

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOĞADA SERBEST YAŞAYAN *ACANTHAMOEBA* TÜRLERİNİN
GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Biyolog Gülşah EVYAPAN

Parazitoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı

Yüksek Lisans Tezi

DANIŞMANI

Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ

ADANA

2013

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞADA SERBEST YAŞAYAN *ACANTHAMOEBA* TÜRLERİNİN GENOTİPLENDİRİLMESİ

Biyolog Gülşah EVYAPAN

Parazitoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı
Yüksek Lisans Tezi

DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TF.2011.YL.5'nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez No: TF.2011.YL.5

ADANA-2013

KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Doğada Serbest Yaşayan Acanthamoeba Türlerinin Genotiplendirilmesi”adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17 / 07 / 2013

İmza

Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Mehmet Macit İLKİT
Çukurova Üniversitesi
Rapörtör

İmza

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

İmza

Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

İmza

Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulununtarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince mesleğine ve hayata yaklaşımı ile bana örnek olan, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen tez danışmanım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince yanımda olan, bilgilerini paylaşan ve beni her konuda cesaretlendiren Dr. Fadime EROĞLU'na, tez çalışması için gerekli olan örneklerin toplanmasında yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Osman AŞILAR, Rüstem DEMİR ve Esin MÜLKPINAR'a, yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Parazitoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Her aile bir tarihtir, hatta okumasını bilene göre bir destandır. Hayatım boyunca içinde bulunacağım destanın bir parçası olmaktan gurur duyduğum, her zaman beni destekleyen ve bana sabır gösteren aileme, özellikle her şeyim olan kardeşim Gökhan EVYAPAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı TF.2011.YL.5 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Biyolog Gülşah EVYAPAN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Tarihçe	3
2.2.Taksonomi	4
2.3.Acanthamoeba Türleri	5
2.4.Acanthamoeba Genotiplendirilmesi	6
2.5.Morfolojisi ve İnce Yapısı	7
2.5.1.Trofozoit Şekli	7
2.5.2.Kist Şekli	8
2.6.Yaşam Döngüsü	9
2.7.Epidemiyolojisi	10
2.8.Granulomotoz Amibik Ensefalit (GAE)	11
2.8.1.GAE'nin Patojenitesi ve Klinik Belirtiler	12
2.8.2.GAE'nin Tanısı	12
2.8.3.GAE'nin Tedavisi	13
2.9.Acanthamoeba Keratiti	13
2.9.1.Acanthamoeba Keratitinin Bulaş Yolları ve Risk Faktörleri	13
2.9.2.Yerleştiği Organlar ve Patojenitesi	15
2.9.3.Lokal ve Klinik Belirtiler	15
2.9.4.Hastalığın Tanısı	16

2.9.5.Hastalığın Tedavisi	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1.Örneklerin Toplanması	17
3.1.1.Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Örnek Alımı	17
3.1.2. Toprak Örneği Alımı	18
3.2.Örnekler için Besiyerinin Hazırlanması ve Kültür Ortamı	19
3.3.Su ve Toprak Örneklerinden DNA izolasyonu	19
3.4.Amplifikasyon için Gerekli Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler	20
3.4.1.Çözeltiler	20
3.4.2.Yöntem	21
3.4.3.Amplifikasyon Koşulları	21
3.4.4.Termal Cyclus ve PCR Protokolü	21
3.4.5.Agaroz Jel Elektrofrez ve Örneklerin Yürütülmesi	22
3.4.5.1.Çözeltiler	22
3.4.5.2.Yöntem	22
3.5.PCR Ürünün Saflaştırılması	22
3.5.1.Yöntem	23
3.6.DNA Dizi Analizi	23
3.6.1.Dideoksi Terminasyon Reaksiyonu	23
3.6.2.Terminasyon Reaksiyon Ürünün Purifikasyonu	24
3.6.3.DNA Dizi Analizi Cihazının Çalışma Programı	24
4. BULGULAR	26
4.1.Mikroskopik İnceleme sonuçları	26
4.1.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin Mikroskopik İnceleme Sonuçları	27
4.1.2. Toprak Örneklerinin Mikroskopik İnceleme Sonuçları	27
4.2. Kültür Sonuçları	28
4.2.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin Kültür Sonuçları	28
4.2.2. Toprak Örneklerinin Kültür Sonuçları	29
4.3. PCR Yönteminin sonuçları	30
4.3.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin PCR Yönteminin Sonuçları	30
4.3.2. Toprak Örneklerinin PCR Yönteminin Sonuçları	31

4.4. Duyarlılık-Özgüllük Sonuçları	31
4.4.1. Yüzme havuzlarından ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin duyarlılık-özgüllük sonuçları	31
4.4.2. Toprak örneklerinin duyarlılık-özgüllük sonuçları	32
4.5. DNA Dizi Analiz Yönteminin sonuçları	33
4.5.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin DNA Dizi Analizi Yönteminin Sonuçları	33
4.5.2. Toprak Örneklerinin DNA Dizi Analizi Yönteminin Sonuçları	33
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
7. KAYNAKLAR	41
8. ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1. Acanthamoeba castellanii yaşam döngüsü	9
Şekil.2. Acanthamoeba trofozoit ve kist formlarının vücuda giriş yolları	10
Şekil.3. (a) GAE'li bir hastanın tomografi görüntüsü.(b) beynin bir kesitindeki Acanthamoeba trofozoitleri, lökositler, kırmızı kan hücreleri ve lenfositler	11
Şekil.4. Acanthamoeba Bulaş Yolları	15
Şekil.5. Su örneğinin alınması	17
Şekil.6. Toprak örneğinin alınması	18
Şekil.7. DNA Dizi Analizi Cihazında Elde Edilen Analiz Görüntüsü	25
Şekil.8. Acanthamoeba X40 objektifdeki görüntüsü	26
Şekil.9. Toprak örneklerindeki Acanthamoeba'ların mikroskopik inceleme sonucu (X40'lık objektif)	27
Şekil.10. Su örneklerinin kültür sonuçları (X40 objektif)	28
Şekil.11. Toprak örneklerinin kültür ortamındaki görüntüsü (X40 objektif)	29
Şekil 12. PCR yöntemi ile pozitif bulunan örneklerin agaroz jel görüntüsü	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Bilinen <i>Acanthamoeba</i> genotipleri ve bu genotiplerin insan hastalıkları ile bağlantısı, örneğin; keratit ve granülomatoz ensefalit	6
Çizelge 2. <i>Acanthamoeba</i> cinsine ait spesifik primer dizilimi	20
Çizelge 3. JDP1 ve JDP2 Primerleri için kullanılan PCR programı	21
Çizelge 4. Yüzme havuzları ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin mikroskopik inceleme sonuçları	26
Çizelge 5. Toprak Örneklerinin Mikroskopik İnceleme Sonuçları	27
Çizelge 6. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin Kültür Sonuçları	28
Çizelge 7. Toprak Örneklerinin Kültür Sonuçları	29
Çizelge 8. Yüzme havuzları ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin PCR yönteminin sonuçları	30
Çizelge 9. Toprak Örneklerinin PCR Yönteminin Sonuçları	30
Çizelge 10. Yüzme havuzlarından ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması	31
Çizelge 11. Yüzme havuzlarından ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin PCR VE kültür sonuçlarının karşılaştırılması	32
Çizelge 12. Toprak örneklerinin kültür ve mikroskopik inceleme sonuçlarının karşılaştırılması	32
Çizelge 13. Toprak örneklerinin kültür ve PCR yöntemi sonuçlarının Karşılaştırılması	33
Çizelge 14. Su ve toprak örneklerinden izole edilen <i>Acanthamoeba castellanii</i> türlerinin DNA dizi analiz sonuçları	34
Çizelge 15. Su ve toprak örneklerinden izole edilen <i>Acanthamoeba griffini</i> türlerinin DNA dizi analiz sonuçları	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AK: Acanthamoeba Keratiti
ELİSA: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
GAE: Granülomatoz Amibik Ensefalit
IFA: Immun Floresan Assay
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PAM: Primer Amibik Ensefalit

ÖZET

DOĞADA SERBEST YAŞAYAN ACANTHAMOEBA TÜRLERİNİN GENOTİPLENDİRİLMESİ

Acanthamoeba türleri doğada serbest olarak yaşayan, musluk suları, hazır sular, kontakt lens solüsyonları, toprak, hava, toz, yüzme havuzları ve kaplıcalar da bulunabilen parazitlerdir. *Acanthamoeba* türleri immün sistemi zayıf olan insanlarda ve hayvanlarda Granülomatoz Amebik Ensefalit (GAE) ve keratite sebep olmaktadır. Ayrıca akciğer, deri, kemik, böbrek üstü bezleri, kulak ve sinüslerde de enfeksiyon etkenidir.

Acanthamoeba türlerinin morfolojik kriterleri temel alınarak 24'den fazla türü tanımlanmıştır. Bugün moleküler yöntemlerle 18S rRNA gen bölgesi kullanılarak *Acanthamoeba*'nın en az 16 farklı genotipi (T1- T16) izole edilmiştir, bu genotiplerden T4 çevresel kaynaklarda baskındır.

Bu çalışmada Adana, Afyon, Kütahya, Niğde ve Mersin illerinden 50 su ve 50 toprak örneği toplandı. Mikroskop ve kültür incelemeleri sonrasında *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA gen bölgesi hedef alınarak bütün örnekler PCR çalışıldı. PCR yöntemi ile su örneklerinin 21'i (%42) pozitif, 29'u (%58) negatif bulunurken toprak örneklerinden 23'ü (%46) pozitif ve 27'si (%54) negatif bulundu. Su ve toprak örneklerinde kültür ve PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 bulundu. Adana, Afyon, Niğde ve Mersin illerindeki su örneklerinden %100 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4) izole edilirken Kütahya'dan %10 *Acanthamoeba griffini* (T3) ve %90 *Acanthamoeba castellanii* (T4) izole edildi. Bununla birlikte Afyon, Niğde ve Mersin'deki toprak örneklerinde %100 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), Adana'dan %67 *Acanthamoeba castellanii* (T4), %33 *Acanthamoeba griffini*, Kütahya'dan %80 *Acanthamoeba castellanii* (T4) ve %20 *Acanthamoeba griffini* izole edildi. Sonuç olarak *Acanthamoeba* türlerinden *Acanthamoeba castellanii*'nin Türkiye'de baskın olduğu görüldü.

ANAHTAR KELİMELER: *A. castellanii*, *A. griffini*, Su örnekleri, Toprak örnekleri
Türkiye

ABSTRACT
GENOTYPING OF FREE-LIVING ACANTHAMOEBA SPECIES IN
ENVIROMENT

Acanthamoeba species are free-living protozoan parasites that diffuse the enviroment and can be found in tap, mineral waters, contact lens solutions and soil, dust, air, swimming pools and thermal waters. *Acanthamoeba* species lead to Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE), a chronic nervous system disaeses of immunocompromised humans and animals and amoebic keratitis. Also species of *Acanthamoeba* cause infections of the lungs, skin, bones, adrenal gland, and sinuses.

Acanthamoeba species identified of more than 24 species have been found based on morphological criteria. Currently, moleculer techniques, sequencing of 18S rRNA genes, are being used to the species phylogeny of *Acanthamoeba*. Based on sequence differences 16 genotypes (T1-T16) and of these genotype T4 predominates among enviromental sources.

In this study 50 water samples and 50 soil samples were taken from Adana, Afyon, Kütahya, Niğde and Mersin cities of Turkey. After using microscopy and cultivation methods 18S rRNA gene as PCR target for *Acanthamoeba* species and all of samples were examined by PCR method. The sensitivity and specificity of both culture and PCR methods were 100% in water and soil samples. Twenty one (42%) of the 50 water samples were found positive, 29 (58%) water samples were found negative, 23 (46%) soil samples were found positive and 27 (54%) soil samples were found negative according to PCR method. In this investigation, 100% *Acanthamoeba castellanii* (T4) species were isolated from water samples in Adana, Afyon, Niğde and Mersin cities while 90% *Acanthamoeba castellanii* and 10% *Acanthamoeba griffini* (T3) were isolated from water samples in Kütahya city. However, 100 % *Acanthamoeba castellanii* (T4) were isolated from soil samples in Afyon, Niğde and Mersin cities. Also 67% *Acanthamoeba castellanii* (T4), 33% *Acanthamoeba griffini* isolated from soil samples in Adana, while 80% *Acanthamoeba castellanii* (T4) and 20% *Acanthamoeba griffini* (T3) were isolated from soil samples in Kütahya. As a result of the study, it has also been shown that *Acanthamoeba castellanii* dominant species among of *Acanthamoeba* species in Turkey.

KEYWORDS: *A.castellanii*, *A. griffini*, water samples, soil samples, Turkey

1. GİRİŞ

Çevrede, toprak ve sulara oldukça yaygın olarak bulunan protozoonlar arasında olan *Acanthamoeba* türleri, insan vücuduna yerleşerek çeşitli hastalıklar meydana getirebilirler. Bu tür amipler, granülomatoz amibik ensefalit (GAE), kutanöz acanthamoebiasis, *Acanthamoeba keratiti* (AK) ve AİDS'li hastalarda enfeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler^{1,2}.

