedavisinde antifungal ve antiseptik ajanlardan yararlanılmaktadır. Enfeksiyonun tedavisi zor ve uzun sürelidir. Olumsuz koşullar altında trofozoitler kistleştiğinden yetersiz tedavide reenfeksiyon görülür. Bu nedenle *Acanthamoeba* enfeksiyonuna karşı daha etkili ilaç arayışları devam etmektedir³.

Son yıllarda moleküler çalışmaların hız kazanmasıyla *Acanthamoeba* spp. ye ait yeni türler tanımlanmıştır. *Acanthamoeba* spp. genotiplendirme çalışmaları sonucu birçok patojen ve apatojen türlerin tespiti yapılmıştır. Bu çalışmalarla yeni tanı yöntemleri geliştirilmiş ve tedavide etkili ilaçlar bulunmuştur.

Bu çalışmada Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinin farklı il ve ilçelerinde bulunan kaynak suyu, kaplıca suyu, toprak ve göllerden toplanan örneklerde serbest

yaşayan *Acanthamoeba*'ların mikroskobi, kültür ve moleküler yöntemler kullanarak varlığı araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

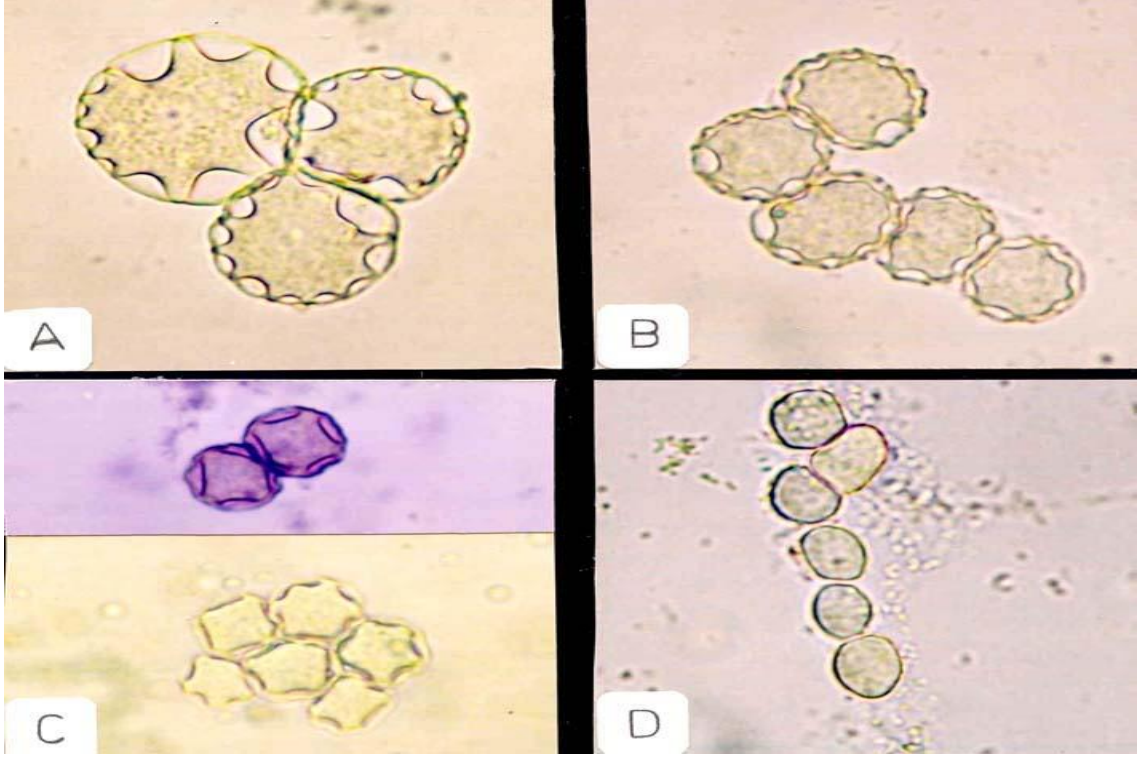
Tıbbi parazitolojide incelenen enfeksiyonlar arasında amiplerin sebep olduğu sindirim sistemi ve diğer organların hastalıkları önemli bir yer teşkil eder. İnsanlarda hastalık oluşturan veya parazit olarak yaşamını devam ettiren amipler olduğu gibi doğada serbest yaşayan bazı amiplerin de insanlarda ciddi hastalıklar oluşturabildikleri bilinmektedir. Bu amipler, doğada, rutubetli veya ıslak topraklarda, kanalizasyon sularında, göllerde, yüzme havuzlarında, baraj göllerinde, kaplıca sularında, güneş enerji sularında, hamamlarda ve tatlı su birikintilerinde yaygın olarak bulunmakta, ayrıca hava filtrelerinde de yaşayabilmektedir. İnsanların doğa ile temasının artmasının, toprak, su ve havayı, kendi yararları için daha fazla kullanmaya başlamaları, doğada serbest yaşayan amiplerin (SYA) insan vücuduna girme olasılığını arttırmakta ve SYA' ların neden oldukları hastalıklar da gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır⁴

Çevrede toprak ve tatlı sulara oldukça yaygın olarak bulunan protozoonlar arasında olan *Acanthamoeba* spp.'leri, insan vücuduna yerleşerek çeşitli hastalıklar meydana getirebilmektedir. Bu tür amipler, Granülomatöz Amibik Ensefalit (GAE), Kutanöz *Acanthamoebiasis*, *Acanthamoeba Keratiti* (AK) ve AIDS'li hastalarda enfeksiyon'un çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler^{5,6,7}.

Acanthamoeba'nın, Acanthopodina alt takımı içinde sınıflandırılmasında trofozoitlerinin yapısında acanthopod adı verilen dikensi yapıların yer alması ile doğrudan ilgili olup, bu yapılar morfolojik olarak sınıflandırmada ölçüt olarak kullanılmaktadır^{5,7,8}. *Acanthamoeba* ilk kez, *Cryptococcus pararoseus* kültürü içinde Castellani tarafından tanımlandı^{9,10,11}. Fakat organizmanın bu cins içinde sınıflandırılması gözlem ve araştırmalar sonucunda şimdiki halini almıştır^{9,11}.

Morfolojik özellikler kullanılarak tür tayini yapmak çok zordur. *Acanthamoeba*'lar morfolojik olarak kistlerinin büyüklüğü ve şekli bakımından 3 gruba ayrılırlar (Şekil 1). Grup I'deki türler, diğer gruptaki türlerle kıyaslandığında oldukça büyük kistlere sahiptir. Ektokist, endokist arasında oldukça belirgin bir şekilde görülen açıklık vardır ve yıldız şeklindeki endokist, uçlardan ektokistle bağlantılıdır (Şekil 1-A). Grup II'deki türlerin ektokisleri buruşuk bir görünümde iken endokist yıldız, poligonal, üçgen veya oval şekilde olabilir (Şekil 1-B, C). Grup III'deki türlerin kistleri küçüktür, kist duvarı ince ve düz bir

yapıdadır, ektokist düzçeperi ile endokisti çevreler, ektokistle, endokist arasındaki mesafe çok azdır (Şekil 1- D)



Şekil 1. *Acanthamoeba* spp. ait kistlerin büyüklük ve şekline göre ayrımı.

A'da Grup I'de yer alan, *Acanthamoeba* (*A.*) *astronyxis*'e ait kist morfolojisi görülürken, B ve C'de Grup II'de bulunan, sırasıyla, *A. castellanii* ve *A. polyphaga*'ya ait kist morfolojisi (C'de üstte bulunan şekilde, *A. polyphaga* kistleri metilen mavisi ile boyanmış durumda), D'de ise Grup III'de bulunan *A. palestinensis*'in kist morfolojisi görülmektedir^{5,9,12}.

Günümüze kadar çeşitli çevrelerden veya klinik örneklerden izole edilen *Acanthamoeba* spp.'lerin, kist morfolojileri ve büyüklüklerine göre hangi grupta yer aldığı belirlenmiştir. Bu ayrım Çizelge 1'de görülmektedir.

Çizelge 2. *Acanthamoeba* spp.kist morfolojilerine göre yer aldığı gruplar^{9,12}.

Grup I	Grup II	Grup III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. commandoni</i>	<i>A. divionensis</i>	<i>A. healyi</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. griffini</i>	<i>A. jacobsi</i>
<i>A. pearcei</i>	<i>A. hatchetti</i>	<i>A. lenticulata</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. palestinensis</i>
	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. guina</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. rhyodes</i>	
	<i>A. stevensoni</i>	
	<i>A. polyphaga</i>	

Jager ve Stamm tarafından ilk kez 1972 de insanlarda GAE tanımlanmıştır. 1974 de ilk *Acanthamoeba* keratiti vakası ise Nagington ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. *Acanthamoeba* spp.’nin Lejyoner hastalığı ile bağlantılı olduğu 1980’de Rowbotham tarafından savunulmasından sonra bu konuda araştırmalar hız kazanmıştır. Günümüzde konu ile ilgili önemli çalışmalar bulunmaktadır¹⁰.

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

İlk kez 1930’da *Acanthamoeba* cinsi amipler, Castellani tarafından, *Cryptococcus pararoseus* kültürlerinde bulunmuş ve tanımlamıştır. Daha sonra bu cinsin sınıflandırılması, 1931 yılında Volkonsky tarafından yapılmış, fakat günümüzde geçerli olan sınıflandırma son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur. *Acanthamoeba*’nın farklı türlerinin sınıflandırılmasında kimyasal, immunolojik ve fizyolojik kriterlere başvurulmaktadır. Bu yüzden Western Blot (WB) ve Immunofloresan (IF) gibi immunolojik yaklaşımlar türlerin sınıflandırılmasında yetersiz kalmaktadır. İzoenzim elektroforezi ile farklı enzim sistemlerine sahip *Acanthamoeba* spp.’leri birbiriyle karşılaştırılabilmekte ve böylelikle akrabalık dereceleri ortaya çıkarılmaktadır. İzoenzim elektroforezi yöntemi farklı türler arasındaki benzerlikleri ortaya çıkarmasına rağmen, yapılan çalışmalar izole edilen enzimlerin farklı laboratuvar

şartlarında değişiklik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır^{5,9,13,14,15}. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar ile parazitin sınıflandırmadaki yeri netlik kazanmıştır.

Çizelge 3. *Acanthamoeba*, sınıflandırılması⁶.

