



**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVRESEL VE KLİNİK ÖRNEKLERDE *ACANTHAMOEBA* SPP. VE  
*NAEGLERIA* SPP. VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**ÖNDER YÜNLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK**

**SİVAS**

**2013**

**T.C.**  
**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVRESEL VE KLİNİK ÖRNEKLERDE *ACANTHAMOEBA* SPP. VE  
*NAEGLERIA* SPP. VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**ÖNDER YÜNLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK**

**SİVAS**

**2013**

**Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.**

Başkan Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK

Üye

Üye

Üye

Üye

### **ONAY**

Bu tez çalışması, 15.02.2013 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

---

Prof. Dr. Ömer POYRAZ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

[Proje No: T-479].

## **TEŞEKKÜR**

Bu çalıőmamın gerçekleőtirilmesinde büyük katkıları bulunan, yardım ve desteğini esirgemeyen danıőmam hocam Sayın Prof. Dr. Semra zelik'e ve Parazitoloji Ana Bilim Dalı ęretim üyelerine, örneklerin toplanması esnasında bana yardımlarını esirgemeyen Gz polikliniği hoca ve asistanlarına, bana her zaman destekleriyle yardımcı olan ağabeyim ęretim görevlisi sayın Halil İbrahim YNL'ye içtenlikle teşekkür ederim.

## ÖZET

### ÇEVRESEL VE KLİNİK ÖRNEKLERDE *ACANTHAMOEBA* SPP. VE *NAEGLERIA* SPP. VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Çalışmada, çevresel ve klinik örneklerde doğada serbest yaşayan amip türlerinin prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göz Anabilim Dalı polikliniğine çeşitli nedenlerle başvuran hastalardan elde edilen 500 alt göz kapağı sürüntü örnekleri, aynı hastanenin çeşitli birimlerinde bulunan 23 klimadan alınan sürüntü örnekleri ve Sivas il merkezinden alınan 13 çevresel su örneği incelenmiştir. Steril eküvyonlar kullanılarak elde edilen hasta örnekleri, içinde steril serum fizyolojik bulunan ve ağzı kapalı tüplerde laboratuvara taşınmıştır. Klima sistemlerinden de filtrelerinden steril eküvyonla alınan sürüntü örnekleri laboratuvara getirilmiştir. Su örnekleri 500 ml lik plastik şişelerde toplanmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında bir gün bekletilen örnekler üzerine *E.coli* ekilmiş, Besleyici Değeri Olmayan Agar içeren plaklara inoküle edilerek 30 °C de inkübe edilmiştir.

Çalışmada, 500 kişiden alınan göz kapağı sürüntü örneğinin birinde *Acanthamoeba* spp(%0.2), birinde ise *Hartmannella* spp.(%0.2) üremiştir. 24 farklı klimadan alınan sürüntü örneğinin 18'inde serbest yaşayan amip üretilmiş olup bunlardan 4'ünde *Acanthamoeba* spp., 4'ünde *Naegleria* spp., 10'unda *Hartmannella* spp., üretilmiştir. 13 su örneğinin ise 4'ünde *Acanthamoeba* spp. saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., havalandırma, göz yaşı, su

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF *ACANTHAMOEBA* SPP. AND *NAEGLERIA* SPP IN CLINICAL AND ENVIRONMENTAL SAMPLES

In the study, it is aimed to determine the prevalence of amoeba species in the clinical and environmental samples. For this purpose, 500 lower eye lid smear samples who admitted to Cumhuriyet University, Research and Application Hospital, Department of Ophthalmology with variety of reasons, 23 different clima samples and 13 water samples were obtained. Samples were transport in sterile tubes to the laboratory. Water samples were collected 500 ml. in plastic bottles. Collected samples were stayed over nighth room temprature in the laboratory. Than, all samples were inoculated on non-nutritional agar to be present *E.coli.* and incubated at 30<sup>0</sup>C.

In the study, one of these 500 the lower eye lid smear samples *Acanthamoeba* spp(0.2%),and one of *Hartmannella* spp.(0.2%) were detected. Of 18 samples were positive for free living amoebae in samples were taken from 24 different climas. Of 18 samples 4 were detected for *Acanthamoeba* spp, 4 for *Naegleria* spp, and 10 for *Hartmannella* spp. Of 13 water samples four were obtained for *Acanthamoeba* spp.