Acanthamoeba cinsi amiplerin yaşam döngüsünde iki dönem ayırt edilir: birincisi, aktif olarak beslenen, büyüyen, çoğalan ve hareket eden trofozoit formu, ikincisi ise, dış çevre koşullarına daha dayanıklı olan kist formudur. *Acanthamoeba* trofozoitlerinin büyüklükleri 25-56 µm arasında değişiklik gösterir ve genellikle yavaş olan hareketlerini, parmak şeklinde olan lopopod ve akantopod (acanthopodium) denilen dikensi yalancı ayaklar ile sağlarlar. Büyüklükleri 13-20 µm arasında değişiklik gösteren kistler, tek çekirdekli ve yuvarlaktır, çeperleri endokist ve ektokist denen iki tabakadan meydana gelir. Genellikle dış tabaka hafifçe kıvrık, iç tabaka çok yüzlü bir görünümündedir^{2,3}.

Çoğu gelişmiş ülkelerden bildirilen olguların % 50'den fazlasında insanların, yapay göllerde yüzme esnasında enfekte oldukları ve olguların birçoğunun Amerika'nın Virginia, Florida ve Teksas gibi yörelerinde saptandığı bildirilmektedir. Bazı olgularda bulaşma kaplıca, yüzme havuzu, sulama kanalları ve doğal göllerde yüzme ile oluşurken, Kuzey Nijerya ve Güney Avustralya'dan bildirilen olgularda yüzme öyküsü olmadan bulaşmanın, yüzün yıkanması esnasında ve havada bulunan amip kistlerinin solunmasıyla gerçekleştiği bildirilmektedir⁴.

Acanthamoeba türlerini laboratuvar ortamında tanımlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kültür, mikroskopik inceleme ve çeşitli boyama teknikleri ile *Acanthamoeba*'lara laboratuvar ortamında tanı konulabilmektedir. Geçmiş yıllarda *Acanthamoeba*'lar morfolojik özelliklerine göre gruplandırılmış ancak bu gruplandırmalar *Acanthamoeba* türlerinin ayrımı için yeterli olmamaktadır^{5,6}. Son yıllarda *Acanthamoeba* türlerini tanımlamak için moleküler yöntemler kullanılmaktadır. *Acanthamoeba* türlerinin moleküler çeşitliliği hakkında yapılan çalışmalarda daha çok 18S rRNA geni hedef alınmış ve en az 16 genotipten oluştuğu (T1-

T16) bildirilmiştir. Bu genotiplerinden bazıları *A. lenticulata* (T5), *A. griffini* (T3), *A. castellanii* (T4), *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, ve *A. jacobsi* (T15) olarak bildirilmektedir^{7,8}.

Son yıllarda ülkemizde *Acanthamoeba* türlerini genotiplendirme çalışmaları yapılmış olmasına rağmen hala ülkemizdeki *Acanthamoeba* türlerinin moleküler çeşitliliği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada çeşitli illerdeki yüzme havuzlarından, kaplıcalardan ve topraklardan örnek almak, bu örneklerde *Acanthamoeba* varlığını PCR yöntemi ile tespit etmek ve DNA dizi analizi ile ülkemizdeki *Acanthamoeba* türlerini genotiplendirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Acanthamoeba türleri doğada toprak ve tatlı sularda yaygın olarak görülen amiplerdir. Bilindiği kadarı ile *Acanthamoeba polyphaga*, tanımlanan ilk türdür. Bu tür 1913 yılında Puschkarew tarafından *Amoeba polyphagus* olarak tanımlanmış, Page 1967'de bunu *Amoeba polyphaga* olarak düzeltilmiştir. Fakat insan sağlığı ile ilişkisinin ilk işaretleri 1930'lu yıllarda ortaya çıkmaya başlamıştır. Çünkü *Acanthamoeba* türü ilk bu yıllarda Amerika'da hücre kültürlerinde saptanmış ama kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir. Kültürde görülmesi devam edince farelere burun yolundan verilerek patojenitesi araştırılmış ve patojen oldukları saptandıktan sonra da araştırmalar devam etmiştir. Bu türe ayrıntılı çalışmaları yapan araştırmacıya atfen *Acanthamoeba culbertsoni* ismi verilmiştir. Benzer bir durum İngiltere'de de görülmüştür. Hücre kültürlerinde üreyen *Acanthamoeba* türü başlangıçta yeni bir virüs olarak ele alınmış ve hastanın adı verilerek Ryan virüs denilmiştir. Fakat üzerinde yoğun çalışmalar ve pek çok yayın yapılmış olan bu etkenin virüs değil bir *Acanthamoeba* türü olduğu daha sonra anlaşılmıştır⁹.

2.1 TARİHÇE

1930 öncesi

Cole'e göre amip, ilk kez 1755 yılında Roesel von Rosenhof tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacı, "The small Proteus" diye tanımladığı amibin hareketini, protoplazmasının kısımlarını tanımlamış ama çekirdek ve kontraktıl vaküole değinmemiştir. Leidy Kuzey Amerika'nın tatlı sularının rizopodları hakkında bir monograf yayınlamış; Penard ise çeşitli tatlı su amiplerini tanımlamıştır^{3,10}.

1930–1990 yılları arası

Bu dönemde serbest yaşan amipleri başta biyolojileri olmak üzere çeşitli yönlerden ele alınıp incelenmişlerdir. Dönemin başlarında bu amiplerin, bakteriyolojik, mikolojik kültürlerde, sonraları da doku kültürlerinde üredikleri saptanmış fakat bu durum genelde kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir. Örneğin, *Castellanii*'nin, pembe maya *Cryptococcus panaroseus* kültürlerinde görüp, soyuttuğu amibi Douglas incelemiş ve onu *Hartmannell castellanii* olarak isimlendirmiştir. Aynı amip üzerinde çalışan Volkonsky ise bu

amibin *Hartmannella* cinsinden farklı olduğunu vurgulayarak onun için *Acanthamoeba* cins ismini önermiştir. Bazı araştırmacılar da başlangıçta kültürlerdeki bu amipleri yeni bir virus (Ryan virus) olarak ele almışlar ve üzerinde yoğun çalışmalar ve yayınlar yapmışlardır^{9,10}.

1990 sonrası dönem

Acanthamoeba türlerine bağlı olarak insanlarda gelişen keratit olguları ile ilgili yayınlarda bir artma söz konusudur. Bunda, özellikle yumuşak kontak lenslerin kullanımındaki artış kadar, insanların gittikçe havuz ve durgun tatlı sularda yüzme alışkanlıklarının artması da etkili olmuştur. Yine bu süreçte, özgür yaşan amiplerin beyin ve göz dışında, deri, kemik, akciğerler, ürogenital sistem ve böbrek üstü bezlerinde de yerleşebildikleri saptanmıştır. Ayrıca, bazı rinosinüzit ve otit olgularından da (özellikle AIDS'lilerde) sorumlu oldukları anlaşılmıştır. Son on-on üç yıldaki diğer çalışmalar ise bu amiplerin oluşturdukları parazitolojinin tedavisi, tanısı, etkenin(lerin) tanınması (cins ve türlerin genetik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi) yönünde yoğunlaşmıştır^{10,11}.

2.2. TAKSONOMİ

Klasik taksonomik sınıflandırmada Protozoalar 4 (dört) gruba ayrılır. Bunlar; Sarcodina (amipler), Mastigophora (flagellatlar), Sporozoa (mast parazitik protozoa) ve Infusoria (ciliatlar). Bu taksonomik sınıflandırma International Society Protozoologistler tarafından tamamen geride bırakıldı. Bu sınıflandırmanın yerine modern morfolojik uygulamalar, biyokimyasal ve moleküler filogenetik temel alındı¹². Eski ve bunun dışındaki geleneksel olan sınıflandırma 'Alem', 'Şube', 'Sınıf', 'Alt Sınıf', 'Süper Takım', 'Takım', yenisiyle değiştirildi. Bu yeni sınıflandırmaya göre, Eukaryotlar; Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata ve Excavata olmak üzere 6 (altı) süper gruba ayrıldı¹³.

Domain: Eukaryot

Alem: Amoebozoa

Aile: Acanthamoebidae

Cins: *Acanthamoeba*^{13,14}.

2.3. ACANTHAMOEBA TÜRLERİ

Puschkarew 1913 yılında tozdan izole ettiği amip'e *Amoeba polyphagus* ismini verdi. Daha sonra verilen bu isim 1931 yılında Volkonsky tarafından *Acanthamoeba polyphaga* olarak değiştirildi. 1930 yılında ise Castellani tarafından parazit, kültür plaklarındaki kontaminasyon sonucu izole edildi ve daha sonra bu amip'e *Acanthamoeba castellanii* ismi verildi. Morfolojik kriterler baz alınarak tanımlanmış 24'den fazla *Acanthamoeba* türü bulunmaktadır. Bu türler morfoloji ve kistlerinin boyutlarına göre 3 gruba ayrılır;

Grup I : Bu grupta *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* ve *A. tubiashi* olmak üzere 4 tür bulunmaktadır.

- 1- Kol sayısı 8'den daha az, ortalama kist çapları $\geq 18 \mu\text{m}$ – *A. astronyxis*.
- 2- Kol sayısı 6-10 arasında değişir. Ortalama kist çapları $\geq 25.6 \mu\text{m}$ – *A. comandoni*.
- 3- Kol sayısı 12-14 arasında değişir. Ortalama kist çapları $\geq 25 \mu\text{m}$ – *A. echinulata*.
- 4- Ortalama kist çapları $\geq 22.6 \mu\text{m}$ – *A. tubiashi*^{13,15}.

Grup II : Bu grupta *A. maurtaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhysodes*, *A. paradivionensis* ve *A. hatchetti* olmak üzere 11 tür bulunur. En yaygın gruptur ve çoğunlukla izole edilen *Acanthamoeba* türleri bu grupta bulunur. Kist çapları $18 \mu\text{m}$ 'den daha azdır¹⁵.

Grup III : Bu grup *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* ve *A. pustulosa* olmak üzere 5 tür içerir. Bu grubun ektokistleri zayıftır ve endokistlerinin kollarının 3-5 arasında değişmesi ve hafif köşeli olması kist çaplarının $18 \mu\text{m}$ den daha küçük olduğu anlamına gelir. Grup II den farkı kistlerinin daha ince yapıda olmasıdır^{13,15}.

Acanthamoeba'nın yeni bir türü olan *A. healyi* Maura ve arkadaşları tarafından, morfolojik, antijenik ve izoenzim özellikleri göz önünde bulundurularak tanımlanmıştır. Maura yüksek çözünürlüklü jel elektroforezini kullanarak çeşitli *Acanthamoeba* türlerinin kompleks polipeptid yapılarını ayırtmıştır. Bu yöntemi baz alarak; ayrıca heksokinaz, esteraz ve asit fosfataz olan üç izoenzimi kullanarak grup I, II, III' e ait türlerin kolayca ayırt edildiğini rapor etmiştir. Dahası tavşan antijeni ile *A. castellanii* proteinleri reaksiyona girerek büyük ölçüde karmaşık olan hücre proteinleri ayrıştırılmış ve çözümlenmiştir. Böylelikle Western Blot yöntemi geliştirilmiştir^{13,15,16}.

Fizyolojik karakter farklılıkları olduğu kadar, protein ve antijen yapıları da *Acanthamoeba* türlerinin patojen ve non-patojen ayrımında kullanılmıştır^{16,17}.

2.4. ACANTHAMOEBİ GENOTİPLENDİRİLMESİ

Acanthamoeba türleri sadece morfolojik özellikleri dikkate alınarak gruplandırılmıştır. Bunun yeterli olmadığını son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar göstermiştir. Şu anda *Acanthamoeba*'nın filogenetik ve türlerinin yapısını anlamak için özellikle 18S r RNA dizisi kullanılmaktadır¹³.

18S rRNA geni hedef alınarak yapılan dizi analizlerinde *Acanthamoeba* türleri en az 16 farklı genotipe (T1-T16) ayrılmıştır¹⁸.

Her bir genotipte %5 veya daha fazla dizi ayrımının bulunması genotipler arasındaki farklılığı göstermektedir. Örneğin; T2, T2a ve T2b omak üzere iki alt grup daha 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 olduğu görülmüştür. Yine benzer şekilde T4 genotipinin kutanöz enfeksiyonun ve GAE gibi non-keratit enfeksiyonlarıyla da bağlantılı olduğu görülmüştür^{18,19}.

Çizelge 1: Bilinen *Acanthamoeba* genotipleri ve bu genotiplerin insan hastalıkları ile bağlantısı, örneğin; keratit ve granülo-matoz ensefalit.

Acanthamoeba genotipleri	İnsan hastalıkları ile bağlantısı
T1	Ensefalit
T2a	Keratit
T2b	NA
T3	Keratit
T4*	Ensefalit, Keratit
T5	NA
T6	Keratit
T7	NA
T8	NA

T9	NA
T10	Ensefalit
T11	Keratit
T12	Ensefalit
T13	NA
T14	NA
T15	NA

*Bu genotip çoğunlukla her iki hastalıklada bağlantılıdır.

NA, henüz herhangi bir hastalıkla bağlantısı bulunamamıştır.

2.5. MORFOLOJİSİ VE İNCE YAPISI

Acanthamoeba'nın yaşam süresi boyunca tek tip trofozoit ve kist şekli olmak üzere iki evrim dönemi ayırt edilmektedir; bunlar beslenen ve çoğalan trofozoit dönemi ve dayanıklı olan kist dönemidir. Trofozoitlerin çapları ortamala 12-35µm arasında bulunmaktadır. Fakat farklı tür veya genotiplere bağlı olarak önemli derecede çeşitlilik göstermektedir. Trofozoitlerin yüzeylerinde acanthopodia olarak bilinen dikensi yapılar görülür. Acanthopodia amibin yüzeye tutunmasını, yapışmasını, hücresel hareketini, beslenmesini ve avını yakalamasını sağlamaktadır. *Acanthamoeba* geniş ve kapsamlı bir endoplazmik retikulum ile stoplazmik yüzeyde protein sentezinden sorumlu bir ribozoma sahiptir. Bu proteinlerin taşınması ve çoğu karbonhidrat reaksiyonları golgi aygıtının içerisinde meydana gelmektedir¹³.