Alem	Protista		
Alt alem	Protozoa		
Şube	Sarcomastigophora		
Alt şube	Sarcodina		
Süper sınıf	Rhizopodea		
Sınıf	Lobosea		
Alt sınıf	Gymnamoebia		
Takım	<i>Amoebida</i>		<i>Schizopyrenida</i>
Alt Takım	<i>Tubulina</i>	<i>Acanthopodina</i>	
Aile	<i>Hartmannellidae</i>	<i>Acanthamoebidae</i>	<i>Vahlkampfiidae</i>
Cins	<i>Hartmanella</i>	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Balamuthia</i>	<i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>

2.2. *Acanthamoeba* spp. Genotiplendirmesi

Son yıllarda *Acanthamoeba* spp.'nin filogenetik yapısını anlamak için özellikle 18S rRNA gen bölgesi hedef alınarak birçok moleküler çalışmalar yapılmıştır¹⁶. 18S rRNA gen bölgesinde yapılan çalışmalar sonucunda *Acanthamoeba* spp.ler 20 farklı genotipe ayrılmış ve bunlar T1-T20 olarak adlandırılmıştır¹⁷.

Her bir genotipe %5 veya daha fazla dizi ayırımının bulunması genotipler arasındaki farklılığı göstermektedir. Örneğin; T2, T2a ve T2b olmak üzere iki alt grup içerir. Bu iki grup arasında %4,9'luk bir farklılık olduğundan dolayı aynı genotip olarak

kabul edilmektedir. Bu sınıflandırma şeması temel alınarak insan enfeksiyonlarının büyük bir kısmının ve özellikle %90'dan fazla keratit olgusunun T4 genotipi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Yine benzer şekilde T4 genotipinin kutanöz enfeksiyonda ve GAE gibi nonkeratit enfeksiyonlar ile de bağlantılı olduğu ortaya çıkartılmıştır^{18,19,20}.

Çizelge 4. Bilinen *Acanthamoeba* spp. genotipleri ve insan hastalıkları ile bağlantısı¹⁶. (NA; Henüz herhangi bir hastalıkla bağlantısı bulunmamıştır).

<i>Acanthamoeba</i> genotipleri	İnsan hastalıkları ile bağlantısı
T1	Ensefalit
T2a T2b	Keratit NA
T3	Keratit
T4	Ensefalit, Keratit
T6	Keratit
T10	Ensefalit
T11	Keratit
T12	Ensefalit
T5	NA
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T13	NA
T14	NA
T15	NA

2.3. Morfolojisi

Acanthamoeba spp.'nin hücre yapısı elektron mikroskobu kullanılarak ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. *Acanthamoeba* spp. trofozoitlerinin yapısında golgi cisimciği, mitokondri, ribozom, düz ve yuvarlak yapılı endoplazmik retikulum, mikrotübüller gösterilmiştir^{9,10}. *Acanthamoeba* spp. trofozoitlerinin sitoplazmik yapısında üç tabakalı plazma zarı bulunmaktadır. Buna ek olarak trofozoit yapısında, diken şeklinde acanthopod adı verilen morfolojik bir özellik daha ayırt edilmektedir. Ayrıca *Acanthamoeba* trofozoitlerinde sitoplazma yapısında hücre içindeki suyun kontrolünü sağlayan kontraktıl vakouller de belirgin bir şekilde göze çarpmaktadır. Ayrıca nükleus içinde büyük bir merkezi nükleolus ayırt edilmektedir. Genellikle amipler tek çekirdekli olmasına karşın kültürlerinde iki çekirdekli yapıları da ortaya çıkmaktadır²¹.

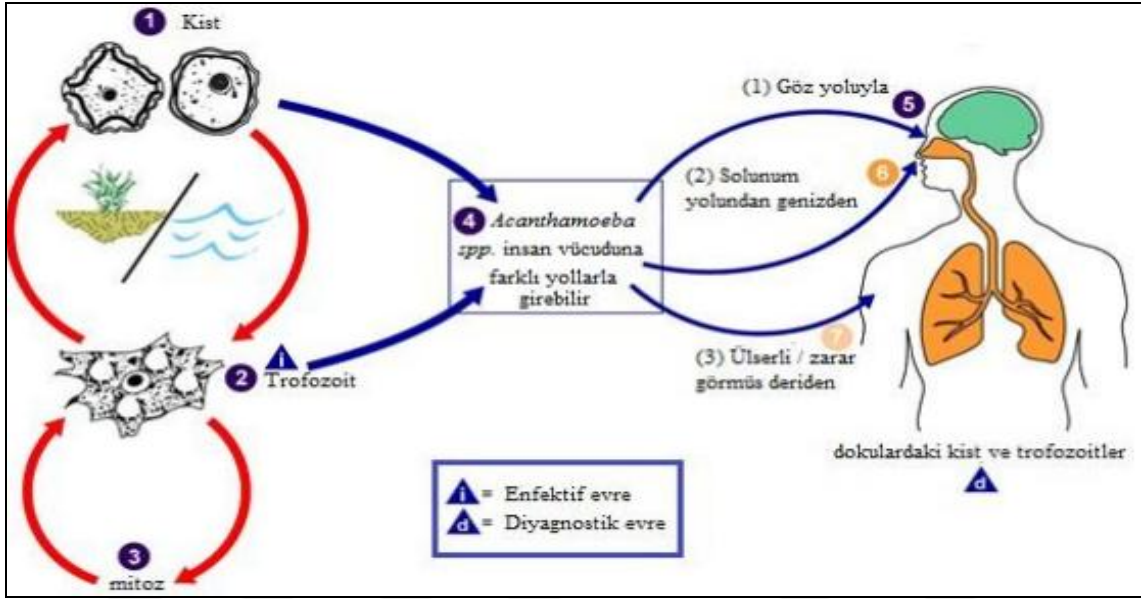
Çift tabakalı düz olmayan kist yapısı 13-20 µm büyüklüğünde, endokist ve ekzokistten oluşur. Bu büyüklük türden türe değişiklik göstermektedir^{20,21,22}. Sıcaklık ve pH değişimleri, besin yokluğu gibi çevresel şartların değişimi durumunda *Acanthamoeba* trofozoitleri kist yapısına dönüşürler. Kistler biyositlere, klorlama ve antibiyotiklere karşı dirençlidirler²³. Düşük sıcaklıklarda canlı kalabilirler. Bununla beraber, kistlerin metilen oksitte parçalandığı gösterilmiştir. Uygun çevre şartları altında kistlerden eksistasyonla trofozoitler oluşur. Amip kistlerinin 4⁰C'deki sularda yaklaşık 24 yıl canlı kalabildiği gösterilmiştir⁹. Trofozoit formlar, amibin patojenitesini test etmek amacıyla, deney farelerine intranazal yoldan inoküle edilmiştir. Eski izolatların virülansının yenilere göre daha az olduğu saptanmıştır²⁴. Virülans etkisinin pasajlarla azaldığı gösterilmesine rağmen amipler fareler üzerindeki patojenik etkisini devam ettirmiştir.

2.4. Yaşam Döngüsü ve Biyolojisi

Acanthamoeba spp.'nin yaşam döngüsünde iki evre vardır. İlk evresi aktif olarak beslendiği, bölündüğü trofozoit evresidir. İkinci evresi ise hareketsiz ve aktif olmayan kist evresidir. *Acanthamoeba* trofozoitleri yaklaşık 25-40 µm büyüklüğünde olup, bakteri, alg ya da çevredeki diğer küçük mikroorganizmalar ile beslenirler. Aksenik kültürlerde besinlerini pinositoz yoluyla sıvı şekilde alırlar. *Acanthamoeba* spp. insan vücudunda başta merkezi sinir sistemi (MSS) ve göz olmak üzere deri, akciğer, mukoza

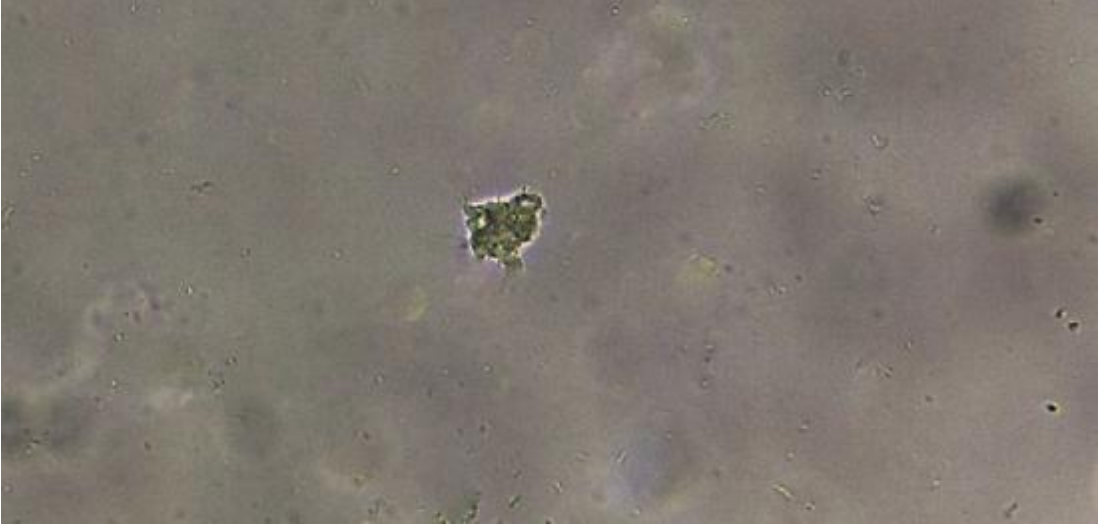
ve toraksta yerleşebilirler. Bu cins amipler, dokuda hem trofozoit, hem de kist halinde bulunurlar^{5,7,9,25}.

Şekil 2’de *Acanthamoeba* spp. yaşam döngüsü ve insanda oluşturduğu enfeksiyonlar.



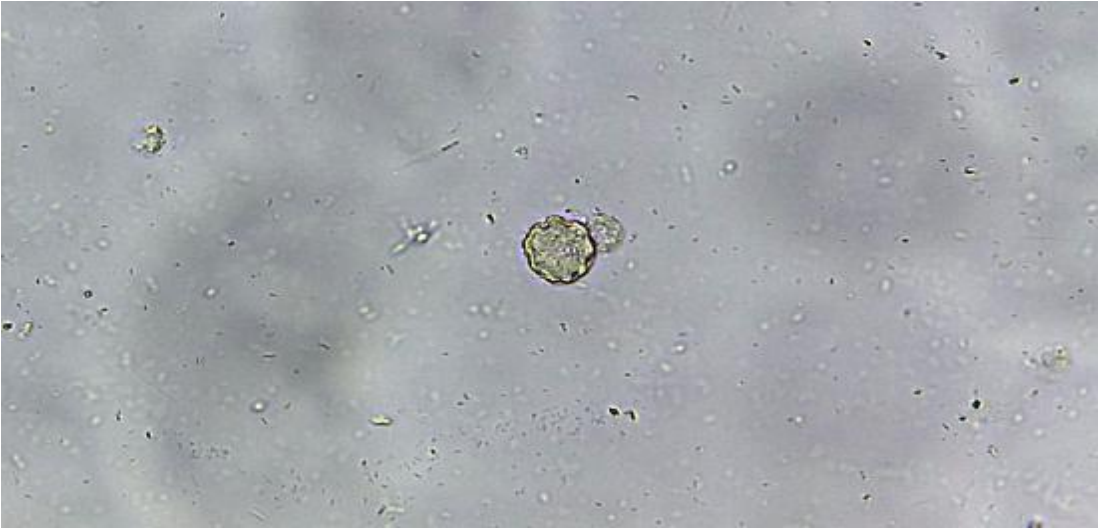
Şekil 2. *Acanthamoeba* spp. yaşam döngüsü ve insanda oluşturduğu enfeksiyon²⁵.