**Key words:** *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., air condition, tear, water

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sınıflandırma.....	4
2.1.1. <i>Acanthamoeba</i> Cinsi.....	5
2.1.2. İzolasyon ve Türleri.....	6
2.2. <i>Naegleria</i> Cinsi.....	6
2.2.1. İzolasyon ve Türleri.....	9
2.3. <i>Balamuthia</i> Cinsi.....	10
2.4. Tarihçe ve Sistematik.....	10
2.5. Ekoloji ve Dağılımı.....	11
2.6. Hayat Döngüsü.....	11
2.7. Morfoloji.....	12
2.8. <i>Acanthamoeba</i> 'nın Kültürü.....	13
2.9. Fırsatçı Patojen Olarak <i>Acanthamoeba</i> ssp.....	13
2.9.1. GAE.....	13
2.9.2. AIDS'li Hastalarda <i>Acanthamoeba</i> Enfeksiyonu.....	14
2.9.3. Kutanoz <i>Acanthamebiasis</i> .....	14
2.9.4. Fırsatçı Patojen <i>Acanthamoeba</i> ssp. ve Amibik Keratit.....	15



<b>2.10. <i>Acanthamoeba</i> Enfeksiyonunun Tanısı.....</b>	<b>16</b>
2.10.1 GAE.....	16
2.10.2. Amibik Keratitin Tanısı.....	18
2.10.3. Kutanöz <i>Acanthamebiasis</i> Tanısı.....	19
<b>2.11. <i>Acanthamoeba</i> Enfeksiyonunun Immunolojisi ve Patolojisi.....</b>	<b>20</b>
2.12.1. Amibik Keratitte Immun Sistemin Rolü.....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>23</b>
3.1. Örneklerin Toplanması.....	23
3.1.1. Göz Kapağı Sürüntü Örneklerinin Alınışı.....	23
3.1.2. Klima Sistemlerinden Sürüntü Örneklerinin Alınışı.....	23
3.1.3. Su Örneklerinin Alınışı.....	23
3.2. Örneklerin Muhafaza Edilmesi ve Ekilmesi.....	24
3.3. Örneklerin Işık Mikroskopunda İncelenmesi.....	24
3.4. Örneklerin Fotoğraflarının Çekilmesi.....	25
3.5. Kamçı Deneyi.....	25
3.6. Isı Tolerans Testi.....	26
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
4.1. Göz Kapağından Alınan Sürüntü Örneklerinden Elde Edilen Bulgular.....	27
4.2. CÜSHAU Hastanesindeki Farklı Birimlerde Bulunan Klimaların Filtrelerinden Elde Edile Bulgular.....	30
4.3. Su Örneklerinden Elde Edilen Bulgular.....	37
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>38</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>44</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>50</b>

## **TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 4.1.</b> Göz polikliniğine gelen hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı,yaş aralıkları ve polikliniğe gelme nedenleri.....	40
<b>Tablo 4.2.</b> Klima sistemlerinden alınan örneklerin toplandığı noktalar ve SYA görülme durumları.....	41