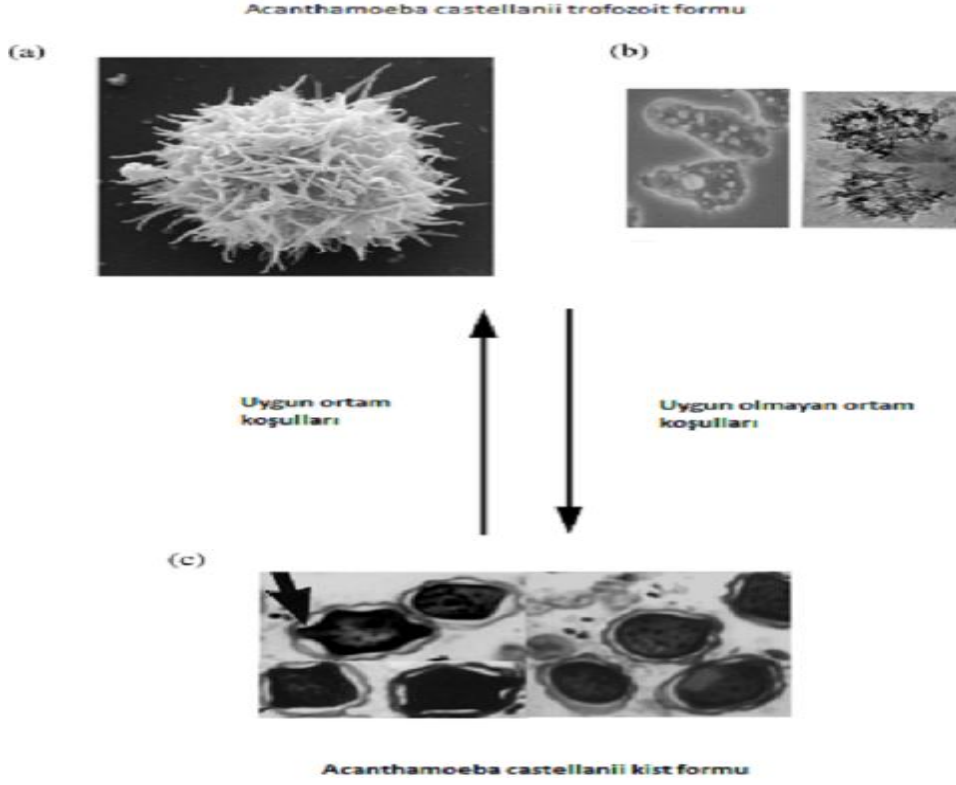
2.5.1. Trofozoit Şekli

Trofozoitleri beslenme, hareket etme, üreme ve diğer hücresel fonksiyonlar için gerekli enerjiyi sentezleyen büyük bir mitokondriye sahiptir. Stoplazmalarında sayısız fibril, glikojen ve lipit damlaları vardır. Aktin (toplam proteinin %20'sini oluşturur) ve miyozin birlikte 20 den fazla sitoskeletonun yapısında bulunurlar. Bu proteinler hücre bölünmesi, hücre içi taşıma ve hareketlerle bağlantılı olan hücresel fonksiyon cevaplarından sorumludurlar. Trofozoitler toplam DNA'nın %80-85'ini oluşturan nükleer DNA ile mitokondrial DNA içerirler. *Acanthamoeba* bakteri, maya, alg veya küçük partiküllerle aktif olarak beslenmektedir ve birçok yiyecek hücrenin stoplazmasında bulunan vakuollerde

görülebilmektedir. Hücre bölünmesi (çoğalması) eşeysiz ve ikiye bölünme şeklinde meydana gelmektedir. Hücrenin katlanarak büyümesi için hücre bölünürken; büyük ölçüde G2 fazı sırasında (%90 kadarı), önemsenmeyecek kadar azı G1 fazında, %2-3 kadar M fazında (mitoz) ve %2-3 kadarı da S fazında sentez edilmektedir. *Acanthamoeba* uygun sıcaklık (örn:30 °C), bol miktarda yeterli besin desteği, nötral PH ve 50-80 mOsmol arasında değişen osmolaritesi ile trofozoit dönemini sürdürebilir. Ancak zor ve olumsuz koşullarda; yiyecek eksikliği, ekstrem sıcaklık, pH, osmolaritesinin düşmesi veya yükselmesi gibi durumlarda kist şekline dönüşmektedir^{9,13}.

2.5.2. Kist Şekli

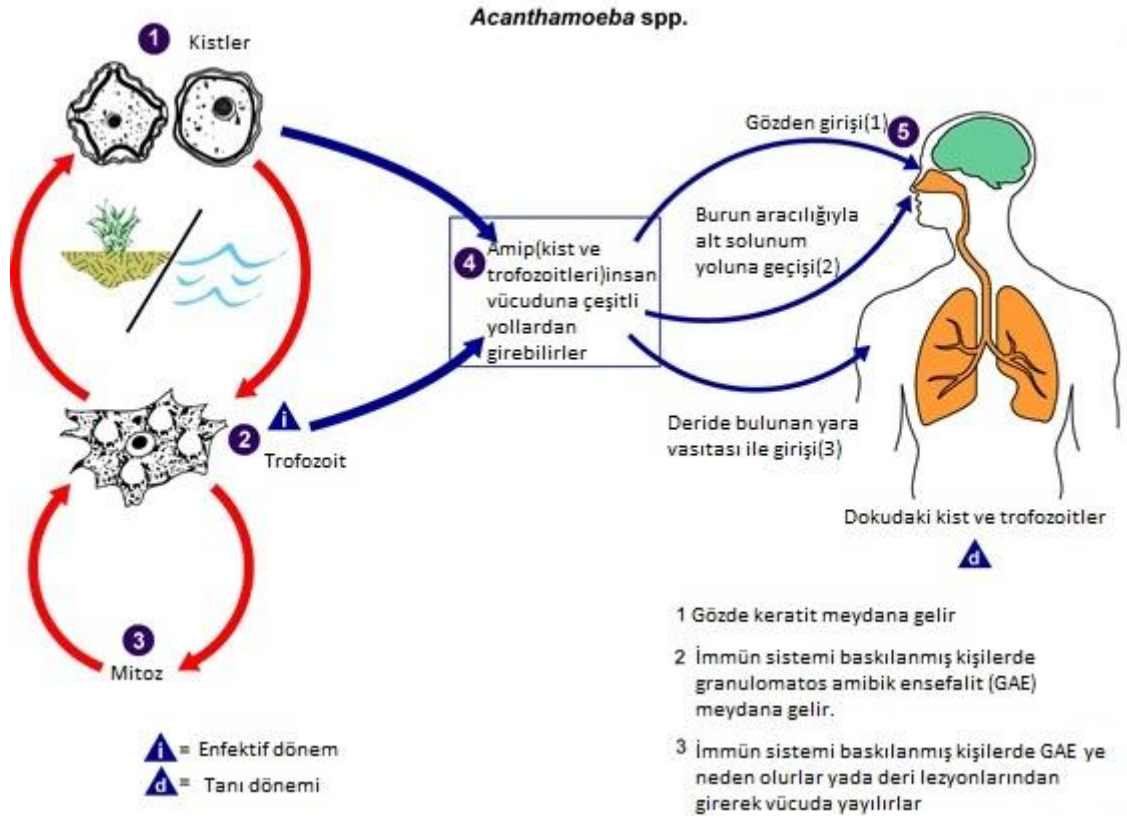
Genellikle tek çekirdekli ve çift duvarlıdır. Tabakalardan en dıştaki ektokist düz veya buruşuk görünümde iken, içteki endokist yıldız, dörtgen, beşgen veya altıgen görünümündedir. Kist çapları ortalama 5-20µm arasındadır. Ancak farklı tür ve genotiplere bağlı olarak değişiklik gösterir. Kistler havadaki tozla *Acanthamoeba*'nın çevreye yayılmasını sağlamaktadırlar.



Şekil 1. *Acanthamoeba castellanii* yaşam döngüsü. *Acanthamoeba castellanii* trofozoitleri olarak bilinen enfektif formu, (a) elektron mikroskobu altındaki görüntüsü, (b) ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. (c) Uygun olmayan ortam koşullarındaki trofozitlerin kist formuna dönüşmesi¹³.

2.6. YAŞAM DÖNGÜSÜ

Amip (kist ve trofozoitleri) insan vücuduna çeşitli yollardan girebilmektedirler. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, HIV/AIDS'li hastalarda daha kolay şekilde vücuda yayılırlar. Amip kist veya trofozoitlerinin gözden girmesiyle keratit meydana gelmektedir. Kist ve trofozoitleri burun aracılığıyla alt solunum yollarına geçerek burada endovasküler alanı istila edip kan dolaşımı ile yayılmaktadır. Bir diğer giriş yolu ise deride bulunan yaralardır. Bu yaralar amibin direk olarak kan dolaşımına girmesini sağlamaktadır ve böylece alt solunum yollarına geçip MSS'ini istila ederek GAE' ye neden olurlar^{13,20}.



Şekil 2. *Acanthamoeba* trofozoit ve kist formlarının vücuda giriş yolları²⁰.

2.7. EPİDEMİYOLOJİ

Acanthamoeba türlerinin neden olduğu GAE (Granülomatoz Amibik Ensefalit) PAM'ın (Primer Amibik Ensefalit) aksine yılın hemen her ayında görülebilir. İklim değişikliği ile pek ilgisi yoktur. İnsan dışında diğer canlılarda görülmüştür. Bunlar arasında goril, maymun, köpek, sığır ve at sayılabilir. GAE olgularından bugüne kadar en sık izole edilen türler *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. ryhysoides*, *A. polyphaga* ve *A. healy*'dir^{9,13}.

Acanthamoeba türleri toprak, şişe suyu, fizik tedavi havuzları, diyaliz makinaları, hava tozu, bakteriyel ve mantar kültürleri ile memeli hücre kültürleri, kontak lens meteryali, burun ve boğaz örnekleri ile sağlıklı kişilerden alınan örneklerden izole edilip üretilmiştir¹³.

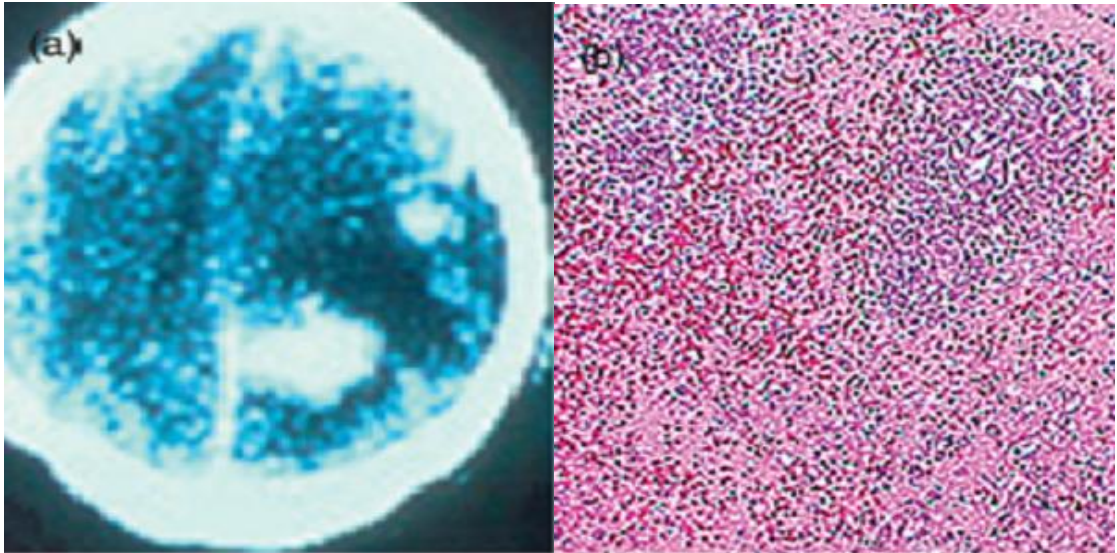
Özellikle son yıllarda kontak lens kullanımının artmasıyla birlikte keratit olgularında artış gözlenmiştir. Kontak lens kullanıcılarındaki korneal enfeksiyonun büyük çoğunluğuna *Acanthamoeba* neden olmaktadır. Yurdumuzda bu amipler ile ilgili ilk iki yayın derleme şeklinde olup, deneysel çalışmada Erzurumda şubat ayında kar altından alınan toprak

örneğinden *Acanthamoeba* türü izole edilmiş ve üretilen bu türün fareler için patojen olup olmadığı yapılan deneylerle belirlenmiştir^{4,9,13}.

2.8. GRANULOMOTOZ AMİBİK ENSEFALİT (GAE)

GAE nadiren bulaşır. Fakat hemen hemen her zaman istisnalar hariç tehlikeli ve ölümcüldür. Mekanizması patojenitesi ile bağlantılı olarak karışıktır. *Acanthamoeba* türlerinden birkaçının (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* ve *A. divionensis*) GAE'ye sebep olduğu bilinmektedir. Özellikle HIV/AIDS'li hastalarda veya kronik hastalığı olan kişilerde, diyabet hastalarında, organ transplantasyon yapılarında saptanmıştır. Kan- beyin bariyerlerinin invazyonu (istilas), bağ doku ve nöral zarar beyin fonsiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Amip alt solunum yollarından girerek, endovasküler alanı istila edip buradan kan dolaşımı ile yayılmaktadır¹³.