Trofozoit formu: Trofozoitler 12-60 µm büyüklüğünde olup genellikle yavaş olan hareketlerini, parmak şeklinde olan lopopod ve akantopod (acanthopodium) denilen dikensi yalancı ayaklar ile sağlarlar, düzensiz dallanmalar gösteren yalancı ayaklara sahiptir. Merkezi yerleşmiş karyozomu bulunan tek çekirdeğe sahiptir^{9,26,27}.



Şekil 3. *Acanthamoeba* trofozoitinin mikroskoptaki görünümü (x40)

Kist formu: Kistler genellikle tek çekirdekli ve yuvarlaktır. Ortalama çapları 10-15 μm çapındadır; çekirdeğin yine büyük bir karyozomu vardır. Kist duvarı çift cidarlıdır; dış tabaka hafifçe kıvrıktır, iç tabaka polihedraldir. Bu morfoloji, kistlerin agar plakları üzerinde kolayca ayırt edilebilmelerini sağlar²¹.



Şekil 4. *Acanthamoeba* kistinin mikroskoptaki görünümü (x40)

2.5. Epidemiyoloji

Acanthamoeba spp. protozoa içinde çevrede en çok bulunan türdür. Dünyada kozmopolit bir yayılıma sahiptir. Toprakta, içme sularında, havalandırma sistemlerinde, yüzme havuzlarında, diyaliz ünitelerinde, kontakt lenslerde ve memeli hücre kültürlerinde izole edilebilir^{28,29}.

Bildirilen olguların %50'den fazlasında insanların, yapay göllerde, havuzlarda, yüzme esnasında enfekte oldukları Amerika'nın Virginia, Florida ve Teksas gibi bölgelerinden rapor edilmiştir. Bazı olgular kaplıca, yüzme havuzu, sulama kanalı ve doğal göllerde yüzme ile enfekte olurken, Kuzey Nijerya ve Güney Avustralya'dan bildirilen olgularda yüzme öyküsü olmadan bulaşmanın, yüzün yıkanması esnasında ve havada bulunan amip kistlerinin solunmasıyla enfekte olduğu bildirilmiştir^{30,31}.

Acanthamoeba spp. ile ilgili ilk keratit olgusu yurdumuzda 1996'da Elazığ'dan ikinci olgu ise İzmir'den bildirilmiştir^{32,33}. Serbest yaşayan amiplerin sebep olduğu hastalıklar hakkında yeteri kadar araştırma yapılmadığından bu hastalıkların gerçekte bulunma oranı bilinmemektedir.

2.6. Etkeni Olduğu Hastalıklar

2.6.1. Granülomatöz Amibik Ensefalit (GAE)

Acanthamoeba spp.'lerin neden olduğu, kronik, yavaş ilerleyen merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonudur. Bu hastalığın inkübasyon periyodu tam olarak bilinmemektedir. GAE, sistemik lupus eritematozus, diyabet, tüberküloz, deri ülserleri, AIDS gibi hastalıkların yanında alkolizm, ilaç bağımlılığı, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi, radyoterapi ve organ transplantasyonu gibi durumlarda çok hızlı ilerler. Klinik olarak; baş ağrısı, mental anormallikler, ense sertliği, nöbet, irritasyon, bulantı, kusma, yarı felç, kafatası sinirlerinin felci, halüsinasyon, yürüme bozukluğu, çift görme, ışığa karşı duyarlılık oluşması ile karakterize olan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır^{5, 6, 7, 34}.

Patolojik bulgular genellikle kanamaya bağlı nekroz, fibrin birikimi ve enflamasyon içerir. GAE olgularının tanısında, BOS ya da beyin dokusu incelenir. Bu materyallerden lam-lamel arasında preparat hazırlanıp, direkt olarak veya çeşitli boyalarla boyandıktan sonra mikroskopta incelenerek amip varlığı aranır^{5, 6, 7, 34}.

2.6.2. *Acanthamoeba Keratiti*

Acanthamoeba spp.'leri ile *Naegleria*, *Hartmanella* ve *Wahlkamfidae* türlerinin bu hastalığa neden olduğu ve korneanın amiplerle direkt teması sonucunda hastalığın oluştuğu bildirilmektedir. Bu temasta, korneadaki travma, kontakt lens kullanımı, kontakt lenslerin kontamine lens solüsyonları ile temizlenmesi rol oynamaktadır. *Acanthamoeba* keratitli olgulardan en sık olarak *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhysodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. griffini* ve *A. polyphaga* gibi türler izole edilmektedir^{35,36}.

Acanthamoeba keratiti, immün sistemi sağlam, sağlıklı kişilerde görülebilir ve bu kişilerde koruyucu immünite gelişmez. Enfeksiyonda, şiddetli oküler ağrı, yangı, görme bozukluğu ve halka şeklinde stromal infiltrasyon vardır. Tanısı çoğunlukla, kornea kazıntı materyalinin direkt incelenmesinde amibi saptayarak, bu materyalden etkeni üreterek ya da histopatolojik kesitlerde paraziti görerek konur^{6,12,37,38}.

2.6.3. Kutanöz *Acanthamoebiasis*

AIDS'lilerde görülen bu enfeksiyon, tek başına veya MSS enfeksiyonu ile birlikte bulunur. Kutanöz *Acanthamoebiasis* hastalığına bağışıklık sistemi baskı altında olan organ transplantasyonu yapılmış hastalar ile HIV açısından negatif olan amibik ensefalitli hastalarda ya da immunolojik rahatsızlıklara sahip hastalarda rastlanabileceği gösterilmiştir. Hastalığın kutanöz formu güçlü eritromatöz ya da cilt ülserleri şeklinde karakterizedir. Kutanöz *Acanthamoebiasis*'in erken belirtisi sert papülonodüllerin meydana gelmesidir. Bu nodül, irinli bir materyal toplar ve daha sonra iyileşmeyen sert ülserlere dönüşür. Kutanöz lezyonların histopatolojik incelenmesi sonucunda, nekroz odağı çevresinde, enflamatuvar hücreler, vaskülit, trofozoitler ve kistlerin bulunduğu gösterilmiştir⁶.

Kutanöz *Acanthamoebiasis*'de tanı materyali olarak, lezyondan alınan biyopsi materyali kullanılmaktadır. Tanıda, biyopsi materyali, hematoksilen-eozin, periyodik asit-schiff, calcofluor beyazı gibi boyalarla boyanarak amip varlığı araştırılabilir. Buna ek olarak, PCR-RFLP gibi moleküler yöntemler de tanı da kullanılabilir⁶.

2.6.4. AIDS'li Hastalarda *Acanthamoeba* Enfeksiyonu

1986 yılında AIDS'li bir kişide *Acanthamoeba* enfeksiyonu ilk kez bildirilmiştir³⁴. Bu tarihten itibaren, AIDS'li kişilerde rapor edilen *Acanthamoeba* enfeksiyonu olgusu bildirilmiş olup, bu olguların çoğunun tanısı hastanın ölümünden sonra yapılan raporlamalardır. Hastanın bağışıklık sisteminin zayıflaması sonucunda *Acanthamoeba* parazitinin diğer doku ve organlara yayıldığı düşünülmektedir. CD4 T hücrelerinin sayısının düşük olduğu (200 mm'den daha az) HIV'li hastalarda *Acanthamoeba* enfeksiyonu'nun daha hızlı geliştiği bildirilmiştir. AIDS'li kişilerde hastalık çok hızlı ilerler ve birçok hastada nörolojik semptomların görülmesinden bir ay veya daha kısa süre sonra ölüm gerçekleşir^{5,9}.

2.6.5. Tanı

Çevresel örneklerden, beyin-omurilik sıvısından ya da dokulardan izole edilen *Acanthamoeba* spp.'lerinin tanımlanması trofozoit ve kistlerin morfolojisine bakılarak yapılmaktadır. *Acanthamoeba* keratitinin tanısı oldukça zordur, çünkü klinik görünümü *Herpes simplex*, *Pseudomonas aeruginosa* veya fungal keratite çok benzer. Bu durum, tanıda yanlışlıklara neden olabilir. Yanlış tanı sonucunda uygulanacak anti-viral, anti-fungal veya anti-bakteriyel tedavi hastalığın kliniğini gölgeler ve tedavide gecikmelere neden olur. *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerini saptamak için, korneal kazıntı ve biyopsi materyalleri çok uygundur^{6,12}.

Tanı için farklı yöntemler kullanılır: Bunlar; Kültür Yöntemi, PCR Yöntemi, Calcoflour Beyazı, Akridine Orange, Laktofenol (pamuk mavisi), Konfokal Mikroskop, İndirekt Immunofloresan - Antikor Testi, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Tekniği, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)'dir.

2.6.5.1. Kültür Yöntemi

Kültür yöntemleri parazitin *in vitro* olarak üretilmesine, izole edilmesine ve tanımlanmalarına olanak sağladıkları için tanıda büyük önem taşımaktadır. Tanı da en çok kullanılan besiyeri, üzerine *Escherichia coli* ya da başka bir gram negatif bakteri sürülmüş olan, besleyici değeri olmayan agar ortamıdır. Kültür için korneal kazıntı materyali çok uygundur. Agar besiyerinin hazırlanışı kısaca şöyledir: Agar, %1.5-2 oranında hazırlanarak, otoklavda steril edilir ve 10-15 ml steril petri kaplarına dökülür;

kullanmadan önce üzerine bakteri sürüldükten sonra petrinin orta kısmına materyal konur ve 35-37' °C'de inkübe edilir, ertesi günden itibaren amip üremesi olup olmadığı mikroskopta incelenerek belirlenir^{7,8}. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, korneal kazıntı materyalinde bakteri ya da mantar olabilir, bu durum da tanıda karışıklıklara neden olabilir. Korneal kazıntı örneğinden yapılan kültür negatif çıktığında, korneal biyopsi örneğinden kültür yapılması gerekebilir, bunun yanında lens saklama kaplarından ve lens temizleme solüsyonlarından alınan örneklerden de kültür yapılmalıdır. Bu materyallerden yapılan kültürlerin pozitif çıkması tanıyı kesinleştirmez, fakat *Acanthamoeba* enfeksiyonu olduğunu düşündürebilir⁶.