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** *Naegleria* türlerinin gruplarının soy ağacı görünümü.....18
- Şekil 2.** Alt göz kapağı sürüntüsünden üretilen *Acanthamoeba* spp.kistlerinin SF içinde hazırlanan preparatta 40x de görünümü(Endokistin daha belirginleşmesi için lam-lamel arasına metilen mavisi damlatılmıştır).....37
- Şekil 3.** Alt göz kapağı sürüntüsünden üretilen *Acanthamoeba* spp.trofozoitlerinin plak üzerinden 10x de görünümü.....38
- Şekil 4.** Alt göz kapağı sürüntüsünden üretilen *Acanthamoeba* spp.trofozoitlerinin SF içinde hazırlanan preparatta 40x de görünümü.....38
- Şekil 5.** Göz sürüntü örneğinden üretilmiş olan *Hartmannella* spp. nin trofozoit formunun SF içinde hazırlanan preparatta 40x deki görünümü.....39
- Şekil 6.** Göz sürüntü örneğinden üretilmiş olan *Hartmannella* spp. nin kist formunun NNA yüzeyinden 40x deki görünümü.....39
- Şekil 7.** NNA yüzeyinden SYAlerin kist ve trofozoitlerinin 10x de görünümü.....42
- Şekil 8.** Kan merkezinden alınan örnekte üreyen *Acanthamoeba* spp. kist görünümü, SF içinde hazırlanmış ve 40x de görüntülenmiştir.....42
- Şekil 9.** *Hartmannella* spp. (Çeşitli birimlerden üretilen *Hartmannella* spp.kistlerine örnek, SF içinde hazırlanan preparatta 40x.....43
- Şekil 10.** *Hartmannella* spp trofozoit . (Çeşitli birimlerden üretilen *Hartmannella* spp. kistlerine örnek, SF içinde hazırlanan preparatta 40x).....43
- Şekil 11.** *Acanthamoeba* spp. kist ve trofozoitleri, SF içinde hazırlanmış ve 40xde görüntülenmiştir.....44
- Şekil 12.** *Acanthamoeba* spp. kist görünümü, NNA yüzeyinden, 40xde görüntülenmiştir.....44
- Şekil 13.** *Naegleria* spp. kistleri (40x) (NNA yüzeyinden 40x de görüntülenmiştir)....45
- Şekil 14.** *Naegleria* spp. trofozoitleri, NNA yüzeyinden 40x büyütmede görüntülenmiştir.....45

**Şekil 15.** *Naegleria* spp. trofozoitleri , (SF içinde hazırlanmış preparatta 40x de görüntülenmiştir).....**46**

**Şekil 16.** Çeşitli su örneklerden üretilen ve SF içinde hazırlanan preparatlardan 40x de görüntülenen *Acanthamoeba* spp kist ve trofozoitlerinin görünümü.....**47**

## **SİMGELER DİZİNİ**

- °C** :Celcius  
**µm** :Mikrometre  
**ml** :Mililitre  
**%** :Yüzde

## **KISALTMALAR DİZİNİ**

- AK** : *Acanthamoeba* Keratiti  
**BOS** : Beyin Omurilik Sıvısı  
**GAE** : Granulomatöz Amebik Ensefalit  
**MSS** : Merkezi Sinir Sistemi  
**NNA** : Besleyici Değeri Olmayan Agar  
**PAME** : Primer Amebik Ensefalit  
**SYA** : Serbest Yaşayan Amip

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlarda hastalık oluşturan veya kommensal olarak yaşamını sürdüren amipler olduğu gibi doğada serbest olarak yaşayan ve insanlarda ciddi hastalıklar oluşturabilen bazı amiplerin de bulunduğu bilinmektedir[33,34]. Bu amipler, doğada, rutubetli ya da ıslak topraklarda, göllerde, yüzme havuzlarında, baraj göllerinde ve tatlı su birikintilerinde, çeşme sularında, kontakt lens solüsyonlarında, havada yaygın olarak bulunmakta[2,6,9,15,20,25,26,28,30,32,35,43,45-47],hava filtrelerinde dahi yaşamlarını sürdürmektedir [31,37,44]. Ancak serbest yaşayan amipler içinde *Acanthamoeba* türü diğer türlere göre çevresel ortamlarda daha fazla bulunmaktadır[30].

İnsanların doğa ile temasının artması, toprak, su ve havayı kendi yararları için daha fazla kullanmaya başlamaları doğada serbest yaşayan amiplerin insan vücuduna girme olasılığını arttırmakta ve serbest yaşayan amiplerin neden oldukları hastalıklar da gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır[33]. Ayrıca immun sistemleri baskılanmış kişilerde, AIDS hastalarında, kanserlilerde, organ transplantasyonu yapılanlarda, immun sistemi baskılayan ilaçların kullanılması durumunda, yetersiz beslenme ve devamlı stres altında kalma durumlarında, serbest yaşayan amiplerin insan vücuduna girerek patojen etki oluşturabilme ve hastalıklara neden olma riski artmaktadır[33,14].

Serbest yaşayan amip türleri, bazı patojen olan *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., ve *Proteus* sp., gibi mikroorganizmaları içlerinde taşıyarak insanlara bulaşmasında rol oynarlar[9,49]. Serbest yaşayan amipler doğal yada insanlar tarafından yapay olarak oluşturulan su ortamlarında *Legionella* türleri ile birlikte bulunmakta ve *Legionella* 'larla kontamine olmuş ortamlardan sıkça *Hartmannella*, *Acanthamoeba* ve *Naegleria* izole edilmektedir. Serbest yaşayan amipler *Legionella*'nın içlerinde çoğalması, taşınması ve virulansının evrimleşmesinde önemli rol oynarlar[22].