Deri lezyonları amibin direk kan dolaşımına girmesini sağlamakta ve böylece alt solunum yollarına geçmektedir. Amibin Merkezi Sinir Sistemine (MSS) geçişi ile büyük olasılıkla kan-beyin bariyerlerinde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Kutanöz ve solunum enfeksiyonları birkaç ay sürebilir fakat MSS ile ilgiliyse birkaç gün veya hafta içerisinde ölümlerle sonuçlanabilir. MSS girişin diğer bir yolu ise olfaktorik nörepitelyum (koku alma sinirleri)'dur²¹.



Şekil 3. (a) GAE'li bir hastanın tomografi görüntüsü.(b) beynin bir kesitindeki *Acanthamoeba* trofozoitleri, lökositler, kırmızı kan hücreleri ve lenfositler¹⁵.

2.7.1. GAE'nin Patojenitesi ve Klinik Belirtileri

GAE'nin klinik semptomları viral, bakteriyel veya tüberküloza benzer; baş ağrısı, ateş, davranış bozuklukları, hemiparazi (yarım felç), uyuşukluk, boyun tutulması, afazi (konuşmada zorluk), dengesizlik, kusma, bulantı, intrakranial basınçta artış, nöbet ve ölümdür. Tüm bunlar şiddetli beyin zarı irritasyonu ve ensefalitle hemorajik nekroz lezyonlarından dolayı meydana gelmektedir^{15,22}.

Solunum yolu enfeksiyonları, deri ülserleri veya beyin absesi olan hastalarda, serbest yaşayan amiplerden şüphelenilmelidir. Otopsi incelemelerinde sıklıkla şiddetli ödem ve hemorajik nekroz görülmektedir. Bu nekrotik fazın aktif olarak beslenen trofozoit döneminde mi yoksa sitokin salımı gibi enflamatuvar süreçleri olup olmadığı bilinmemektedir.^{13,22}

GAE'den en fazla basal ganglia, orta beyin, beyin sapı ve beyin yarım küresi ile MSS etkilenmektedir. Ciddi bir şekilde bağışıklık sistemi zarar görmüş hastalarda granülomatoz cevap ya çok azdır ya da hiç yoktur. MSS dokusu etkilendiğinden dolayı genellikle beyin yarım küresinde ağrı çok fazla olmaktadır. Sıklıkla parietal, temporal, oksipital bölgelerde geniş ölçüde hemorajik nekrozla ödem oluşmaktadır. MSS'den başka subkutenöz doku, deri, böbrekler, karaciğer, dalak, lenf nodülleri, prostat, pankreas, kemik iliği ve böbrek üstü bezleri etkilenmektedir²³.

2.8.2. GAE'nin Tanısı

Santrifürij sonrasında veya beyin biyopsisi içerisinde bulunan amibi direk mikroskopide görerek tanısı konabilmektedir, ama bunun için morfolojik karakterlerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Giemsa-Wright, akridin orange veya calcofluor White boyalarıyla boyamak amip tanısını kolaylaştırabilir. GAE enfeksiyonlarının tanısında antikor testlerinin yararlı olduğu gösterilmiştir. Beyin biyopsisinin yaygın bir işlem olmadığı, spesifik poliklonal antikorların IFA (Immün Floresan Assay) ve ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) yöntemlerinin de kullanıldıkları belirtilmiştir. Tanıda değerli olduğu bildirilen spesifik monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. Bunların yanı sıra tanıda PCR ve kültür yöntemlerinin de önemli olduğu görülmüştür¹³.

Tomografi ile beynin taranmasıyla tek veya çok alanın istilasını, düşük yoğunluktaki anormal mimikler gözlenmektedir^{13,24}.

2.8.3. GAE'nin Tedavisi

GAE için etkili bir tedavi yöntemi olmadığı gibi vakaların büyük bir çoğunluğunun tanısı öldükten sonra alınan biyopsi örneği ile konulmaktadır. Bu durum birçok anti-amip ajanlarının *Acanthamoeba*'ya karşı düşük duyarlılığından kaynaklanmaktadır. Ama daha da önemlisi bu bileşenlerin kan beyin bariyerlerini geçerek MSS'ne ulaşamamasıdır¹³.

Şu anda özgür yaşayan amiplerden dolayı MSS meydana gelen enfeksiyonlara karşı ketokonazol, flukonazol, sulfadiazine, pentamidine, isethionate, amphotericin B, azitromycin, itrakonazol veya rifampin etkili olabilmekte fakat çok şiddetli yan etkileri bulunmaktadır²⁵.

Yapılan son çalışmalarda hexadecylphosphocholine gibi alkylphosphocholine bileşenlerinin kan-beyin bariyerlerini geçebildikleri ve böylelikle GAE'nin tedavisinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir²⁵.

2.9. ACANTHAMOEBİ KERATİTİ

Acanthamoeba türleri ile *Naegleria*, *Hartmannella*, *Wahlkamfidae* türlerinin bu hastalığa neden olduğu ve korneanın amiplerle direk teması sonucunda hastalığın oluştuğu bildirilmektedir. Keratit olgularından sıklıkla izole edilen *Acanthamoeba* türleri *A. polyphaga* ve *A. castellanii*'dir. Bunların dışında *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhysoides*, *A. quina*, *A. lugdunensis* ve *A. griffini*'de bu tip keratit olgularından izole edilmiştir^{4,9,15}.

İlk kez 1973 yılında Amerika'da Teksaslı bir çiftçide saptanan *Acanthamoeba* keratiti ağrılı görmeyi tehdit eden bir kornea hastalığıdır. Erken tanı konulup, tedavi uygulanmaz ise kornea ülserasyonuna, görme berraklığının düşmesine, gözün kaybına ve gözün çıkarılmasına yol açabilmektedir²⁶.

2.9.1. *Acanthamoeba* Keratitinin Bulaş Yolları ve Risk Faktörleri

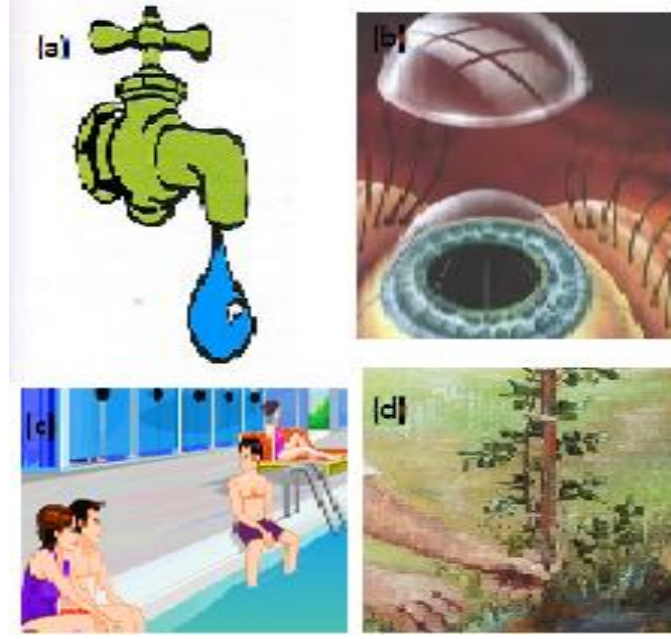
Hastalık amibin kornea ile direk teması sonucu bulaşmaktadır. Bu temas esnasında amibin yerleşmesinde, özellikle korneadaki küçük bir sarsıntı ve sonrasında kontamine su ile yıkama veya kontak lens kullanımı rol oynamaktadır^{13,26}.

Acanthamoeba keratiti için en büyük risk faktörü kontak lens kullanıcılarının zayıf hijyen koşullarıdır. *Acanthamoeba* keratit olgularının % 85 den daha fazlası kontak lens

kullanıcılarında görülmektedir. Özellikle genç kullanıcılarda zayıf hijyen koşulları, kirli el, yetersiz kontak lens temizliği, kişinin kendi tarafından hazırlanan tuzlu su solüsyonları *Acanthamoeba*'nın üremesine davetiye çıkarmaktadır²⁷.

Yapılan çalışmalarda kontak lens kullanıcılarında, hiç kullanılmamış kontak lens ile kullanılmış kontak lens karşılaştırıldığında *Acanthamoeba*'nın yüksek derece de bağlanma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Kontak lens kullanıcıları üzerinde yapılan çalışmada mannoz, glikoz, galaktoz, fruktoz, N-asetil-D-galaktozamin, N-asetil-nörominik asit (sialik asit) içeren sakaridlerin ve proteinler, glikoprotein, yağlar, musin, polisakkaridler, kalsiyum, demir, silis, magnezyum, sodyum, laktoferin, lizozim ve immünoglobülin moleküllerinin varlığında kontak lens yüzeyini sadece 30 dakika sonra çürüttüğü görülmüştür. Bunlar ya *Acanthamoeba* trofozitleri için reseptörmüş gibi davranmasını ya da *Acanthamoeba*'nın kontak lens yüzeyine bağlanma yeteneğinin artmasını sağlamaktadırlar. Son yapılan çalışmalarda *Acanthamoeba* kistlerinin korneal epitel hücrelerine bağlanmadığı bu durumda kistlerin non-enfektif bir safhada olduğu görülmüştür^{9,13,26}.

Bu faktörlere ek olarak yüzme havuzlarından özellikle de kontak lens kullanırken, kontamine olmuş su ile yüzün yıkanması, toz ve toprak *Acanthamoeba* için önemli risk faktörlerindedir. Özellikle klor tabanlı dezenfektanlarla lensin temizlenmesi keratite sebep olmaktadır, çünkü *Acanthamoeba* klora yüksek ölçüde dirençlidir. Ama ikinci bir adım olarak konsantrasyonu %3 olan hidrojen peroksitin *Acanthamoeba* trofozoit ve kistlerine karşı yüksek derecede etkili olduğu görülmüştür^{26,27}.



Şekil 4: *Acanthamoeba* bulaş yolları. (internette değiştirilerek alınmıştır)

2.9.2. Yerleştiği Organlar ve Patojenitesi

Acanthamoeba türlerinin kornea'ya yerleşmeleri ile oluşan enfeksiyonun erken dönemine epitelde veya epitelin hemen altında, ön stromada psödodentritik şekiller olabilmektedir. İlerlemiş olgularda belirgin stromal infiltrasyon ve nekroz bulunmaktadır. İnfiltrasyon beyazımsı, yangısal ve sıklıkla korneal ülserin etrafında halka ya da bir yüzük şeklinde görülmektedir. Hücrelerin çoğunluğu polimorf çekirdekli lökositler olup bazı lenfositlerle birlikte, makrofajlarda bulunmaktadır. 'Granülomatöz yangı' olarak tanımlanan bu durumda, nötrofillerin yoğunlukta olduğu, lenfositlerin sayısının ise yüksek olmadığı bildirilmiştir. Zaten içinde korneal ülserasyon perfore olabilmektedir^{4,9}.

2.9.3. Lokal ve Klinik Belirtiler

Acanthamoeba'ya bağlı keratit, korneanın etkene karşı gösterdiği subakut veya süregen yangısal bir tepki sonucu gelişir. Çoğunlukla kontak lens kullananlarda kullanmayanlara oranla daha sık görülür. Hasta yoğun oküler ağrı ve konjonktivanın kanlanmasından yakınır. Parazitozun erken döneminde trofozitlerin ön korneayı harap ettikleri; sonraları trofozoitlerin kornea katmanları arasına dağıldıkları belirlenmiştir. İleri

dönemde ise ülserler ve perforasyon gelişmektedir. Son aşamada ise tek veya her iki göz birden kaybedilebilmektedir^{9,13,15}.

Parazitözün ileri döneminde göz kapağında düşme konjiktival hiperemi, fotofobi, gözyaşı akıtması, göz ağrısı, bulanık görme, korneada opasite gibi bulgular saptanır. Parazitler nadiren korneadan retinaya geçebilir bunun sonucunda koriodoretinit gelişir^{9,13,15}.

2.9.4. Hastalığın Tanısı

Acanthamoeba keratitinin tanısında esas, kornea kazıntı meteryalinin direkt incelenmesinde amibi saptamak, bu meteryalden etkeni üretmek ya da histopatolojik kesitlerde paraziti görmektir. *Acanthamoeba* keratiti tanısı konulan olgulardan en sık izole edilen türler *A. castellanii* ve *A. polyphaga*'dır. Bunlardan *A. castellanii* aynı zamanda GAE olgularından da sorumlu olan tür olarak bilinmektedir. *Acanthamoeba* genotipinin tanımlanmasında moleküler tekniklerin kullanılması gittikçe artmaktadır, bunun yanı sıra *Acanthamoeba*'nın tanımlanmasında kornea örneklerinden de yararlanılmaktadır²⁸.

2.9.5. Hastalığın Tedavisi

Acanthamoeba keratiti için hala geçerli olan tedavi, CHX, PHMB, neomycin ve propomidine isethionate içeren ilaçların karışımıyla topikal olarak uygulanmaktadır. CHX ve PHMB'nin her ikisi de membran aktivitesi için katyonik biyositlerdir. Bu ilaçların *Acanthamoeba* trofozoitlerinin öldürülmesinde en etkili yöntem olduğu görülmüştür²⁹.

Alkali pH' da, *Acanthamoeba* yüzey proteinleri negatif yükle yüklenerek katyonik biyositlerle çok hızlı bir şekilde etkileşime girmektedirler. Bu etkileşimle hücre membranının yapısı ve geçirgenliğinin bozulmasına, iyon, su ve diğer stoplazmik bileşenlerin kaybına ve sonuç olarakta hücresel zarara yol açtığı görülmüştür. Diamidine ailesine ait olan Propamidine isethionate gibi ilaçlar DNA sentezinde etkili olan inhibitörlerdendir²⁹.