2.6.5.2. PCR Yöntemi

Klinik örneklerin değerlendirilmesinde kullanılan tanı teknikleri arasında görülen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) oldukça özgül bir yöntemdir. En değerli tanı materyali korneal kazıntı materyali olup bu yöntemde, korneal dokudan DNA izole edilir ve *Acanthamoeba*'ya özgü oligonükleotit primerleri kullanarak, izole edilen DNA içinde *Acanthamoeba*'ya ait olan gen bölgesinin varlığı araştırılır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, kullanılan primerlerin mutlaka *Acanthamoeba* spp.'ye özgü olmasıdır. Eğer göz birden fazla SYA ile enfekte ise diğer metodlarla tanı konulması çok zor olur. Bu durumda gözyaşı örneklerinden PCR yapılması önerilir. PCR tanı amaçlı kullanımı yanında, hastaların tedaviye cevaplarının araştırılmasında da güvenli bir şekilde kullanılabilir^{6,12,37}.

2.6.6. Tedavi

Acanthamoeba keratitinin tanısı zor olduğundan, sık sık tedavide gecikmeler ve buna bağlı olarak da görme kaybı olabilir. Eğer enfeksiyon çok erken tanımlanırsa etkenin sadece epiteli istila etmiş olma olasılığı yüksektir. Daha kolay ve kısa sürede tedavi edilmesi mümkündür. Tedavi geciktiği takdirde amipler, korneanın derin tabakalarını istila eder ve bu durumda tedavi süresi birkaç ay, bir yıl ya da daha uzun olabilir. Bunun yanında hastalığın tekrar etme olasılığı artar, çünkü dokudaki trofozoitler kist formuna geçer ve kullanılan birçok amoebisidal ilaç, kistlere etki etmez. Tedavide başarısızlık sık görülen bir durumdur, bunun sebebi de kullanılan ilaçların

zayıf etki göstermesi, tedavi süresinin yetersiz olması veya etkenin ilaçlara direnç kazanması olabilir^{6,39,40,41}.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Ü Proteinaz K
- Ü *Acanthamoeba* primerleri
- Ü Agar
- Ü QIAmp® DNA Minikit
- Ü Tryptose
- Ü Tris baz
- Ü Magnezyum klorür
- Ü dNTP mix
- Ü Borik asit
- Ü Etidyum bromid
- Ü Na₂EDTA
- Ü Taq polimeraz
- Ü Prob

3.2. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Malzemeler

- Ü Termal cyclers
- Ü Real-Time PCR cihazı
- Ü Binoküler Işık Mikroskobu
- Ü Mini gel elektroforez tankı
- Ü Ependorf Tüpü (1,5 ml)
- Ü Santrüfuj
- Ü Etüv
- Ü Hassas terazi
- Ü Mikrodalga Fırın
- Ü Mikropipet
- Ü Derin dondurucu
- Ü Pipet Uçları
- Ü TBE Buffer

Ü Jel Görüntüleme Sistemi

Ü UV lamba

3.3. Örneklerin Toplanması

Tez kapsamında Diyarbakır, Batman, Mardin, Siirt, Bitlis ve Van illeri çalışma alanı olarak belirlendi. İllerin bağlı bulunduğu ilçe ya da köylerde bulunan kaynak suları, kaplıca suları, havuz suları, sulama kanalları ve toprak örnekleri toplandı (Toplanan örneklerinin dağılımı çizelge 4 de görülmektedir.) Steril edilmiş su kaplarına 100 - 500 ml su ve 200 - 400 gr toprak örneği toplandı. Her örneğin üzerine örneğin hangi ilden ve alandan alındığı, sudan alınmışsa suyun sıcaklığı, topraktan alınmışsa ortam sıcaklığı ölçülerek steril kapların üzerine yazıldı. Bu kapsamda toplam 65 örnek toplandı.

Çizelge 5. Toplanan örneklerin şehirlere göre dağılımı

Şehir	Örnek sayısı
Bitlis	11
Siirt	16
Diyarbakır	10
Mardin	9
Batman	8
Van	11
Toplam	65

3.4. Kaplıca Sularından ve Yüzme Havuzlarından Örneklerin Alınışı

Steril kaplara su örnekleri doldurup çalkalandı. Bu işlem 2-3 kez tekrar edilerek kabın içerisine su örnekleri toplandı. Kaplıca ve yüzme havuzlarından örnekler farklı alanlardan (yüzme alanı, atlama alanı, yürüyüş alanı) toplandı. Hamamlarda sıcak ve soğuk suyun aktığı oluğun dibini ve insanların keselenmek için uzandığı mermer taşı

bisturi ve pastör pipeti kullanılarak kazıntı ve su örnekleri alındı. Her örneğin üzerine suyun sıcaklığı, hangi alandan ve hangi ilden alındığı yazıldı.



Şekil 5. Sulama havuzundan örnek alınması

3.5. Akarsuyu ve Göllerden Örnek Alınışı

Akarsuyun durgun yerlerinden steril kap ağzı açık olarak ve baş aşağı olacak şekilde suya daldırılarak alındı. Park ve bahçe süs havuzlarında bisturi ve pastör pipeti kullanarak kazıntı sürüntüsü alındı.



Şekil 6. Kaynak suyundan örnek alınması

3.6. Toprakta Örnek Alınması

Su kaynaklarına yakın bölgelerden toprağın 0-5 cm derinlikte nemli alandan 200-400 gr toprak örneği alındı.



Şekil 7. Park bahçelerinden toprak alınması

3.7. Mikroskopik inceleme, Örnekler için Kültür Hazırlanması ve Ekilmesi

Toplanan toprak örneklerinde bulunabilecek *Acanthamoeba* spp.'lerinin tespit edilmesi için yoğunlaştırma yöntemiyle çöktürme işlemi yapmak için örnekten bir ceviz tanesi kadar alınarak cam veya plastik bir kabın içine kondu. Üzerine 100 ml steril damıtık su eklenip bir cam veya plastik çubukla karıştırılarak ezildi. Çift katlı gazlı bezden huni yardımıyla bir santrifüj tüpüne süzülür. 3000 devirde 1-3 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı yavaşça döküldü. Tüpün dibinde kalan çöküntüden (sedimentten) bir damla alındı. Mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi. Çöktürme yapıldıktan sonra lam-lamel arası örnek hazırlanarak mikroskopta (X10, X40) direk bakışı yapıldı.

Örneklerin kültür ortamında üretilmesi için besiyeri hazırlandı: 13 gr Agar (American Bacteriological Agar), 500 ml damıtık su içinde eritildi; otoklavda 121⁰C'de 15 dakika steril edildikten sonra, sıcakken, 2 saat sterilizasyona bırakılan petri kaplarına 7 ml döküldü ve bir gün bekledikten sonra ekim için kullanıldı. Örnekler ekilmeden önce besiyerlerinin yüzeyine *E. coli* sürüldü ve pastör pipetiyle alınan örnekler Non-Nutrient Agar (NNA) besiyerine ekilerek 30⁰C' de 7 gün inkübasyonda bırakıldı.

Besiyerlerinde üreme olup olmadığı petri kutuları açılmadan stereo mikroskop ile 10'luk objektif ile incelendi. Bu inceleme ile *Acanthamoeba* trofozoitlerinin bulunduğu erken dönemde kontraktıl vakuollerinin ve çekirdeklerinin görünümüyle, 40'luk objektifte ise sonraki dönemlerdeki tipik kist görünümüleriyle ayırt edildi. Daha sonra, *Acanthamoeba* üreyen petriker DNA eldesi için ayrıldı.

3.8. Örneklerin DNA İzolasyonu

Acanthamoeba üremesi olan petri kutularının üzerine dökülen 2 ml steril damıtık su agar üzerine yapışmış parazitler ile karıştırılarak ependorflarda toplandı. 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek *Acanthamoeba*'ların ependorfun dip kısmında toplanması sağlandı. Santrifüj edilen ependorfların dip kısmında yaklaşık 1 ml sıvı bırakılarak üst kısımdaki sıvı boşaltıldı. Ependorflar vorteks yardımı ile karıştırılarak dipteki peletin dağılması sağlandı. Yapılan bu işlem sonucu *Acanthamoeba* cinsi amiplerin trofozoit ve kistleri yoğun bir şekilde elde edilmiş oldu. Kültür de üremesi olmayan tüm toprak ve su örnekleri de aynı şekilde ependorf tüplerine toplanarak 3 dakika 3000 rpm de santrifüj edildi.

Tüm örneklerin bulunduğu ependorfların dip kısmından 200 milimikron alınarak DNA izolasyonu yapıldı.

DNA izolasyonu protokolünün aşağıdaki 1. basamağından itibaren devam edildi. İzole edilen DNA'lar konvansiyonel PCR ve real time PCR çalışması yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.9. DNA İzolasyon Protokolü (QIAmp® DNA Minikit, Almanya, QIAGEN)

1. 1,5 ml'lik ependorf tüpüne kültürden alınan *Acanthamoeba* örneği eklendi.
2. 20 µl proteinaz K eklendi ve 15 saniye vorteks yardımı ile karıştırıldı.
3. 56°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında 3 kez vortekslendi.
4. Kapaktaki damlacıkların uzaklaştırılması amacıyla kısa süreli santrifüj edildi.
5. 200 µl etanol (%96-100) eklendi. 15 saniye boyunca vortekslendi.
6. 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü kapaktaki damlacıkların uzaklaştırılması amacıyla 1 dakika santrifüj edildi.

7. 2 ml'lik toplama tüpleri içerisinde bulunan QIAmp spinocolum'lara aktarıldı. Kapakları kapatıldı ve 6000 x g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. QIAmp Mini spinocolum'ların kapakları dikkatlice açılarak içerisine 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapakları kapatıldı ve 6000 x g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. QIAmp Mini spinocolum'lar 2 ml'lik temiz toplama tüplerine yerleştirildi, filtre içeren toplama tüpleri atıldı.
10. QIAmp Mini spinocolum'ların kapakları dikkatlice açılarak içerisine 500 µl Buffer AW2 eklenir. Kapaklar kapatıldı ve 20.000 x g (14.000 rpm)'de 3 dakika santrifüj edildi.
11. QIAmp Mini spinocolumn'lar 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. filtre içeren toplama tüpleri atıldı.
12. QIAmp Mini spinocolum'ların kapakları dikkatlice açılarak içerisine 200 µl Buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi 6000x g (8000rpm). Elde edilen DNA örnekleri PCR çalışması yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı⁴².