Özgür yaşayan amiplerden *Naegleria* cinsinin sadece bir türü (*Naegleria fowleri*), *Acanthamoeba* cinsinin ise birkaç türünün (*Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi* ve *A. polyphaga* gibi ) ve *Balamuthia* cinsinden de *Balamuthia mandrillaris* 'in hastalığa neden olduğu bilinmektedir[47]. Serbest yaşayan bu amip türlerinin hepsi bakteri, mantar ve diğer küçük partiküllerle beslenmektedirler[40]. Serbest yaşayan amiplerle oluşan enfeksiyonlar Avrupa, Amerika, Avustralya, Afrika ve Asya'dan rapor edilmiştir[21].

Bu küçük, özgür yaşayan amiplerin insanlar için patojen olabileceği fikri ilk kez, yeni bir virüs düşüncesi ile doku kültürü ortamından *Acanthamoeba* sp. izole eden Culbertson ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür[47]. Serbest yaşayan amiplerden *Acanthamoeba* spp. çoğunlukla immün baskın bireylerde ve kronik hastalığı olanlarda granümatöz amibik ensefalite (GAE) neden olduğu bilinmektedir[20,28]. GAE'nin başlangıcı sinsidir ve genellikle kronik seyreder, bir haftadan daha fazla hatta bazen aylarca sürebilir. Bu parazitozda baş ağrısı, baş dönmesi, uyuşukluk, nöbetler ve bazen tek taraflı felç görülebilir[47]. Ayrıca bu amip cinsi insanlarda *Acanthamoeba keratiti* olarak bilinen ağrılı ve görmeyi engelleyen kornea hastalığına neden olduğu bilinmektedir. Eğer enfeksiyon hemen tedavi edilmezse kornea tahribatına, görme kaybına ve neticede körlüğe ve gözün çıkarılmasına yol açmaktadır[3,8]. *Acanthamoeba keratiti*, suyla bulaşan hastalıklarda *Acanthamoeba* spp.'nin neden olduğu, göl yada havuzlarda kontakt lens kullanarak yüzme sonrası oluşan yada steril olmayan, evde hazırlanmış kontakt lens solüsyonları vasıtasıyla bulaşan bir göz hastalığıdır[5,28].

Serbest yaşayan amiplerden *Naegleria fowleri* ise primer amibik meningoensefalit (PAME ) oluşturmaktadır[9,20,33]. PAME genellikle belirtiler başlamadan 7–10 gün önce tatlı sularla temas etmiş sağlıklı çocuklar ve genç erişkinlerde birdenbire başlayan akut bir hastalıktır. Hastalık şiddetli baş ağrısı, ateş, boyun sertliği yapmakta ve ölüme neden olmaktadır[33]. *Naegleria* türlerinde kist ve trofozoit formları yanında bu amipleri diğer türlerden ayıran kamçılı formu da bulunmaktadır[47]. Üstelik PAME (*Naegleria fowleri*) ve GAE (*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* ve *Sappinia diploidea*) kronik sinüzitlerde, gırtlak iltihabı olanlarda, karaciğer değişimlerinde, kalp, kornea, cilt, dalak değişimlerinde serbest yaşayan amiplerce oluşturulmaktadır[21].

Bu çalışmada, insanda hastalık oluşturabilen yada potansiyel patojen olabilen serbest yaşayan amiplerin, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göz Polikliniğine çeşitli nedenlerle başvuran kişilerde, aynı hastanenin çeşitli birimlerinde bulunan klima sistemlerinde ve şehirdeki bazı su örneklerinde(musluk, kaynak v.b.) varlığının araştırması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Serbest yaşayan amipler(SYA) içinde yer alan *Acanthamoeba* spp. ölümcül merkezi sinir sistemi hastalıklarından biri olan GAE'ye ve ağrılı bir göz hastalığı olan amipli keratite neden olmaktadır[14]. *Acanthamoeba* spp. AIDS hastalarının ve diğer immün yetmezliği olan bireylerin deri lezyonlarında, sinüslerinde görülebilir [7,33,47,49].