Acanthamoeba kistleri ektokist ve endokist içerdiklerinden dolayı (%33 protein, %4-6 lipid, %35 karbonhidrat ve çoğunlukla selüloz) kemoteropatik ajanlara karşı fiziksel bariyer oluşturmaktadırlar³⁰.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Bu çalışmada Mart 2011-Mart 2013 tarihleri arasında, Adana, Afyon, Kütahya, Niğde, Mersin illerinde bulunan yüzme havuzlarından ve kaplıcalardan toplam 50 su örneği, aynı illerde bulunan park ve bahçelerden de toplam 50 toprak örneği alındı.

3.1.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Örnek Alımı

Örnekler yüzme havuzlarının ve kaplıca alanlarının üç farklı bölgesinden (yürümek için kullanılan ıslak alan, atlama alanı, yüzme alanı) bisturi, pasteur pipet ve steril mineral şişeler kullanılarak toplandı.

Örnekler alınmadan önce şişeler örnek alınacak su ile doldurulup iyice çalkalandı. Bu işlem 3-4 kez tekrar edilerek şişenin temizlenmesi sağlandı. Şişe ağzı açık olarak ve baş aşağı olacak şekilde suya daldırılarak alındı.

Yüzme havuzları ve kaplıca alanlarında insanların yürümek ve dinlenmek için kullandıkları ıslak alandan bisturi ve pasteur pipeti kullanılarak kazıntı ve su örneği alındı. Yüzme havuzları ve kaplıca alanlarının 1 metre içerisinde, insanların suya girmek için kullandıkları alandan yaklaşık 500 ml su örnekleri alındı. Diğer su örneği ise yüzücüler tarafından daha az kullanılan havuzların orta kısmından alınarak 500 ml'lik şişelere konuldu.(Şekil 5)



Şekil.5. Su örneğinin alınması.

Her örneğin üzerine örneğin hangi alandan ve şehirden alındığı, tarihi ve sıcaklığı yazıldı. Toplanan örneklerden native preparatlar hazırlanıp 40'lık objektifte incelendi. Kist veya trofozoit görülen preparatlar pozitif (+), kist veya trofozoit görülmeyen preparatlar negatif (-) olarak değerlendirildi. Daha sonra bu örnekler adi besiyerine (NNA) ekildi ve üreme olup olmadığı gözlemlendi. Üreme olan örnekler serum fizyolojik ile yıkandı ve steril ependorf tüpleri içerisinde PCR çalışılmak üzere 0°C'de saklandı.

3.1.2. Toprak Örneği Alımı

Toprak örnekleri, homojen olan 20 dekarlık toprak alanlarından alındı. Toprak örneği alınacak arazide rastgele zikzaklar çizilerek 5-10 tane farklı bölge işaretlendi ve burgu veya bel yardımıyla 0-30 cm ve 0-60 cm derinlikten toprak örnekleri alındı. (Şekil 6)



Şekil 6: Toprak örneğinin alınması.

Toprak örnekleri, içerisinde su bulunan (distile su veya page'in suyu) şişelerden süzildükten sonra, NNA besiyerine ekildi. Besiyerleri 27°C' de 7 gün inkübasyona bırakıldı. Üreme olan örnekler serum fizyolojik su ile yıkanarak ependorf tüpleri içerisinde PCR çalışılmak üzere 0°C'de saklandı.

3.2. ÖRNEKLER İÇİN BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI VE KÜLTÜR ORTAMI

10 gr NNA (American Bacteriological Agar) 500 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra karışım 121°C'de 20 dk otoklavlandı. Karışım, daha önceden 100°C'de 2 saat ısıyla sterilizasyona bırakılan petri kaplarına dökülerek katılaştırıldı. Petri kapları kullanılabildiği kadar 4°C'de saklandı. Örnekler ekilmeden önce besiyerlerinin yüzeyine *E. coli* sürüldü. Ve pastur pipetiyle alınan örnekler NNA besiyerine ekilerek 27°C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Üreme olan örnekler serum fizyolojik ile yıkanarak ependorf tüpleri içerisine aktarıldı.

3.3. SU VE TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU

0°C'de saklanan su ve toprak örnekleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra 10000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst kısımdaki süpernatant kısım atıldı, dipte kalan örneklerdeki *Acanthamoeba*'ların DNA'larını izole etmek için Agencourt DNA izolasyon kiti (BeckmanCoulter, Massachusetts, USA) kullanıldı. DNA izolasyon kitinin kullanım şekli aşağıda belirtilmektedir.

1. Ependorf tüplerinin her biri 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım atıldı. Dipte kalan kısım alındı.
2. Ependorf içerisinde bulunan 200 µl örneğin üzerine 200µl lizis buffer ve 15 µl proteinaz K eklenip vorteksenerek 20-25 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. Tüpler inkübasyondan alındıktan sonra içerisine 300 µl magnetik boncuk eklenerek DNA'nın bu boncuklara yapışması sağlandı. Magnetik rezonans'a konularak yapışmayan sıvı kısım atıldı.
4. Boncuklara yapışan DNA üzerine wash-1 solüsyonu eklenerek hücre zarı, protein artıkları yıkandı. Magnetik rezonans'a konularak yapışmayan sıvı kısım atıldı.
5. Aynı işlem iki kez tekrar edildi.
6. Geriye kalan kısım üzerine wash-2 solüsyonu eklenerek DNA tekrar yıkandı. Magnetik rezonans'a konularak yapışmayan sıvı kısım atıldı.
7. Aynı işlem iki kez tekrarlandı.
8. Ve son olarak kalan kısım 75 µl su ile yıkanıp DNA elde edildi.

9. Elde edilen ürünlerin DNA olup olmadığını anlamak için örnekler %2'lik agaroz jelde 150V'da 25 dk yürütüldü. Ultraviyole (UV) ışığı altında DNA fragmanları görülen örnekler çalışmanın devamında kullanıldı.

3.4. AMPLİFİKASYON İÇİN GEREKLİ ÇÖZELTİLER VE KİMYASAL MADDELER

3.4.1. Çözeltiler

1. 10X (KCl) Tamponu

700 mM/L

200 mM/L

% 0.1 Tween 20

2. PCR Karışımı

10X (KCL) Tamponu 5 µL

12.5 mM dNTP 1 µL

25 mM MgCl₂ 5 µL

Steril distile su 33 µL

3. Primerler: 18S ribosomal RNA (Rns) genotipinin DF3 dizisi içeren ASA.S1 gen bölgesini amplifiye etmek için *Acanthamoeba*'ya özgü JDP1 Ve JDP2 primerleri kullanıldı⁶.

Çizelge 2: *Acanthamoeba* cinsine ait spesifik primer dizilimi³¹.

JDP1	5'- GGCCCAGATCGTTTACCGGAA-3'
JDP2	5'- TCTCACAGCTGCTAGGGGAGTCA-3'

3.4.2. Yöntem

Gen amplifikasyonu, Thermal Cycler ile ısıya dayanıklı mikrotüpler içerisinde yapıldı. Amplifikasyon tüplerinin yerleştirildiği ısı bloğu içerisinde daha önceden belirlenen termal döngü protokolleri uygulandı.

3.4.3. Amplifikasyon Koşulları

PCR tamponu	25 µL
JDP1 primer	3 µL
JDP2 primer	3 µL
gDNA	5 µL
Steril su	9 µL
<hr/>	
Toplam hacim	50 µL'dir.

3.4.4. Termal Cycler ile PCR Protokolü

Amplifiye edilmek istenen DNA uzunluğuna ve primer içeriğine bağlı olarak sıcaklık ve süre değişmektedir. Bu çalışmada JDP1 ve JDP2 primerleri için kullandığımız PCR protokolü aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Çizelge 3: JDP1 ve JDP2 Primerleri için kullanılan PCR programı.

Ön Denatürasyon	95°C	5 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95°C	45 saniye	
Primer bağlanması	60°C	45 saniye	40 döngü
Zincir uzaması	72°C	1 dakika	
Son döngüde zincir uzaması	72°C	10 dakika	1 döngü

3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Örneklerin Yürütülmesi

Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi amplifiye edilmiş DNA moleküllerinin tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanıldı. Agaroz jelde DNA moleküllerinin içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak aynı anoda doğru göç etmektedir ve bu çalışmada, bu göç hızı ile eş zamanlı aplike DNA markerı (100bp Bio Basic) ile birlikte değerlendirildi.

3.4.5.1. Çözeltiler

5X TBE Tamponu (1 litre)

Tris baz	54.0 g
Borik asit	27.5 g
Na ₂ EDTA	20 mL

Tartılan kimyasallar deiyonize suda çözüldü, pH 8.0'a ayarlandı ve 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında depolandı.

3.4.5.2. Yöntem

Temiz ve kuru plastik jel tepsisinin kenarları kapatılarak yükleme kuyucuklarının oluşması için uygun taraklar yerleştirildi. Önceden hazırlanan TBE tamponu ile elektroforez haznesi dolduruldu. Toz halindeki agarozdan 2 g tartılıp erlenmayere konularak üzerine 100 ml TBE eklendi ve karışım agaroz jel eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Kaynatılmış agaroz çözeltisi 50°C'ye soğutularak jel tepsisine döküldü ve oda sıcaklığında katılaşması beklendi. Jel tamamen katılaştıktan sonra bant dikkatli bir şekilde çıkarıldı, elektroforez tankına yerleştirildi ve taraklar çıkarıldı. Her örneğin 10µl'si birbirini izleyen kuyulara, DNA markeri ilk kuyucuğa yüklenerek jel haznesinin kapağı kapatıldı.

3.5. PCR Ürününün Saflaştırılması

UV ışığı altında DNA fragmanlarının görüldüğü JDP1 ve JDP2 primerleri ile amplifiye edilmiş PCR ürünleri, sekans yapılmak amacıyla saflaştırıldı. PCR ürünleri SG

solüsyonuyla muamele edilerek DNA immobilizasyonu sağlandı. DNA yıkanarak atıklar uzaklaştırıldı.

3.5.1. Yöntem

1. Steril 1.5 ml tüpler içerisine 50 µl PCR ürünü konularak üzerine 200 µl SG solüsyonu eklendi.
2. Karışım SentroSpin kolonuna aktararak 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek toplama tüpündeki toplanan sıvı döküldü.
3. SentroSpin kolonuna 500 µl solüsyon SW eklenerek 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
4. Aynı işlem 2 kez tekrar edilerek DNA artırılması sağlandı.
5. Arıtma işlemlerinden sonra SentroSpin kolonu boş olarak 1 dakika santrifüj edildi ve kalan etanol uzaklaştırıldı.
6. SentroSpin kolonu 1.5 mL'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek spin kolonunun ortasına denk gelecek şekilde 50 µl solüsyon SE eklendi.
7. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi. 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA toplandı.

3.6. DNA DİZİ ANALİZİ

3.6.1. Dideoksi Terminasyon Reaksiyonu

Reaksiyon ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI Prism Big Dye™) kullanılarak yapıldı. Bu kit içerisinde AmpliTaq DNA polimeraz içeren bir PCR kitidir. Kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan elde edilir. Bu enzimin 5'-3' nükleaz aktivitesi ile fosfataz aktivitesi inhibe edilmiştir.

DNA dizi analizi için toplam hacim 20 µL olmak üzere aşağıdaki protokole göre reaksiyon karışımı hazırlandı.

Ready Reaction Premiks	4.0 µL
BigDye Sequencing Buffer	2.0 µL
Primer (10 pmol)*	2.0 µL
Pürifiye PCR ürünü	2.0 µL
dH ₂ O	10.0 µL
<hr/>	
Toplam hacim	20.0 µL

*JDP1 ve JDP2 primerleri kullanıldı.

Terminasyon reaksiyonu termal cycler kullanılarak yapılır. PCR programı;

95°C'de	30 sn	} 30 siklus olarak ayarlandı.
50°C'de	10 sn	
60°C'de	4 dk	

3.6.2. Terminasyon Reaksiyon Ürününün Purifikasyonu

Reaksiyonu bitmiş olan PCR ürününün purifikasyonu aşağıdaki protokoldeki gibi yapıldı.

1. 20 µL'lik DNA dizi analizi reaksiyon ürününe 5 µL (125 mM EDTA), 60 µL (%100 etil alkol) ilave edildi.
2. 15 dakika plate oda sıcaklığında vortekslendi.
3. Platedeki PCR ürünleri 2000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.
4. Platedeki süpernatant kısım atık kabına boşaltıldı.
5. Platedeki kuyucukların üzerine 20 µL %70'lik etil alkol ilave edildi ve vortekslendi.
6. Platedeki PCR ürünleri 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
7. Platedeki etil alkol atık kabına boşaltıldı ve boş plate 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
8. Her bir örneğin üzerine 20 µL yükleme solusyonu (sample loading solution) eklendi.

3.6.3. DNA Dizi Analizi Cihazının Çalışma Programı

Örnekler hazırlandıktan sonra ABI 3100 DNA (Applied Biosystems, Nort America) dizi analizi cihazında bulunan örnek tepsisine yerleştirildi ve cihaza başlama komutu verildi.

Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır:

1. Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiller ünitesinin sıcaklığını elektroforez için uygun sıcaklık olan 50⁰C'ye çıkarır.
2. Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapillerin platin çubuğa bağlı serbest ucu örnek yükleme ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.

3. Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler ucu örnek tepsisi üzerinde hareket ederek örnek içerisine girer.
4. Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratır. Yaratılan elektriksel alanda tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler ucu distile su içerisine döner.
5. Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.
6. Kapiler serbest ucu temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest ucu için son noktadır.
7. Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000 V'ye varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest ucundan kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yayıldıkları florasan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder. (Şekil 7)



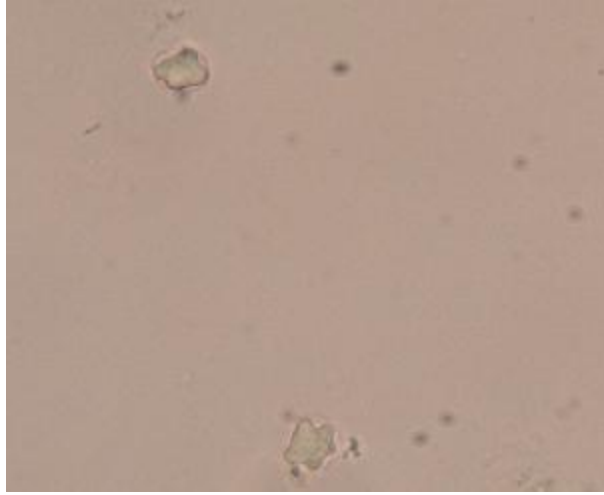
Şekil 7. DNA Dizi Analizi Cihazında Elde Edilen Analiz Görüntüsü

4. BULGULAR

4.1. MİKROSKOBİK İNCELEME SONUÇLARI

4.1.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin Mikroskopik İnceleme Sonuçları

Adana, Afyon, Kütahya, Niğde, Mersin illerinde bulunan farklı yüzme havuzlarından ve kaplıcalardan alınan toplam 50 su örneğinin 15 tanesi mikroskopik incelemede pozitif, 35 tanesi negatif bulundu. (Şekil 8)



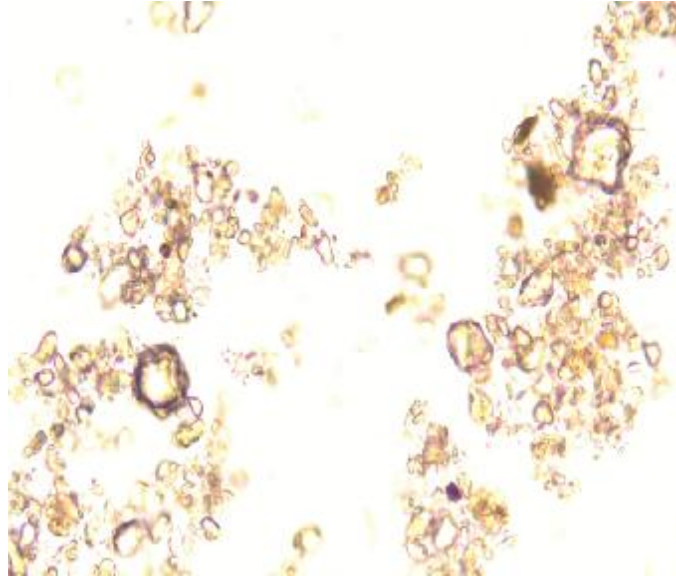
Şekil 8: Acanthamoeba X40 objektifdeki görüntüsü

Çizelge 4: Yüzme havuzları ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin mikroskopik inceleme sonuçları

Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif (+)	Negatif (-)
Adana	10	2 (%20)	8 (%80)
Kütahya	10	7 (%70)	3 (%30)
Niğde	10	1 (%10)	9 (%90)
Mersin	10	1 (%10)	9 (%90)
Afyon	10	4 (%40)	6 (%60)

4.1.2. Toprak Örneklerinin Mikroskopik İnceleme Sonuçları

Adana, Afyon, Kütahya, Niğde, Mersin illerindeki farklı park ve bahçelerden alınan toplam 50 toprak örneğinin 18 tanesi mikroskopik incelemede pozitif, 32 tanesi mikroskopik incelemede negatif bulundu. (Şekil 9)



Şekil 9: Toprak örneklerindeki Acanthamoeba'ların mikroskopik inceleme sonucu (X40'lık objektif)

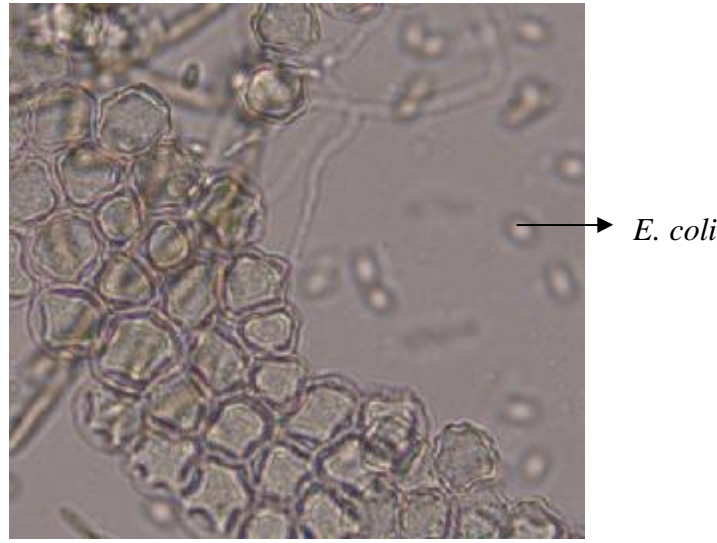
Çizelge 5: Toprak Örneklerinin Mikroskopik İnceleme Sonuçları

Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif (+)	Negatif (-)
Adana	10	4 (%40)	6 (%60)
Kütahya	10	3 (%30)	7 (%70)
Niğde	10	3 (%30)	7 (%70)
Mersin	10	2 (%20)	8 (%80)
Afyon	10	6 (%60)	4 (%40)

4.2. KÜLTÜR SONUÇLARI

4.2.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin Kültür Sonuçları

Filtreden geçirildikten sonra adi besiyerine ekilen 50 su örneğinin 21 tanesinin kültür ortamında ürediği görülürken, 29 tanesinin kültür ortamında ümediği görüldü. (Şekil 10)



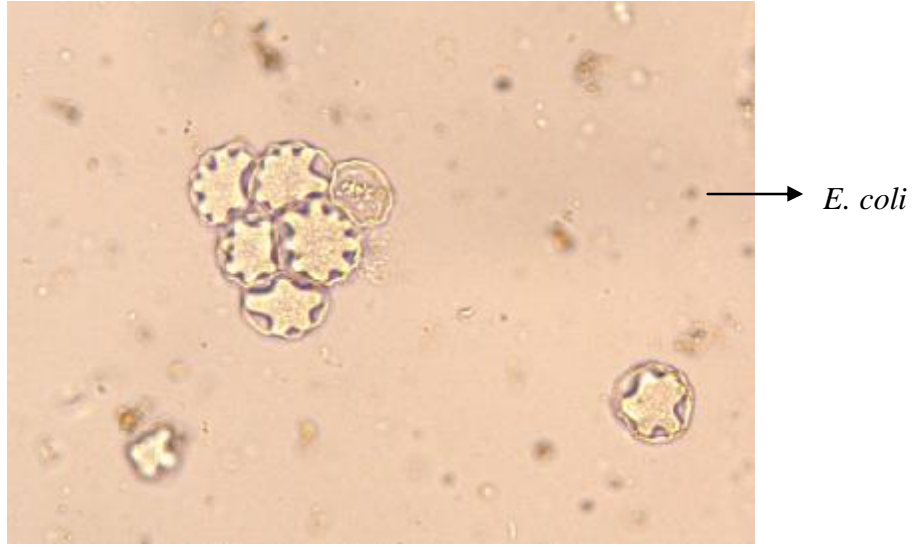
Şekil 10: Su örneklerinin kültür sonuçları (X40 objektif)

Çizelge 6: Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin Kültür Sonuçları

Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif (+)	Negatif (-)
Adana	10	2 (%20)	8 (%80)
Kütahya	10	10 (%100)	0(%0)
Niğde	10	2 (%20)	8 (80)
Mersin	10	1 (%10)	9 (%90)
Afyon	10	6 (%70)	4(%40)

4.2.2. Toprak Örneklerinin Kültür Sonuçları

Çeşitli park ve bahçelerden alınarak adi besiyerine ekilen 50 toprak örneğinin 23 tanesinde üreme gözlenirken, 27 tanesinde üreme olmadığı gözlemlendi. (Şekil 11)



Şekil 11: Toprak örneklerinin kültür ortamındaki görüntüsü (X40 objektif)

Çizelge 7: Toprak Örneklerinin Kültür Sonuçları

Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif (+)	Negatif (-)
Adana	10	6 (%60)	4 (%40)
Kütahya	10	5 (%50)	5 (%50)
Niğde	10	3 (%30)	7 (70)
Mersin	10	2 (%20)	8 (%80)
Afyon	10	7 (%70)	3 (%30)

4.3. PCR YÖNTEMİNİN SONUÇLARI

4.3.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin PCR Yönteminin Sonuçları

Çeşitli bölgelerden alınan ve kültür ortamında üretilen su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba*'ların DNA'ları JDP1-JDP2 primerleri ile amplifiye edildi ve yaklaşık 450 bp uzunluğunda band görünen örnekler pozitif olarak kabul edildi. Toplam 50 su örneğinin 21 tanesi PCR yöntemi ile pozitif bulunurken, 29 tanesi negatif bulundu. (Şekil 12)

Çizelge 8: Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin PCR Yönteminin Sonuçları

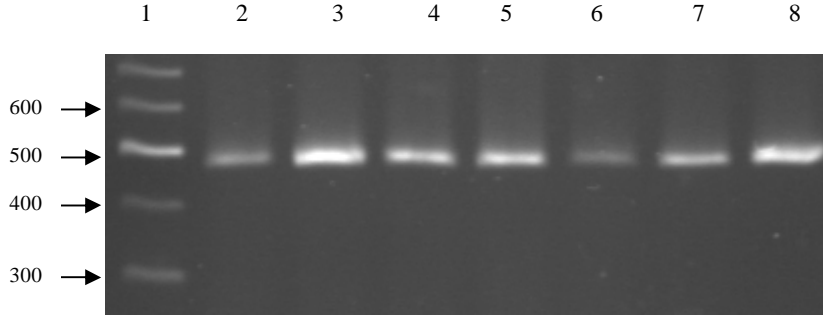
Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif (+)	Negatif (-)
Adana	10	2 (%20)	8 (%80)
Kütahya	10	10 (%100)	0(%0)
Niğde	10	2 (%20)	8 (80)
Mersin	10	1 (%10)	9 (%90)
Afyon	10	6 (%60)	4 (%40)

4.3.2. Toprak Örneklerinin PCR Yönteminin Sonuçları

Kültür ortamında üretilen, park ve bahçelerden alınan toprak örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba*'ların DNA'ları JDP1-JDP2 primerleri ile amplifiye edildi ve yaklaşık 450 bp uzunluğunda band görünen örnekler pozitif kabul edildi. Toplam 50 toprak örneğinin 23 tanesi PCR yöntemi ile pozitif bulunurken, 27 tanesi negatif bulundu. (Şekil 12)

Çizelge 9: Toprak Örneklerinin PCR Yönteminin Sonuçları

Şehir	Örnek Sayısı	Pozitif (+)	Negatif (-)
Adana	10	6 (%60)	4 (%50)
Kütahya	10	5 (%50)	5 (%50)
Niğde	10	3 (%30)	7 (70)
Mersin	10	2 (%20)	8 (%80)
Afyon	10	7 (%70)	3 (%30)



Şekil 12. PCR yöntemi ile pozitif bulunan örneklerin agaroz jel görüntüsü. (1.100 bp'lik marker (Bio Basic), 2-5. Sudan izole edilen *Acanthamoeba* örnekleri 6-8. Toprakdan izole edilen *Acanthamoeba* örnekleri

4.4.DUYARLILIK-ÖZGÜLLÜK SONUÇLARI

4.4.1.Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin Duyarlılık-Özgüllük Sonuçları

Çizelge 10: Yüzme havuzlarından ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin mikroskobik inceleme ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

	Kültür (+)	Kültür (-)	Toplam
Mikroskobi (+)	15	0	15
Mikroskobi (-)	6	29	35
Toplam	21	29	50

$$\text{Duyarlılık: } 15/(15+6) \times 100 = 71.42$$

$$\text{Özgüllük: } 29/(29+0) \times 100 = 100$$

Yüzme havuzunda ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin kültür ve mikroskobik inceleme yöntemi sonuçları karşılaştırıldı. Mikroskobik inceleme yönteminin, kültür yöntemine göre duyarlılığı %71.42, özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

Çizelge 11: Yüzme havuzlarından ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

	Kültür (+)	Kültür (-)	Toplam
PCR (+)	21	0	21
PCR (-)	0	29	29
Toplam	21	29	50

$$\text{Duyarlılık: } 21/(21+0) \times 100 = 100$$

$$\text{Özgüllük: } 29/(29+0) \times 100 = 100$$

Yüzme havuzunda ve kaplıca sularından alınan su örneklerinin kültür ve PCR yöntemi sonuçları karşılaştırıldı. PCR yönteminin, kültür yöntemine göre duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

4.4.2. Toprak Örneklerinin Duyarlılık-Özgüllük Sonuçları

Çizelge 12: Toprak örneklerinin kültür ve mikroskobik inceleme sonuçlarının karşılaştırılması

	Kültür (+)	Kültür (-)	Toplam
Mikroskobi (+)	18	0	18
Mikroskobi (-)	5	27	32
Toplam	23	27	50

$$\text{Duyarlılık: } 18/(18+5) \times 100 = 78.26$$

$$\text{Özgüllük: } 27/(27+0) \times 100 = 100$$

Toprak örneklerinin kültür ve mikroskobik inceleme yöntemi sonuçları karşılaştırıldı. Mikroskobik inceleme yönteminin, kültür yöntemine göre duyarlılığı %78.26, özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

Çizelge 13: Toprak örneklerinin kültür ve PCR yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

	Kültür (+)	Kültür (-)	Toplam
PCR (+)	23	0	23
PCR (-)	0	27	27
Toplam	23	27	50

$$\text{Duyarlılık: } 23 / (23+0) \times 100 = 100$$

$$\text{Özgüllük: } 27 / (27+0) \times 100 = 100$$

Toprak örneklerinin kültür ve PCR yöntemi sonuçları karşılaştırıldı. PCR yönteminin, kültür yöntemine göre duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

4.5. DNA DİZİ ANALİZ YÖNTEMİNİN SONUÇLARI

4.5.1. Yüzme Havuzlarından ve Kaplıca Sularından Alınan Su Örneklerinin DNA Dizi Analizi Yönteminin Sonuçları

Adana, Afyon, Kütahya, Niğde ve Mersin illerinden alınan su örneklerinden elde edilen PCR ürünleri genotiplendirme yapmak amacıyla DNA dizi analizi yöntemi ile çalışıldı. DNA dizi analizi sonucunda Adana, Afyon, Niğde ve Mersin illerinden izole edilen *Acanthamoeba*'ların %100 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), Kütahya ilinden izole edilen *Acanthamoeba*'lardan %90 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), %10 oranında *Acanthamoeba griffini* (T3) olduğu saptandı. *Acanthamoeba*'ların DNA dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri çizelge 4 ve 5'de gösterilmektedir.