3.10. DNA Amplifikasyonu İçin Gerekli Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler

3.10.1. Çözeltiler

10x (KCI) Tamponu:

700 mM/l

200 mM/l

% 0.1 Tween 20

3.10.2. PCR Karışımı

Çizelge 6. PCR karışım oranları

10x (KCL) Tamponu	5µL
12.5 mM dNTP	1 µL
25 mM MgCl ₂	5 µL
25 mMTaqDNA polymerase	1 µL
Steril damıtık su	33 µL

3.10.3. Primerler

Acanthamoeba cinsi amiplerin konvansiyonel PCR ile tanımlanmasında 18S rDNA gen bölgesine yönelik primerler kullanıldı. JDP1 ve JDP2 primerler ile yapılan ampilifikasyon sonucu, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin 18S rDNA gen bölgesinde yaklaşık 423 ila 551 baz çifti arasında ortalama 500 bp'lik bölge çoğaltılmaktadır⁴².

Forward: JDP1 (5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3')

Reverse: JDP2 (5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA-3')

3.10.4. Amplifikasyon Koşulları

PCR tamponu	12.5µL
gDNA	5 µL
JDP1	1.5µL
JDP2	1.5µL
Steril su	4.5µL

3.11. Termal Cyler PCR Protokolü

JDP1 ve JDP2 primerleri kullanarak amplifiye edilmek istenen DNA uzunluğuna ve primer içeriğine bağlı olarak sıcaklık ve süre değişmektedir. Kullandığımız PCR protokolü tabloda gösterilmektedir.

Çizelge 7. PCR protokolü

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	1 dakika	45 döngü
Primer bağlanması	65 °C	1 dakika	45 döngü
Zincir bağlanması	72 °C	1 dakika	45 döngü
Zincir uzaması	72 °C	10 dakika	1 döngü



Şekil 8. Thermal Cycler cihazı (Senquest)

Amplifikasyon ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra değerlendirildi. Negatif sonuç alınan örnekler için aynı amplifikasyon işlemi tekrarlandı.

3.12. Agaroz Jel Elektroforezi Hazırlanması

Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla %2,5'lik agaroz jel kullanıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez işlemi sırasında TBE (Tris-Borik asit EDTA) tamponu kullanıldı. Toz halindeki 1 gram agaroz tartılıp erlenmayere konularak üzerine 40 ml 1X TBE tamponu eklendi. Mikrodalga fırında agarozun iyice erimesi sağlandı ve 50 °C'ye kadar soğuması beklendi. Agaroz üzerine Etidyum Bromür çözeltisinden 10 µl eklendi. Agaroz jel, taraklar yerleştirilerek jel dökümü için hazır hale getirilen yatay jel tablasına dikkatlice boşaltıldı. Jelin katılaşması beklendi ve taraklar jele zarar vermeden çıkarıldı. Her örneğin 10 µl'si birbirini izleyen kuyulara,

DNA markeriyle kuyucuklara yüklenerek jel haznesinin kapağı kapatıldı. 150V'da yaklaşık 45 dakika yürütülerek DNA ayırımı yapıldı. Elektroforez tankından çıkarılan DNA örnekleri suda 5-10 dakika beklendi. DNA fragmanları UV altında görüntülendi.

3.13. 5X TBE Tamponu:

Trisbaz 54,0 g

Borik asit 27,5 g

Na₂EDTA 20 ml

pH 8.0' a ayarlandı ve 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında stoklandı



Şekil 9. A) Jel Görüntüleme Sistemi B) Elektroforez tankı

3.14. Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP)

Konvensiyonel PCR çalışması sonucu pozitif bulunan 15 ürün HaeIII ve HindIII enzimleri ile kesildi. Bu enzimlerin tanıma bölgeleri ve kesim sonucu oluşacak bantların uzunluğu her suş için farklılık gösterdiğinden değerlendirme cetveline göre hangi *Acanthamoeba* türü oldukları belirlendi. PCR ürünü kesilmesi için; Distile su 2.0 µl, Bufer R⁺ 1.5 µl, HaeIII veya HindIII 0.5 µl, PCR ürünü 11.0 µl toplam 15.0 µl olacak şekilde 37 °C'de 4 saat thermal cyler'de tutuldu. Daha sonra *Acanthamoeba* türlerinin belirlenmesi için restriksiyon enzimleri ile muamele edilen ürünler agaroz jelde yürütüldü. PCR ürünü kesilmesi ile ortaya çıkan bantlar kesilen bölgelerine göre değerlendirilerek *Acanthamoeba* türlerinin tanımı yapıldı.

Kullanılan restriksiyon enzimlerin kesilen bölgeleri aşağıda görüldüğü gibidir.

HaeIII (*Haemophilus aegyptius*) restriksiyon enzimi

5'...GG↓CC...3'

3'...CC↑GG...5'

HindIII (*Haemophilus influenzae*) restriksiyon enzimi

5'...A↓AGCTT...3'

3'...TTCGA↑A...5'

3.15. Real-Time PCR

AcantF900 (5'-CCC AGA TCG TTT ACC GTG AA-3') ve AcantR1100 (5'-TAA ATA TTA ATG CCC CCA ACT ATC C-3') primerleriyle birlikte TaqMan probe AcantP1000 (5-Fam5-CT GCC ACC GAA TAC ATT AGC ATG G-BHQ3-3) kullanılarak toplanan örnekler değerlendirildi.

Çizelge 8. Real Time PCR çalışma protokolu

Denatürasyon	95 °C	15 saniye	40 döngü
Primer bağlanması	60 °C	3 saniye	40 döngü
Zincir uzaması	72 °C	10 saniye	40 döngü

Rotorgene 2X PCR Prob Mix 10 µL

Primer Probe 1 µL

Distile su 4 µL

gDNA 5 µL



Şekil 10. Real Time PCR Cihazı Rotorgene 3000 (Germany)

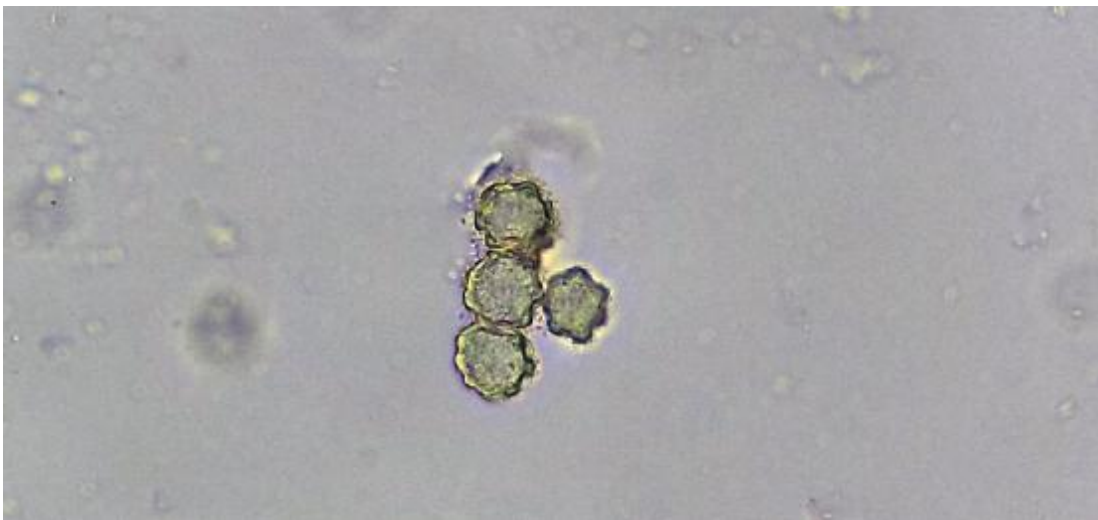
4. BULGULAR

4.1. Mikroskopik İnceleme Sonuçları

Diyarbakır, Batman, Mardin, Siirt, Bitlis ve Van illerine bağlı yüzme havuzlarından, kaplıca sularından, hamamlardan, sulama kanalından toplanan su örnekleri ile park ve bahçelerden alınan toprak örneklerinin; mikroskopik inceleme sonuçlarına göre toplam 65 örneğin 6 tanesinde *Acanthamoeba* spp. tespit edilirken, örneklerin 59 tanesinde *Acanthamoeba* spp. saptanmadı.

Çizelge 9. Mikroskopik inceleme sonuçları

Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif	Negatif
Bitlis	11	2 (%18,18)	9 (%81,82)
Van	11	0 (%0)	11 (%100)
Siirt	16	1 (%6,25)	15 (%93,75)
Batman	8	1 (%12,5)	7 (%87,5)
Mardin	9	1 (%11,11)	8 (%88,89)
Diyarbakır	10	1 (%10,00)	9 (%90,0)
Toplam	65	6 (%9,23)	59 (%90,77)



Şekil 11. Mikroskopik inceleme sonucu 40x büyütmede *Acanthamoeba* spp.

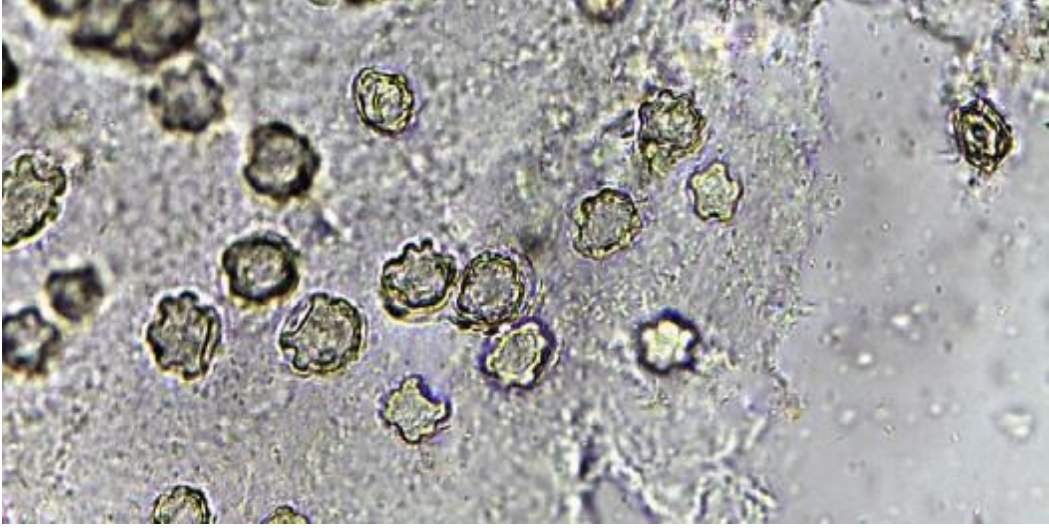
4.2. Kültür İnceleme Sonuçları

Etüvde 7 gün bekletilen petri kutularından alınan kazıntı örneklerinden lamel arası preparat yapılıp ışık mikroskobunda 40'lık objektifle *Acanthamoeba* spp. varlığı incelendi. İnceleme sonucunda 65 örneğinin 11 tanesinde rme olduğu, 54 tanesinde ise üreme olmadığı gözlemlendi. Onbir rneğın mikroskopta hem kist hem de trofozoit formları morfolojik olarak değerlendirildi ve buna göre gruplandırılmaları yapıldı. Kist ve trofozoit formların ayrı ayrı fotoğrafları çekildi (Şekil 3, 12).