*Acanthamoeba*'nın 1958 yılında çocuk felci aşısı denemeleri esnasında insana bulaştığı ileri sürüldü. Aşı hazırlanması esnasında kullanılan hücre kültürleri içinde belirtileri görülmüş ve bunların virüs olabileceği tahmininde bulunulmuştur. Çünkü fare ve maymunlara kültür sıvıları enjekte edildikten kısa bir süre sonra ensefalitten ölmüşlerdir[14]. Daha sonra bu plaklarda yapılan incelemelerde kültür sıvısı içinde amip trofozoiti ve kistlerinin olduğu ortaya çıkarılmış ve bunların *Acanthamoeba* türlerine ait olduğu bildirilmiştir. Deney hayvanlarında yapılan gözlemler Culbertson'da serbest yaşayan amiplerin insanda da ensefalit ve buna benzer hastalıklara yola açabileceği fikrini oluşturmuştur[14]. Daha sonraları, insanlarda *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu ensefalitli olgular Avustralya, Avrupa, Afrika ve Güney Amerika'da rapor edilmiş olup [15,23,35,45] bu olguların bazıları PAME olarak kaydedilmiştir. Ölümcül bir merkezi sinir sistemi hastalığı olan PAME, *Naegleria fowleri* tarafından oluşturulmaktadır[13,33]. Sonuç olarak farklı amip türlerinden *Acanthamoeba* türlerinin merkezi sinir sistemi hastalıklarından GAE'ye neden olduğu, *Naegleria fowleri* türünün ise PAME'ye neden olduğu saptanmıştır.

*Naegleria* ve *Acanthamoeba* türleri hem patojenik bir parazit hem de serbest yaşayan bir amip olarak amphizoik organizma özelliğine sahiptirler[14]. Son zamanlarda insanda Merkezi Sinir Sistemi enfeksiyonlarına neden olan *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia diploidea* adı verilen iki serbest yaşayan amip türü daha bildirilmiştir[17,19]. *Balamuthia mandrillaris*'in hem sağlıklı bireylerde hem de immün yetmezliği olan bireylerde ölümcül amibik ensefalite neden olduğu rapor edilmiştir[17]. *Sappinia diploidea* türünün ise topraktan bulaşan bir serbest yaşayan amip türü olduğu, sağlıklı bireylerde burun mukozasında enfeksiyona neden olabileceği ve buna bağlı olarak ölümcül olmayan ensefalite neden olduğu rapor edilmiştir[19].



Bu durum gün geçtikçe insanlarda hastalığa sebep olan serbest yaşayan amip türlerinin sayılarında bir artışın olduğuna kanıt teşkil etmektedir.

## 2.1. Sınıflandırma

*Acanthamoeba* ilk kez, *Cryptococcus pararoseus* kültürü içinde Castellani tarafından tanınlandı[14,24,35].Fakat organizmanın bu genus içindeki gerçek sınıflandırması gözlem ve araştırmalar sonucunda şimdiki halini almıştır[14,35]. *Acanthamoeba* spp., Acanthamoebidae familyası içinde yer alır ve bu familya içinde yer alan diğer bir genus ise *Balamuthia mandrillaris*'tir[14]. 16S rRNA'larının moleküler analizleri sonrasında *Balamuthia* genusu Acanthamoebidae familyasına Leptomyxidae familyasından transfer edilmiştir[17]. Ayrıca hem *Acanthamoeba* hem de *Balamuthia* türlerinin her ikisinin de merkezlerinde çift mikrotübül bulunmakta ve her ikisi de insanda hastalıklara neden olmaktadır[14,17].