4.5.2. Toprak Örneklerinin DNA Dizi Analizi Yönteminin Sonuçları

Adana, Afyon, Kütahya, Niğde ve Mersin illerindeki çeşitli park ve bahçelerden alınan toprak örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba*'ların genotiplendirilmesi DNA dizi analizi yöntemi ile yapıldı. Afyon, Niğde ve Mersin ilinde %100 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), Adana ilinde % 67 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), %33 oranında *Acanthamoeba griffini* (T3), Kütahya ilinde %80 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), %20 oranında *Acanthamoeba griffini* (T3) tespit edildi. *Acanthamoeba*'ların DNA dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri çizelge 4 ve 5'de gösterilmektedir.

Çizelge 14: Su ve toprak örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba castellanii* türlerinin DNA dizi analiz sonuçları

Acanthamoeba castellanii (T4) JDP(forward primer)

```

Alignment: C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\Untitled.txt

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 5      15      25      35      45      55
AAAGGTTGTG CAAGCAGGCA GATCCATTTT CGGCCCCGAT TACTTTAGCA TGGGATATTG

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 65      75      85      95      105     115
GATTAGGACC CTGTCCTCCT ATTTTCAGTT GGTTTTGGCA GCGCGAGGAC TAGGGTAATG

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 125     135     145     155     165     175
ATTAATAGGG ATAGTTGGGG GCATTAATAT TTAATTGTCA GAGGTGAAAT TCTTGGATT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 185     195     205     215     225     235
ATGAAAAGATT AACTTCTGCG AAAGCATCTG CCAAGGATGT TTTTCAATTA CAAGAACGAA

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 245     255     265     275     285     295
AGTTAGGGGA TCGAAGACGA TCAGATACCG TCGTAGTCTT AACCATAAAC GATGCCGACC

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 305     315     325     335     345     355
AGCGATTAGG AGACGTTGAA TACAAAACAC CACCATCGGC GCGGTCGTCC TTGGCGTCGG

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 365     375     385     395     405     415
TCCTTCACGG GGCCGGCGCG AGGGCGGCTT AGCCCGGTGG CACCCGTGAA TGACTCCCAG

A. castella A
    
```

Acanthamoeba castellanii (T4) JDP(reverse) primer

```

Alignment: C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\Untitled.txt

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 5      15      25      35      45      55
TCGCCTGCCC TCGAAGCCGG CCCCCTGAGG GACCACGCC AGGACGACCG CGCCGATGGT

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 65      75      85      95      105     115
GGTGTTTTGT ATTCACGTCT CCTATTCGCT GGTCGGCATC GTTTATGGTT AAGACTACGA

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 125     135     145     155     165     175
CGGTATCTGA TCGTCTTCAA TCCCCTAACT TTCGTTCTTG ATTAATGAAA ACATCCTTGG

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 185     195     205     215     225     235
CAGATGCTTT CGCAGAAGTT AATCTTTCAT AATTCCAAGA ATTTACCTC TGACATTTAA

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 245     255     265     275     285     295
ATATTAATGC CCCCAACTAT CCCTATTAAT CATTACCCTA GTCCTCGCGC TGCCAAAACC

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 305     315     325     335     345     355
AACTGAAAAT AGGAGGACAG GGTCCATTTC CATTATCCCA TGCTAATGTA TTCGGTGGCA

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
A. castella 365     375     385     395     405
GAAAATTGGA TCTGCCTGCT TTGAACACTC TAATTTTTC CGTAAA
    
```

Çizelge 15: Su ve toprak örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba griffini* türlerinin DNA dizi analiz sonuçları

Acanthamoeba griffini (T3) JDP (forward) Primer

Alignment: C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\Untitled.txt

A. griffini
	5	15	25	35	45	55
A. griffini	TTGTTGGAAT	CCGGCAGACC	CTTTTCTGCA	GCCGAATACT	TAGCATGGGA	TAATGGATTA
A. griffini
	65	75	85	95	105	115
A. griffini	GGACCCTGTC	CTCCTATTTT	GCGTGTTGGT	TTTCGAGGAC	CGGGTAATGA	TTAATAGGGA
A. griffini
	125	135	145	155	165	175
A. griffini	TAGTTGGGGG	CATTAATATT	TAATTGTCAG	AGGTGAAATT	CTTGGATTTA	TGAAAGATTG
A. griffini
	185	195	205	215	225	235
A. griffini	ACTTCTGCGA	AAGCATCTGC	CAAGGATGTT	TTCATTAATC	AAGAACGAAA	GTTAGGGGAT
A. griffini
	245	255	265	275	285	295
A. griffini	CGAAGACGAT	CAGATACCGT	CGTAGTCTTA	ACCATAAACG	ATGCCGACCA	GCGATTAGGA
A. griffini
	305	315	325	335	345	355
A. griffini	GACGTTGAAT	ACAAAACACC	ACCGTTGGGT	CGTGCGGGGC	CGTGCCCCGC	GGTCCGTCGT
A. griffini
	365	375	385	395	405	415
A. griffini	GCGCGGCGAC	GCGTGCGGCG	GCCACGGGGA	CCGCGGTCCG	TATCAGCCAC	CCGACGGCCC
A. griffini				
	425	435				
A. griffini	GGTGAATGAC	TCCGAA				

Acanthamoeba griffinii (T3) JDP (reverse) primer

Alignment: C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\Untitled.txt

A. griffini
	5	15	25	35	45	55
A. griffini	CCCGGCTCGT	TTGATTGAAT	ACGGACCGCG	TTCCCCGTGG	CCGCCGCACG	CGTCGCCGCG
A. griffini
	65	75	85	95	105	115
A. griffini	CACGACGGAC	CGCGGGGCAC	GGCCCGCCAC	GACCCAACGG	TGGTGTTTTG	TATTCAACGT
A. griffini
	125	135	145	155	165	175
A. griffini	CTCCTATTCG	CTGGTCGGCA	TCGTTTATGG	TTAAAACCTAC	GACGGTATCT	GATCGTCTTC
A. griffini
	185	195	205	215	225	235
A. griffini	AATCCCCTAA	CTTTCGTTCT	TGATTAATGA	AAACATCCTT	GGCAGATGCT	TTCGCAGAAG
A. griffini
	245	255	265	275	285	295
A. griffini	TCATTCTTTC	ATAAATCCAA	GAATTTCAAC	TCTGACATTT	AAATATTAAT	GCCCCCAACT
A. griffini
	305	315	325	335	345	355
A. griffini	ATCCCTATTA	ATCATTACCC	GGTCCTCGAA	AACCAACACG	CAAAATAGGA	GGACAGGGTC
A. griffini
	365	375	385	395	405	415
A. griffini	CTATTCCATT	ATCCCATGCT	AATGTATTCG	GTGGCAGAAA	TGGTCTGCCT	GCTTTGAACA
A. griffini		
	425	435	445	455		
A. griffini	CTCTATTTTT	TCCGGAAAAA	AACAGGGGAG	AACAT		

5. TARTIŞMA

Acanthamoeba türleri çevrede toprak, tatlı sular, kaynak suları ve yüzme havuzları gibi ortamlarda serbest halde bulunmasından dolayı insanların bu parazit ile enfekte olma riski yüksektir³². *Acanthamoeba* türleri, granülatöz amibik ensefalit (GAE), kutanöz acanthamoebasis, *Acanthamoeba keratiti* ve AIDS'li hastalarda enfeksiyonun çeşitli organlara yayılmasına bağlı olarak kronik sinüzit, otit, kutanöz lezyonlar, sinüs lezyonları, deri ülserleri gibi hastalıklar meydana getirirler⁵. Bu hastalıkların tanısı için klinik bulgular yeterli olmayıp laboratuvar bulgularına da gereksinim duyulmaktadır. *Acanthamoeba*'nın laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda bu yöntemlerin *Acanthamoeba* tanısındaki duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırılmış ve değişik sonuçlar elde edilmiştir³³.

Dhivya ve arkadaşları moleküler tanı yöntemlerinden PCR ile kültür yöntemini karşılaştırmışlar ve PCR'in kültüre göre duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak saptamışlardır³⁴. Çalışmamız da kültür yöntemi altın standart olarak alındı ve PCR yöntemi ile duyarlılık-özgüllük hesabı yapıldı. Çalışmamızın sonucunda su ve toprak örneğimizde PCR'in kültüre göre %100 duyarlılık, %100 özgüllük gösterdiği tespit edildi. *Acanthamoeba*'nın neden olduğu hastalıklarda erken ve hızlı tanı hastalığın tedavisi için önemlidir. Mikroskopik inceleme yöntemi duyarlılığı düşük olmasına rağmen, hızlı ve basit bir yöntem olduğu için *Acanthamoeba* tanısında ilk tercih edilen yöntemdir. Çalışmamızda mikroskopik inceleme yöntemi ile kültür yöntemi karşılaştırıldığında, su örneğimizde mikroskopik incelemenin duyarlılığının kültür yöntemine göre %71.42, toprak örneğimizde %78.26 olduğu görüldü. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar mikroskopik inceleme yönteminin *Acanthamoeba* tanısında düşük duyarlılık gösterdiğini, bu yöntem yerine PCR veya kültür yönteminin tercih edilmesi gerektiğini desteklemektedir.

Acanthamoeba türleri dünyanın değişik bölgelerinde değişik oranlarda görülen ve her sosyal statüdeki insanı enfekte edebilme özelliğinde olduğundan parazitin moleküler yapısının araştırılması insan sağlığı bakımından çok önemlidir³. Dünyanın birçok bölgesinde moleküler yöntemler kullanılarak *Acanthamoeba*'ların genotiplendirilmesi ile ilgili genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır. Bunlar arasında en yaygın olan ise *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA gen bölgesine ait olan JDP1-JDP2 primerleri ile yapılan PCR'a dayalı moleküler çalışmalardır³⁵.

Booton ve arkadaşları Hongkong'ta *Acanthamoeba* keratitine olgularına neden olan olgularda *Acanthamoeba* türlerini tanımlamak için parazitin 18S rRNA gen bölgesini hedef almışlar ve JDP1-JDP2 primerlerini kullanarak PCR ve DNA dizi analizi yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda Hongkong'taki *Acanthamoeba* keratitine T4 ve T3 genotiplerindeki *Acanthamoeba*'ların neden olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada hastaların kullandığı kontak lens sıvıları ile çeşme suları incelenmiş ve onlarda da T4, T3 genotipinde *Acanthamoeba* tespit etmişlerdir³⁵.

Init ve arkadaşları 2010 yılında Malezya'da, *Acanthamoeba*'ların yüzme havuzlarında görülme sıklığını ve bu parazitlerin yüzme havuzlarının hangi bölgelerinde daha çok görüldüğünü araştırmışlardır. Yüzme havuzlarını üç farklı bölgelerinden (havuzun duvar kenarı, yüzücülerin atlama yeri, yüzmek için kullanılan iç alan) su örnekleri almışlardır. Yüzme havuzunun duvar kenarında %76, yüzücülerin atlama yerinde %64.7 ve yüzücüler tarafından daha az kullanılan orta alanda %19.4 oranında *Acanthamoeba* saptamışlardır³⁶. Init ve arkadaşlarının çalışmasında yüzme havuzunun farklı bölgelerinde farklı oranlarda *Acanthamoeba* saptanmış olmasına rağmen çalışmamızda yüzme havuzunun duvar kenarında, atlama yerinde ve orta alanda alınan örneklerin hepsinde aynı oranda *Acanthamoeba* tespit edildi. Init ve arkadaşlarının çalışmaları ile çalışmamızın sonuçları *Acanthamoeba*'ların yüzme havuzlarının her bölgelerinde görülebildiğini ve havuza giden her insanın bu parazit ile enfekte olma riskinin bulunduğunu göstermektedir³⁶.