Çizelge 10. Kültür İnceleme Sonuçları.

Şehir	rnek Sayısı	Pozitif	Negatif
Bitlis	11	2 (%18,18)	9 (%81,82)
Van	11	2 (%18,18)	9 (%81,82)
Siirt	16	3 (%18,75)	13 (%81,25)
Batman	8	1 (%12,5)	7 (%87,5)
Mardin	9	2 (%22,22)	7 (%77,78)
Diyarbakır	10	1 (%10)	9 (%90)
Toplam	65	11 (%16,92)	54 (%83,08)

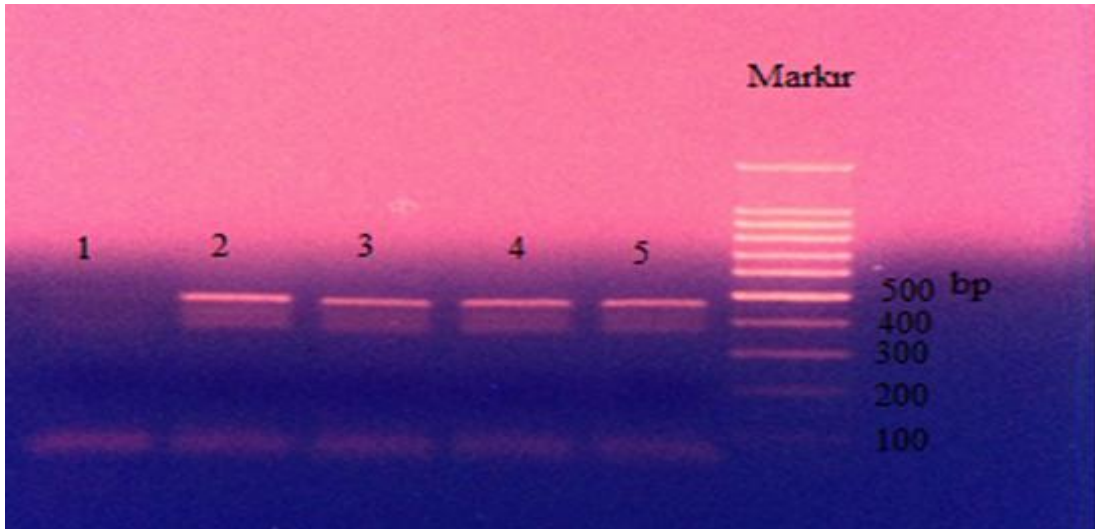
Pozitif bulunan toplam 11 örneğın kist morfolojilerine göre 7 tanesinin grup II'de bulunan *A. castellanii* veya *A. polyphaga*'ya ait olduğu, 4 tanesinin de grup III'de bulunan *A. palestinensis* olduğu saptanmıştır.



Şekil 12. Kültür inceleme sonucu 40x büyütmede *Acanthamoeba* spp.

4.3. Konvansiyonel PCR Yöntemi Sonuçları

Çalışma alanlarından toplanan su, toprak ve ayrıca kültür ortamında üretilen *Acanthamoeba*'ların DNA'ları JDP1 ve JDP2 primerleri ile amplifiye edildi ve yaklaşık 423-530 bp uzunluğu arasında band elde edilen örnekler pozitif olarak kabul edildi. Toplam 65 örnekten 15 tanesi PCR yöntemi ile pozitif sonuç verirken 50 örnek negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 13. Konvansiyonel PCR yönteminde örneklerin jel görüntüsü (1; Negatif kontrol, 2; Pozitif kontrol, 3, 4, 5 pozitif örnekler)

4.4. Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP)

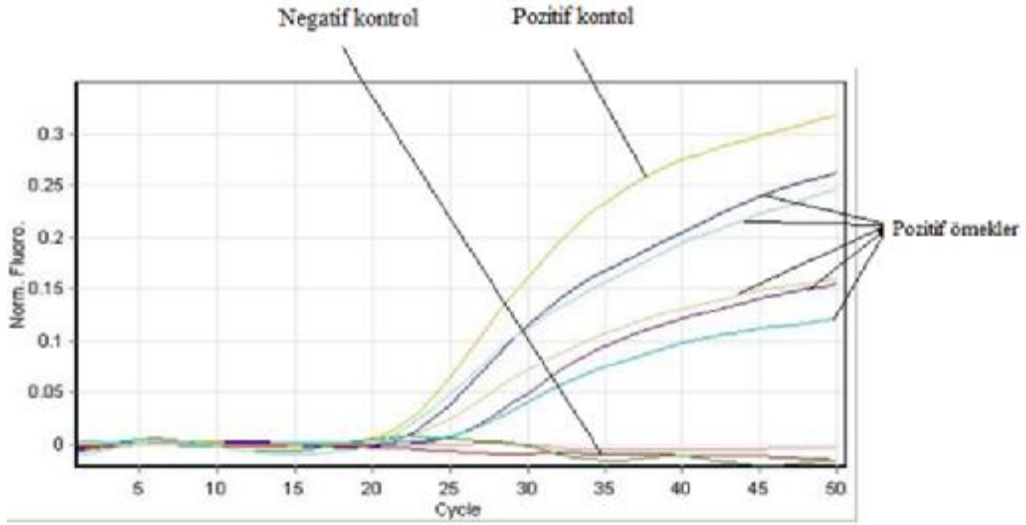
Kültür yöntemi ile pozitif bulunan toplam 11 örneğin kist morfolojilerine göre 7 tanesinin grup II'de bulunan *A. castellanii* veya *A. polyphaga*'ya ait olduğu, 4 tanesinin de grup III'de bulunan *A. palestinensis* olduğu saptanmıştı. Bu örneklerin RFLP kesimi sonrasında grup II'de kültür sonrası morfolojik inceleme ile değerlendirilen 7 örneğin 4'ünün *A. castellanii* ve 3 tanesinin de *A. polyphaga* olduğu saptandı. Kültür sonrası morfolojik inceleme ile grup III'de saptanan 4 adet *A. palestinensis* suşunun enzimler ile kesimi sonrasında *A. palestinensis* olduğu doğrulandı. Ancak kültürde üreme gözlenmeyen su ve toprak örneklerinden *Acanthamoeba* olduğu konvansiyonel PCR yöntemi ile saptanan 4 örneğin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonrasında *A. palestinensis* olduğu belirlendi.

4.5. Real Time PCR Yöntemi Sonuçları

Kültür ortamında üreyen *Acanthamoeba* spp.'lerin DNA'ları izole edildi ve DNA örnekleri AcantF900-AcantR1100 primerleri ile AcantP1000 probu kullanarak real time PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Toplam 65 örnekten 15 tanesi Real-Time PCR yöntemi ile pozitif sonuç verirken, 50 tanesi negatif sonuç verdi.

Çizelge 11. Real-Time PCR Yöntemi Sonuçları

Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif	Negatif
Bitlis	11	2(%18,18)	9(%81,82)
Van	11	3(%27,27)	8(%72,73)
Siirt	16	4(%25)	12(%75)
Batman	8	2(%25)	6(%75)
Ardin	9	2(%22,22)	7(%77,78)
iyarbakır	10	2(%20)	8(%80)
Toplam	65	15(%23,08)	50(%76,92)



Şekil 14. Real-Time PCR yönteminin sonuçları

4.6. Duyarlılık Ve Özgüllük Sonuçları

4.6.1. Mikroskopi ve Kültür İnceleme Sonuçlarının Karşılaştırılması

Çizelge 12. Mikroskopi ve kültür inceleme sonuçlarının karşılaştırılması

	Mikroskopi Pozitif	Mikroskopi Negatif	Toplam
Kültür Pozitif	6	5	11
Kültür Negatif	0	54	54
Toplam	6	59	65

Duyarlılık: $6/(6+0) \times 100 = 100$

Özgüllük: $54/(54+5) \times 100 = 91,53$

Toplanan örneklerin kültür ve mikroskobik inceleme sonuçları karşılaştırıldığında kültür yönteminin mikroskobik inceleme yöntemine göre duyarlılığı %100, özgüllüğü %91,53 olarak bulundu.

4.6.2. Konvansiyonel PCR ve Kültür Sonuçlarının Karşılaştırılması

Çizelge 13. Konvansiyonel PCR ve kültür inceleme sonuçlarının karşılaştırılması

	PCR Pozitif	PCR Negatif	Toplam
Kültür Pozitif	11	0	11
Kültür Negatif	4	50	54
Toplam	15	50	65

Duyarlılık: $11/(11+4) \times 100 = 73,33$

Özgüllük: $50/(50+0) \times 100 = 100$

Toplanan örneklerde konvansiyonel PCR ve kültür inceleme yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında kültür yönteminin, konvansiyonel PCR yöntemine göre duyarlılığı %73,33 özgüllüğü % 100 olarak bulundu.

4.6.3. Real-Time PCR ve Kültür Sonuçların karşılaştırılması

Çizelge 14. Kültür ve Real-Time PCR inceleme sonuçlarının karşılaştırılması

	RT PCR Pozitif	RT PCR Negatif	Toplam
Kültür Pozitif	11	0	11
Kültür Negatif	4	50	54
Toplam	15	50	65

Duyarlılık: $11/(11+4) \times 100 = 73,33$

Özgüllük: $50/(50+0) \times 100 = 100$

Toplanan örneklerin Real-Time PCR ve kültür yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında kültür yönteminin Real time PCR yöntemine göre duyarlılığı %73,33 özgüllüğü % 100 olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

Acanthamoeba türlerinin doğal çevrede serbest bulunmasından dolayı, insanların bu parazitle enfekte olma riski yüksektir²⁰. *Acanthamoeba* türleri GAE, Kutanöz Acanthamoebiasis, *Acanthamoeba* keratiti oluştururken, AIDS'li hastalarda enfeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler². Klinik tanıda asemptomatik olgularda laboratuvar bulguları büyük önem arz etmektedir. Etkenin laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. *Acanthamoeba* tanısında kullanılan tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir⁴³. Yapılan moleküler çalışmalarda 20 genotip (T1-T20) ve 24 *Acanthamoeba* türü bulunduğu belirlenmiştir. Keratit ve GAE olgularından elde edilmiş izolatların tüm dünya vakalarında büyük bir bölümünün T4'e ait olduğu bildirilmiştir. Moleküler genotiplendirmede, T4 genotipinin *A. castellanii* olduğu bildirilmiştir.^{6,11,12,18,44,45} GAE, AK ve Kutanöz Acanthamoebiasis etkeni oldukları bilinen *Acanthamoeba* türlerine bağlı enfeksiyonların, son yıllardaki artışı dikkat çekmektedir¹¹. Bu enfeksiyonlarda erken tanı ve etkili tedavi hastalığın eradikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Her ne kadar klinik araştırmalarda parazitin varlığını ve genotiplerini saptamaya yönelik çalışmalar yayınlanmış olsa da halen birçok bölgede doğada bulunan *Acanthamoeba* spp. varlığını saptamaya yönelik çalışmalar yeterli değildir. Bu nedenle bu çalışmada daha önce *Acanthamoeba* üzerine araştırma yapılmamış iller tercih edilmiştir.