Nuprasert ve arkadaşları Tayland'daki tatlı su örneklerini incelemişler, bölgede T4 ve T17 genotipde *Acanthamoeba* bulmuşlardır³⁷. Caumo ve arkadaşları Brazilya'daki yüzme havuzu su örneklerini araştırmışlar ve T5, T4, T3 genotipde *Acanthamoeba* tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada T5'in bölgede yaygın olduğu rapor edilmiştir²¹. Bu çalışmalar dünyanın her bölgesinde farklı oranlarda ve farklı genotiplerde *Acanthamoeba* türlerinin görülebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda da T4 ve T3 genotipi tesbit edildi.

Malezya'da Chan ve arkadaşları ev ve işyerinde kullanılan klima kapaklarındaki toz örneklerini toplamışlar ve bu örneklerdeki *Acanthamoeba*'ların genotiplerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda 87 toz örneğinin 20'sinde *Acanthamoeba* izole etmişler ve bu *Acanthamoeba*'ların T3, T5 ve T4 genotiplerine sahip olduklarını rapor etmişlerdir³⁸.

Yurdumuzda *Acanthamoeba* ile ilgili ilk çalışma Erzurum'da gerçekleşmiş ve ilk *Acanthamoeba* keratiti olgusu Elazığ'dan bildirilmiştir³. Son yıllarda birçok ülkede olduğu

gibi ülkemizde de *Acanthamoeba* türlerinin moleküler yapısını araştırmak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Kuk ve arkadaşları, Kayseri ve çevresinden 29 su örneğini (26 kuyu suyu, 3 çeşme suyu) *Acanthamoeba* görülme sıklığı bakımından araştırmışlar ve görülen *Acanthamoeba*'ları genotiplendirmişlerdir. 26 su örneğinin 5 tanesinden *Acanthamoeba* izole etmişler ve izole edilen *Acanthamoeba*'larının hepsinin T4 genotipine sahip olduğunu rapor etmişlerdir³⁹.

Ertabaklar ve arkadaşları, 2007 yılında Türkiye'de ilk kez *Acanthamoeba* keratiti olgularından T9 izole etmişlerdir. Yine aynı çalışmada araştırmacılar diğer *Acanthamoeba* keratiti olgularından T4 de izole etmişlerdir⁴⁰.

Bu çalışmada DNA dizi analizi sonucunda Adana, Afyon, Niğde ve Mersin illerinden alınan su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba*'ların %100 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), Kütahya ilinden izole edilen *Acanthamoeba*'lardan %90 oranında *Acanthamoeba castellanii* (T4), %10 oranında *Acanthamoeba griffini* (T3) olduğu saptandı.

Kılıç ve arkadaşları Ankara ilinde 28 toprak örneği ve 2 su örneğinden *Acanthamoeba* izole etmişler ve bu parazitlerin genotiplerinin T2, T3, T4 ve T7 olduğunu bildirmişlerdir⁴¹. Jacob ve arkadaşları İspanya'da bahçe topraklarını ve kumsaldaki kum örneklerini PCR yöntemi ile *Acanthamoeba* bakımından incelemişlerdir. Toprak örneklerinde %37.7 *Acanthamoeba*, kum örneklerinde %42 oranında *Acanthamoeba* olduğunu ve bunların *A. polyphaga* ile *A. astronyxis* türleri olduğunu rapor etmişlerdir.⁴² Bu çalışmada Afyon, Niğde ve Mersin ilinde %100 oranında *A. castellanii* (T4), Adana ilinde %67 oranında *A. castellanii* (T4), %33 oranında *A. griffini* (T3), Kütahya ilinde %80 oranında *A. castellanii* (T4), %20 oranında *A. griffini* (T3) tespit edildi.

Yurdumuzda yapılan çalışmaların sonuçlarına baktığımızda toprak, su gibi çevresel ürünlerden izole edilen *Acanthamoeba*'lar arasında T4'ün baskın olduğu, bunu T2 ve T3'ün takip ettiği görülmüştür. Ülkemizde nadir olarak T7 ve T9 genotipleri de görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgular doğada serbest yaşayan *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesi ile ilgili Türkiye'de yapılan diğer çalışmaları, her ne kadar sadece T4 ve T3 genotipleri saptanmış olsada desteklemektedir. *Acanthamoeba* türleriyle ilgili Türkiye'nin değişik bölgelerinde görülmekte ve ülkede T4 genotipe sahip *Acanthamoeba* türleri baskın olarak görülmektedir.

Günümüze kadar yurdumuzda yapılan çalışmalara baktığımızda *Acanthamoeba*'ların birkaç türü rapor edilmiştir. Fakat bu sayı her geçen gün gittikçe artabilir. Unutulmamalı ki literatürdeki olguların pek çoğu klinik olgulardan, otopsilerden, bu paraziti tanıyanlar veya onları akla getirenler tarafından saptanmıştır.

Çalışma, konu ile ilgili bölgemizde yapılan ilk çalışmadır. Örnek sayısının artırılması sonucunda diğer tür ve genotiplerinde ilerideki günlerde saptanacağı gerçeği göz önünde tutulmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Acanthamoeba'lar, *Acanthamoeba* keratiti, kutanöz acanthamoebiasis ve granüloamatöz amibik ensefalit gibi önemli hastalıklara neden olmaktadır. Doğada serbest yaşayan *Acanthamoeba* türleri dünyanın her yerinde, iklim şartı ayırt edilmeksizin görüldüğü için sosyo-ekonomik durum gözetmeksizin toplumdaki her kişi enfekte etme özelliğine sahiptir. Bu yüzden *Acanthamoeba* türlerinin moleküler çeşitliliğinin bilinmesi bu türlerin neden oldukları hastalıkların epidemiyolojisi, tanısı, tedavisi ve insanların bu parazitlerden korunması için önemlidir.

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli illerinden toprak ve su örnekleri alınıp, bu örneklerdeki *Acanthamoeba* türleri genotiplendirilmiştir. Çalışma Türkiye'deki *Acanthamoeba* genotip çeşitliliğinin belirlenmesi için oldukça önemlidir. Ayrıca bu çalışma yüzme havuzu, akuatik kaynaklar, kaplıca suları ve toprak ile sürekli temas halinde bulunan insanların *Acanthamoeba* türleri ile enfekte olma risklerinin değerlendirilmesi açısından da önemlidir.

Bu kaynaklarla temas halinde bulunan kişilerin *Acanthamoeba* parazitinin tehlikeleri ve korunma yolları hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir. Özellikle park alanında oynayan çocukların ve ailelerinin hem hijyen bakımından dikkatli olmaları hem de bu parazitin tehlikeleri hakkında bilgilendirilmesi oldukça önemlidir. Sadece enfeksiyon bulaşma riski açısından halk değil aynı zamanda sağlık sektöründe çalışan herkes *Acanthamoeba* paraziti hakkında bilgilendirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. **John DT.** Opportunistically pathogenic free-living amebae. Parazitic Protozoa., 2nd ed, vol 3, eds Kreier JP, Baker JR, Academic Pres, Sam Diego, **1993**; p.143-246.
2. **Marciano-Cabral F, Cabral G.** Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev, **2003**; 12 (2): 273-307.
3. **Saygı G, Polat Z.** Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitler (Primer amibik meningosefalit-Granülomatöz amibik ensefalit-Keratif). CÜ Tıp Fak. Derg., **2003** ; 25(3) : 140-149.
4. **Özcel MA.** Tıbbi Parazit Hastalıkları Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:22, **2007**; S: 309-310.
5. **Akın PZ, Özçelik S, Vural A, Saygı G.** Aksenik Kültürlerde Acanthamoeba Trofozoitleri Üzerindeki Gözlemler ve Bunların Farklı Boyalarla Boyanma Özellikleri. Türkiye Parazitoloji Dergisi, **2007**;31(1):7-13.
6. **Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon APG, Rott MB.** Potentially pathogenic Acanthamoeba in swimming pools; survey in the southern Brazilian City of Pornto alegre. Ann. Trop. Med parazitol, **2009**; 103, 477-485.
7. **Abe N, Klimata I.** Genotyping of Acanthamoeba isolates from corneal scrapings and contact lens cases of Acanthamoeba Keratitis patients in Osaka, Japan, Jpn. J. Infect . Dis., **2010**; 63(4):299-301.
8. **Chang CW, Wu YC.** Evaluation of DNA extraction methods and dilution treatment for detection and quantification of Acanthamoeba in water biofilm by real-time PCR. Water sci Technol, **2010**; 62(9): 2141-9.
9. **Saygı G.** Paraziter hastalıklar ve Parazitler, **2009** ; 65-71.
10. **Köshler AF, Laube U, Radam E, Tata PS.** Oral infection of immunocompetent and immunodeficient mice with Balamuthia mandrillaris amebae. Parazitol Res., **2007**; 100 : 775-782.
11. **Rodrigues D, Reis M, Teixeira V, Silva-Ververa M, Filho DC, Adad S, Lazo J.** Pathologic findings in the adrenal glands of autopsied patients with acquired immunodeficiency syndrome. Pathol Res Prac **2002**; 198: 25-30.
12. **Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA. et al.** The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taksonomy of protists. J Eukaryot Microbiol., **2005**; 52:399-451.
13. **Khan NA.** Acanthamoeba : biology and increasing importance in human health, FEMS Microbiol Rev., **2006**; 30(4):564-95.
14. <http://en.wikipedia.org/wiki/Acanthamoebidae>.
15. **Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL.** Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri and Sappinia diploidea, FEMS Immunol Med Microbiol., **2007**; 50(1):1-26.
16. **Khan NA, Jarroll EL, Paget TA.** Molecular and physiological differentiation between pathogenic and non-pathogenic Acanthamoeba. Cur Microbiol., **2001**; 45: 197-202.
17. **Walochnik J, Sommer K, Obwaller A, Haller-Scholer EM, Aspöck H.** Characterization and differentiation of pathogenic and non- pathogenic Acanthamoeba strains by their protein and antigen profiles. Parazitol Res., **2004**; 92: 289-298.
18. **Schuster FL, Visvesvara.** Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic Pathogens of humans and animals. Int Parasitol., **2004**; 34: 1-27.
19. **Maghsood 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 clinicalisolates. J Med Microbiol., **2005**; 54: 755-759.
20. <http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>.
21. **Caumo K, Rott BM.** Acanthamoeba T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. Acta Trop., **2010**; 117(3):233-5.

22. **Martinez AJ.** Infections of the central nervous system due to acanthamoeba. *Rev Infect Dis.*, **1991**; 13:S399-S402.
23. **Martinez MS, Gonzalez-Mediero G, Santiago P, Rodriguez de Lope A, Diz J, Conde C, Visvesvara GS.** Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of acanthamoeba sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol.*, **2000**; 38: 3892-3895.
24. **Schuster FL.** Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev.*, **2002**; 15 : 342-354.
25. **Walochnik J, Duchene M, Seifert K, Oberwaller A, Hottkowitz T, Wiedermann G, Eibl H & Aspöck H.** Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2002**; 46:695-701.
26. **Abe N, Klimata I.** Genotyping of *Acanthamoeba* Isolates From Corneal Scrapings and Contact Lens Cases of *Acanthamoeba* Keratitis Patients in Osaka, Japan, *Jpn. J. Infect. Dis.* , **2010**; 63(4):299-301.
27. **Beattie TK, Tomlinson A & Seal DV.** Anti- *Acanthamoeba* efficacy in contact-lens disinfecting systems. *Br J Ophthalmol.*, **2002**; 86: 1319-1320.
28. **Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelley DJ & Fuerst PA.** Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol.*, **2005**; 43: 1689-1693.
29. **Lim L, Coster DJ & Badenoch PR.** Antimicrobial susceptibility of 19 Australian corneal isolates of *Acanthamoeba*. *Clin Exp Ophthalmol.*, **2000**; 29: 119-124.
30. **Turner NS, Russell AD, Furr JR & Lloyd D.** Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Antimicrob Chem.*, **2000**; 46: 27-34.
31. **Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ.** Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol.*, **2001**; 39(5):1903-11.
32. **Lorenzo-Morales J, Lopez-Darias M, Martinez-Carretero E, Valladares B.** Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. *Exp. Parasitol.*, **2007**; 117(1):74-9.
33. **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.
34. **Dhivya S, Madhavan HN, Rao ChM, Rao KS, Ramchander PV, Therese KL, Malathi J.** Comparison of a novel semi-nested polymerase chain reaction (PCR) with a uniplex PCR for the detection of *Acanthamoeba* genome in corneal scrapings. *Parasitol Res*; **2007**; 100(6): 1303-1309.
35. **Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DSC, Byers TJ, Fuerst PA.** 18S Ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* Keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol.*; **2002**; 40(5):1621-1625.
36. **Init I, Lau YL, Arin Fadzlan A, Foad AI, Neilson RS, Nissapatorn V.** Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Trop Biomed.*, **2010**; 27(3):566-77.
37. **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. *J Clin Microbiol.*, **2010**; 48(12):4636-40.
38. **Chan LL, Mak JW, Low YT, Koh TT, Ithoi I, Mohamed SM.** Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Trop.*, **2011**; 117(1):23-30.
39. **Kuk S, Yazar S, Doğan S, Çetinkaya Ü, Sakalar Ç.** Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water, *Turk J Med Sci.*, **2013**; 43(1): 12-17.
40. **Ertabaklar H, Türk M, Dayanır V, Ertug S, Walochnik J.** *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res* , **2007**; 100: 241-246.

41. **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: 246-252.
42. **Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jimenez C, Tejedor ML, Valladares B, Ortega-Rivas A.** Evaluation of Acanthamoeba isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med.*, **2005**; 12(2): 233-236.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Adana'da dünyaya geldi. İlköğretimini ve lise öğretimini Adana'da tamamladı. Üniversite lisans eğitimini 2009 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. Mezun olduğu yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğretimine başladı. İngilizce bilmektedir.