Acanthamoeba'nın etkeni olduğu hastalıklarda hızlı ve erken tanı koymak çok önemlidir. Mikroskopik inceleme yöntemi duyarlılığı düşük olmasına rağmen hızlı ve maliyeti düşük olduğu için *Acanthamoeba* tanısında başvurulan bir yöntemdir. Ancak yalancı negatifliği oldukça yüksektir. Bu nedenle *Acanthamoeba* spp. tanısında kullanılan tanı testi olarak kültür yöntemi tercih edilmektedir. Bu çalışmada kültür yöntemi ile mikroskopik inceleme yöntemi karşılaştırıldığında kültür yönteminin duyarlılığı %100 olarak elde edildi. Son yıllarda tüm hastalıkların tanısında yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanan moleküler yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğünün kültür yöntemlerinden daha yüksek olduğu bilinmektedir. Çalışmada, kültür yöntemi ile konvansiyonel PCR yöntemi karşılaştırıldığında kültür yönteminin duyarlılığı %73,33

bulundu. Ayrıca, kültür yöntemi ile Real time PCR yöntemi karşılaştırıldığında ise kültür yönteminin duyarlılığı %73,33 olarak saptandı.

Laboratuvar tanı yöntemlerinden kültür ve mikroskopi yöntemlerini karşılaştırdığımızda; kültür yönteminin mikroskopi yöntemine göre özgülüğü %91,53 olarak saptandı. Aynı şekilde kültür yöntemi ile konvansiyonel PCR yöntemini karşılaştırdığımızda kültür yönteminin özgülüğü %100 olarak bulundu. Kültür yöntemi ile Real time PCR yöntemini karşılaştırdığımızda ise kültür yönteminin özgülüğü %100 olarak elde edildi.

Bu sonuçlar kültür yönteminin mikroskobik inceleme yöntemine göre üstünlüğünü ancak moleküler yöntemlerden konvansiyonel PCR ve Real time PCR yöntemlerine göre yetersizliğini ortaya çıkarmıştır.

Dünyanın çeşitli bölgelerinde görülen *Acanthamoeba* türlerinin her sosyal statüdeki insanı enfekte edebilme özelliği bulunduğundan, insan sağlığı bakımında araştırılması için moleküler yapısının incelenmesi çok önemlidir. Çünkü doğadan elde edilen izolatların patojen karektere sahip olup olmadığının bilinmesi önemlidir. Dünyada birçok araştırmada *Acanthamoeba*'nın genotiplendirilmesi ile ilgili moleküler yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda en çok kullanılan gen bölgesi *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA gen bölgesidir^{25,46}.

Günümüzde *Acanthamoeba* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlarda önemli bir artış görülmüştür. 1980 yıllarına kadar nadir görülen *Acanthamoeba keratiti*, bu yıllardan sonra özellikle kontakt lens kullanımının artmasıyla sık görülmeye başlamıştır. Kontakt lens kullanımının yanında, kontamine sularla temas, travma, kornea ile amibin direkt teması sonucu oluşan hastalığın tanısı ve tedavisi oldukça zordur^{6,8,12}

2010 yılında Malezya'da Init ve arkadaşları *Acanthamoeba*'ların yüzme havuzlarında görülme sıklığını ve bu parazitlerin yüzme havuzlarının hangi bölgelerinde daha çok görüldüğü ile ilgili bir araştırma yapmışlardır. Havuzun duvar kenarı, yüzücülerin atlama yeri, yüzmek için kullanılan alan gibi yüzme havuzunun farklı üç bölgesinden su örnekleri almışlardır. Yüzme havuzunun duvar kenarında %76, yüzücülerin atlama yerinde %64,7 ve yüzücüler tarafından az kullanılan orta alanda %19,4 oranında *Acanthamoeba* varlığı saptanmıştır⁴⁵. 2011 yılında Li-Li Chan ve arkadaşları Malezya'da serbest yaşayan amipleri elde etmek için otomobil ve konutlardaki klima sistemlerin üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada; topladıkları 87

toz partikül örneğini incelemişlerdir. Li-Li Chan ve arkadaşları klima sistemlerinden elde ettikleri örnekleri canlı *E. coli* sürülmüş besleyici değeri olmayan agar içeren petrilere ekmiş ve bir hafta sonra mikroskopik incelemede *Acanthamoeba* varlığı saptamışlardır. Daha sonra pozitif bulunan örneklerin moleküler düzeydeki analizlerini yapmışlardır⁴⁷. Bulgaristan'da yapılan bir çalışmada ise göl, nehir, sıcak su kaynakları, toprak, kum gibi birçok çevresel örnek incelenmiş, bu örneklerden 11 toprak örneğinin tamamında, 24 kum örneğinin 22'sinde *Acanthamoeba* izole ettiklerini bildirmişlerdir⁴⁸. Yurdumuzda, bu amiplerle ilgili Erzurum'da yapılan ilk saha çalışmasında kar altından alınan toprak örneğinden bir *Acanthamoeba* türünün izole edildiği bildirilmiştir⁴⁹. Sivas'ta yapılan bir çalışmada ise kuru toprak örneğinde ve bir su birikintisinin altındaki çamur ve etrafındaki toprak örneğinden yapılan ekimlerde, *Acanthamoeba* izole edildiği bildirilmiştir⁸. Saksı toprağının incelendiği bir çalışmada ise *Acanthamoeba* cinsinin hem kist hem de trofozoitlerinin görüldüğü bildirilmiştir⁵⁰. Kuk ve arkadaşları, Kayseri ve çevresinden toplamış oldukları çevresel materyal (29 su örneği; 26 kuyu suyu, 3 çeşme suyu) örneklerinden *Acanthamoeba* spp. tespit etmişler. Bulunan *Acanthamoeba* spp. örnekleri ile ilgili moleküler çalışmalar yapmışlardır. Yapılan genotiplendirme sonucunda *Acanthamoeba*'ların hepsinin T4 genotipine sahip olduğu saptanmıştır¹. Yine yurdumuzda yapılan çalışmalardan Ankara'da Kılıç ve arkadaşları 2 su örneği, ve 28 toprak örneğinden *Acanthamoeba* izole etmişler. Bu parazitlere yapılan DNA sekansı sonucunda T2, T3, T4 ve T7 genotiplerinin olduğu saptanmıştır⁵¹.

Bu çalışmada Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinin çeşitli il, ilçe ve köylerinden toplanan örneklerden *Acanthamoeba* spp. varlığı tespit edildi. İncelenmesi yapılan ve pozitif olarak değerlendirilen 15 tane örneğin kist yapılarını ve moleküler analizlerini değerlendirdiğimizde 4 *A. castellanii*, 3 *A. polyphaga*'ya ait olduğu ve 8 *A. palestinensis*'in olduğu saptandı.

Acanthamoeba spp. ile ilgili bildirilen çalışmaların çoğunluğu göz kliniğine gelen vakalardan oluşmaktadır. Yapılan mikroskopi, kültür ve moleküler tanı yöntemleri ile vakaların çoğunun *Acanthamoeba* keratiti ve T4 genotipinin baskın olduğu bildirilmiştir. T4 genotipi sonrasında çoğunlukla T2 ve T3 genotipi bildirilmiştir. *Acanthamoeba* keratitinde kontakt lens kullanımı önemli bir risk faktörü kabul edilse de, gözde travma olmaması *Acanthamoeba* keratiti olma riskini azaltır. Çevresel materyallerde serbest yaşayan *Acanthamoeba* spp. bulunması gözde travma

meydana gelen kişiler için büyük bir risk oluşturur. Bir çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi göz kliniğine gelen kontakt lens kullanmayan ve her iki gözde görmede bulanıklık, yanma, batma ve kızarıklık şikayetleriyle başvuran hastada *Acanthamoeba* türü tespit edilmiştir. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda T4 genotipi *Acanthamoeba castellani* saptanmıştır⁵². Erdem ve arkadaşları kontakt lens kullanımı bulunmayan 26 kişide *Acanthamoeba* keratiti saptamış ve bu kişilerin travma sonrasında enfeksiyonu aldığını ve olgularda tanı testlerinden mikroskopi ile %15,3, kültür ile %46,1, konvensiyonel PCR yöntemi ile %92,3 ve real time PCR yöntemi ile %100 pozitiflik bulduklarını bildirmişlerdir⁵³. Koltaş ve arkadaşları ise kontakt lens kullanmayanlarda saptanan *Acanthamoeba* keratiti olgularının 22'sinin evlerinde kullandıkları çeşme suyu örneklerini incelemişler ve yarısında *Acanthamoeba* spp. saptamışlardır. İncelenen su örneklerinin %63,6'sının T4 genotipinde *A. castellani* olduğunu, ayrıca T3 ve T15 genotiplerini de saptadıklarını bildirmişlerdir⁵⁴. Bununla birlikte ülkemizin çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda çevresel materyallerden alınan örneklerden *Acanthamoeba* spp. izole edilmiştir. Bu *Acanthamoeba*'lar arasında T2, T3, T4, T7, T9 ve en son Eyyapan ve arkadaşları T15 genotipini tespit etmişlerdir⁵⁵. Bu çalışmalar klinik örneklerden elde edilen suşların doğadan toplanan suşlar ile genotipik benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamız Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılan ilk saha çalışmasıdır. Bu çalışma ile bölgede doğada serbest yaşayan *Acanthamoeba* suşları saptanmış olup bunların *Acanthamoeba* keratiti için risk oluşturduğu ortaya çıkartılmıştır. Bu nedenle, Doğu ve Güneydoğu bölgelerinde meydana gelebilecek keratit olgularında *Acanthamoeba* keratiti bulunabileceği göz hekimleri tarafından değerlendirilmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çevremizde yaygın olarak bulunan protozoonlardan serbest yaşayan amipler (SYA) dünyada geniş bir dağılım gösterir. Bu amipler, doğada, rutubetli veya ıslak topraklarda, kanalizasyon sularında, göllerde, yüzme havuzlarında, baraj göllerinde, kaplıca sularında, güneş enerji sularında, hamamlarda ve tatlı su birikintilerinde yaygın olarak bulunmakta, ayrıca hava filtrelerinde de yaşayabilmektedir. İnsanların doğa ile temasının artmasının, toprak, su ve havayı, kendi yararları için daha fazla kullanmaya başlamaları, doğada serbest yaşayan amiplerin (SYA) insan vücuduna girme olasılığını arttırmakta ve SYA'ların neden oldukları hastalıklar da artmaktadır.

Bu kaynaklarla temas halinde bulunan kişilerin *Acanthamoeba* parazitinin tehlikeleri ve korunma yolları hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir. Özellikle kontak lens kullanan, göz travması olan kişilerin yeteri kadar hijyen olmayan yüzme havuzları, hamamlar, kaplıca suları gibi enfeksiyon buluşma riskinin yüksek olduğu yerlerde dikkatli olmaları, temastan kaçınmaları ve *Acanthamoeba* paraziti hakkında bilgilendirilmeleri çok önemlidir.

Bu çalışma ile Doğu ve ilk kez Güneydoğu Anadolu bölgelerinin farklı il, ilçeler ve köylerinden alınan su ve toprak örneklerinde mikroskopi, kültür ve moleküler yöntemler kullanılarak *Acanthamoeba*'ların varlığı ortaya konuldu.

KAYNAKLAR

1. **Kuk S, Yazar S, Dođan S, Çentinkaya Ü, Sakalar C.** Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water, Turk J Med Sci., **2013**; 43(1): 12-17.
2. **Portakal ZA.** Deneysel olarak oluşturulan *Acanthamoeba* keratitinin histopatolojik gelişimi ve hastalığın tedavisi üzerine çalışmalar. Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, **2005**.
3. **Ergüden C.** Uçucu Yağların *Acanthamoeba* spp. Kist Ve Trofozoitleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **2015**.
4. **Özcel MA.** Tıbbi parazit hastalıklar, İzmir, Meta Basım, **2007**; 308-314.
5. **John DT.** Opportunistic Amoebae. "Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections" içinde. 9 th ed. Vol. 5. Edward Arnold Ltd. London. **1998**; 179-192.
6. **Marciano-Cabral F, Cabral G.** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin. Microbiol Rev, **2003**; 12(2), 273-307.
7. **Saygı G.** Temel Tıbbi Parazitoloji 2. Baskı. Es-Form Ofset Ltd Şti. Sivas. **2002**.
8. **Saygı G, Akın Z, Tecer H.** Sivas'ta toprak ve termal su örneklerinden *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türlerinin soyutulması. Türkiye Parazitol Derg., **2000**; 237-242.
9. **Cabral FM, Cabral G.** *Acanthamoeba* ssp. as agents of disease in humans. Clinical Microbiology Reviewe. **2003**; 273-307.
10. **Khan NA.** Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. Current Microbiology Vol. **2001**; 43:391-395.
11. **Siddiqui R, Khan NA.** Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites and Vectors **2012**; 5:6.
12. **Illingworth CD, Cook SD.** *Acanthamoeba* keratitis. Surv Ophthalmol. **1998**; 42(6): 493-508.
13. **Huang SW, Hsu BM, Chen NH, Huang CC, Huang KH, Chen JS, Kao PM.** Isolation and identification of Legionella and their host amoebae from weak alkaline carbonate spring water using a culture method combined with PCR. Parasitol Res. **2011**; 109:1233 1241.
14. **Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S.** Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. Journal of Clinical Microbiology. **2010**; 4636-4640.
15. **Alizadeh, H, Apte S, El Agha MS, Li L, Hurt M, Howard K, Cavanagh HD, McCulley JP, Niederkorn JY.** Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. Cornea **2001**; 20: 622-627.
16. **Khan NA.** *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health, FEMS. Microbiol Rev. **2006**; 30(4):564-95.

17. **Niyiyati M, Saberi R, Latif A, Lasjerdi Z.** Distribution of *Acanthamoeba* Genotypes Isolated from Recreational and Therapeutic Geothermal Water Sources in Southwestern Iran, *Libertas Academica* **2016**.
18. **Schuster FL, Visvesvara GS.** Free-living amoeba as opportunistic and non-opportunistic pathogens of human and animals. *Int Parasitol.* **2004**; 34: 1-27.
19. **Mashsood AH, Sissoons J, Rezain M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA.** *Acanthamoeba* genotype T4 from UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J. Med Microbiol.* **2005**; 755-759.
20. **Evyapan G.** Doğada serbest yaşayan *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2013**.
21. **Saygı G.** Paraziter Hastalıklar ve Parazitler. Es Form Ofset Ltd.ğti. Sivas **2009**.
22. **Akın Polat Z.** Toprak ve su örneklerinden özgür yaşayan amiplerin soyutulması tanımlanması özelliklerinin belirlenmesi ve patojenliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, **2001**.
23. **Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H.** Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* ssp. *Applied and Environmental Microbiology* **2000**; 4408-4413.
24. **Armstrong, M.** The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infect. Dis. Rev* **2000**. 2:65-73.
25. **Saygı G, Polat Z.** Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer amibik meningoensefalitis - Granüloamatöz amibik ensefalitis - Keratit). *ÇÜ Tıp Fak Derg.* **2003**; 25(3): 140-149.
26. <http://www.cdc.gov/parasites/Acanthamoeba/biology.html>. **2014**.
27. **John DT.** Opportunistically pathogenic free-living amebae. *Parasitic Protozoa*, 2 nd edition, vol 3, eds Kreier JP, Baker JR, Academic Press, San Diego, **1993**;143-246.
28. **Denney CF, Iragui VJ, Uber-Zak LD, Karpinski NC, Ziegler EJ, Visvesvara GS, Reed SL.** Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **1997**; 25: 1354-1358.
29. **Visvesvara GS, Stehr-Green JK.** Epidemiology of free-living ameba infection *J.Protozzool.* **1990**; 37:25-33.
30. **Dorsch MM, Cameron AS, Robinson BS.** The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **1983**; 372-7.
31. **Markell EK, John DT, Krotoski WA,** Markell and Voge's Medical Parasitology. 8th ed. WB Saunders Co Philadelphia **1992**; 52-62,
32. **Akyol N, Aşçı Z, Kükner S.** *Acanthamoeba* keratitis: The first reported case from Turkey. *Ophthalmic Practice: Asia Ed.* **1996**; 2: 46-48.
33. **Akısü Ç, Baka M, Durak İ, Orhan V.** *Acanthamoeba* keratitli bir olgu; Işık ve elektron mikroskopi bulguları. *T Parazitol Derg.* **1999**; 23: 340-342.

34. **Saygi G.** Studies on free-living amoebae. PhD. Thesis. Liverpool University, England, **1971**.
35. **Hay J, Seal DV.** *Acanthamoeba* keratitis, contact lenses and the potential health implications of global marketing. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* **1997**; 90: 331.
36. **Sharma S, Garg P, Rao GN.** Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol* **2000**; 84: 1103-1108.
37. **Schaumberg DA, Snow KK, Dana MR.** The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: Where do we stand?. *Cornea*, **1998**; 17(1): 3-10.
38. **Gonzalez MM, Gould E, Dickinson G, Martinez AJ, Visvesvara G, Cleary TJ, Hensley GT.** Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organism. *Arch Pathol Lab Med.* **1986**; 110: 749-751.
39. **Ficker L, Seal D, Warhurst D, Wright.** *Acanthamoeba* keratitis resistance to medical therapy. *Eye*, **1990**; 4: 835-838.
40. **Bacon AS, Frazer DG, Dart JKG, Matheson M, Ficker LA, Wright P.** A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. *Eye.* **1993**; 7: 719-725.
41. **Horne DD, Frizell ME, Ingham L, Jans RG, Gubash SM, Anand CM, Athar MA.** *Acanthamoeba* keratitis: an emerging clinical problem. *CMAJ.* . **1994**; 150: 923-925.
42. **Mehmet A.** Çeşitli Su Örnekleri Ve Su Örneklerinden İzole Edilen *Acanthamoeba* Türlerinde Francisella Tularensis Araştırılması, **2012**; Doktora Tezi.
43. **Ge Z, Zicheng QS, Shiyang A.** Rapid and sensitive diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Microbiol and Infect*; **2013**; doi 10.1111/1469-0691.12149.
44. **Visvesvara GS.** Classification of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases.* **2013**; 13:369–72.
45. **Crary MJ.** Genetic variability and its relationship to *Acanthamoeba* Pathogenesis. Master's thesis, Ohio State University, **2012**.
46. **Init I, Lau YL, Arin Fadzlun A, Foad Al, Neilson RS, Nissapatorn V.** Detection of free living amoeba, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Trop Biomed*, **2010**; 27(3):566-77.
47. **Li-Li Chan, Joon-Wah Mak, Yoon-Tong Low, Thuan-Tzen Koh, Init Ithoi and Shar Mariam Mohamed.** Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. From airconditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica.*, **2011**; 117(1): 23-30.
48. **Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, et al.** The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res*, **2004**;92: 405–413.
49. **Saygi G.** Erzurum'da toprakta *Acanthamoeba* türünün soyutlanması. *Türkiye Parazitoloji Derg.* **1979**; 2:109-114.
50. **Akın Z.** Toprak Ve Su Örneklerinden Özgür Yaşayan Amiplerin Soyutulması, Tanımlanması, Özelliklerin Belirlenmesi ve Patojenlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, **2000**.

51. **Kılıc A, Tanyüksel M, Sissons J, Jayasekera S, Khan N.** Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4, and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol.*, **2004**; 49:246-25.
52. **Ertabaklar Hatice Dayanır Volkan, Apaydın Pınar, Ertuğ Sema, Walochnik Julia.** *Acanthamoeba* Keratiti. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.***2009**; 33(4): 283-285.
53. **Erdem E, Evcil Y, Yagmur M, Eroglu F, Koltas S, Ersöz R.** Non –contact lens use related *Acanthamoeba* keratitis in southern Turkey: evaluation of risk factors and clinic features. *European Journal of Ophthalmology.* **2014**; 24 (2):164-72.
54. **Koltas IS, Eroglu F, Erdem E, Yagmur M, Tanır F.** The role of domestic tap water on *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers and validation of laboratory methods. *Parasitol Res,* **2015**; 114:3283-3289.
55. **Evyapan G, Koltas IS, Eroglu F.** Genotyping of *Acanthamoeba* T15: the environmental strain in Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **2015**; 109(3):221-4.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Siirt'te doğdum. İlköğretim Siirt'te tamamladıktan sonra liseyi Balıkesir Edremit Lisesinde bitirdim. Celal Bayar Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2 yıl sonra Kafkas Üniversitesinden 2 yıl okuduktan sonra 2012 yılında mezun oldum.2014 yılında Çukurova Üniversitesini Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na Arş. Gör.olarak atandım ve halen görevimi yapmaktayım.