*Acanthamoeba*'nın, Acanthopodia genusu içinde sınıflandırılmasında trofozoitlerinin yapısında Acanthapod adı verilen dikensi yapıların yer alması doğrudan ilgili olup, bu yapılar morfolojik olarak sınıflandırmada kriter olarak kullanılmaktadır. *Acanthamoeba*'nın tür düzeyinde sınıflandırılması zordur. *Acanthamoeba*'lar morfolojik olarak kistlerinin büyüklüğü ve şekli bakımından 3 grup olarak bulunurlar[2,3,33]. Birinci gruptaki türlerin kistleri diğer türdekilere göre daha büyüktür. İkinci gruptaki türlerin ekzokistleri buruşuk bir yapıda olup, endokistleri poligonal, triangular ya da ovaldir. Üçüncü gruptaki türlerin kistleri ince, düz, ekzokist yapısı gösterir ve endokistleri yuvarlaktır. *Acanthamoeba*'nın kist şekilleri devamlı sabit kalmayıp, kültür şartlarında sürekli değişim göstermektedir[14]. *Acanthamoeba*'nın farklı türlerinin sınıflandırılmasında kimyasal, immunolojik ve fizyolojik kriterlere başvurulur[4,14,22,31]. Bununla beraber *Acanthamoeba* türlerinin birçoğu antijenik özelliğe sahiptir. Bu yüzden Western Bloth ve immunofloresan gibi immunolojik yaklaşımlar türlerin sınıflandırılmasında yetersiz kalmaktadır. İzoenzim elektroforezi ile farklı enzim sistemlerine sahip *Acanthamoeba* türleri birbiriyle karşılaştırılabilmekte ve böylelikle arasındaki akrabalık dereceleri ortaya çıkarılmaktadır[14]. İzoenzim elektroforez yöntemi farklı türler arasındaki benzerlikleri ortaya çıkarmasına rağmen, çalışmalar izole edilen enzimler farklı laboratuvar şartlarında değişiklik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır[14].

*Acanthamoeba* türlerinin sınıflandırılmasında kullanılan moleküler analiz yöntemlerinde gelişmeler olmuştur[45]. Daha sonraları moleküler analizlerde RFLP adı verilen yöntem laboratuvarlarda kullanılmıştır[14].

### 2.1.1. *Acanthamoeba* cinsi

*Acanthamoeba* cinsi amipler ilk kez 1958 yılında doku kültürü kontaminasyonuna neden olan etken araştırılırken izole edilmiştir. Araştırma aşamasında kültürler fare ve maymunlara inoküle edilmiş, infeksiyon sonucu ölen hayvanların dokularından izole edilen bu amip 1975 yılında *Acanthamoeba* cinsi içine alınmıştır[14].

*Acanthamoeba*'lar çoğunlukla durgun tatlı sularda nemli topraklarda, yüzme havuzlarında, nehir ve göllerde bulunurlar. Bunun yanında ev atıkları ile kirlenmiş sularda, kaplıcalarda, klorlanmış şehir şebeke sularında, havalandırma sistemlerinde, diş tedavi aletlerinde, gastrik gavaj tüplerinde, diyaliz ünitelerinde ve kontakt lens solüsyonlarında da bulunmuşlardır. Bu amibin kistleri klora diğer dezenfektanlara kıyasla daha dirençlidir[14,22,48].

*Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsünde trofozoit ve kist dönemleri vardır.

**Trofozoit:** Trofozoit lopopod ve acantapod denilen dikensi yalancı ayaklara sahiptir. Hareket genellikle yavaştır. Trofozoitlerin ortalama çapı 30 µm kadardır. Çekirdek canlı trofozoitte de görülebilen büyük bir karyozuma sahiptir; sitoplazma granüllü ve vakuollüdür. Vücuttaki fazla suyun dışarı atılmasını sağlayan kontraktıl vakuol canlı trofozoitte belirgindir. Bu cins trofozoit şeklinde, eşeysiz olarak, ikiye bölünmeyle çoğalır; bölünme mitozladır[1,2,14,33].

**Kist:** 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 sağlar[33].

### 2.1.2. İzolasyon ve Türler

*Acanthamoeba* türleri GAE ve keratit olgularından soyutlanabildiği gibi çevreden de soyutlanmıştır. Örneğin *A. culbertsoni* ve *A. rhyodes* Nijerya'da havadan izole edilmiştir. Almanya'da *A. castellanii* ve *A. polyphaga* dış ünitelerinden, İspanya ve Amerika'da *A. harchetti* ve *A. polyphaga* okyanustan, Çekoslovakya, Fransa, Almanya, Meksika gibi çeşitli ülkelerde, yüzme havuzlarından soyutlanmıştır. Yurdumuzda ise kar altından alınan toprak örneğinden, kuru toprak örneğinden ve sıcak kaplıca suyunun oluşturduğu dere suyundan bu amipler izole edilmiştir[1,2,14,20,21,28,33].

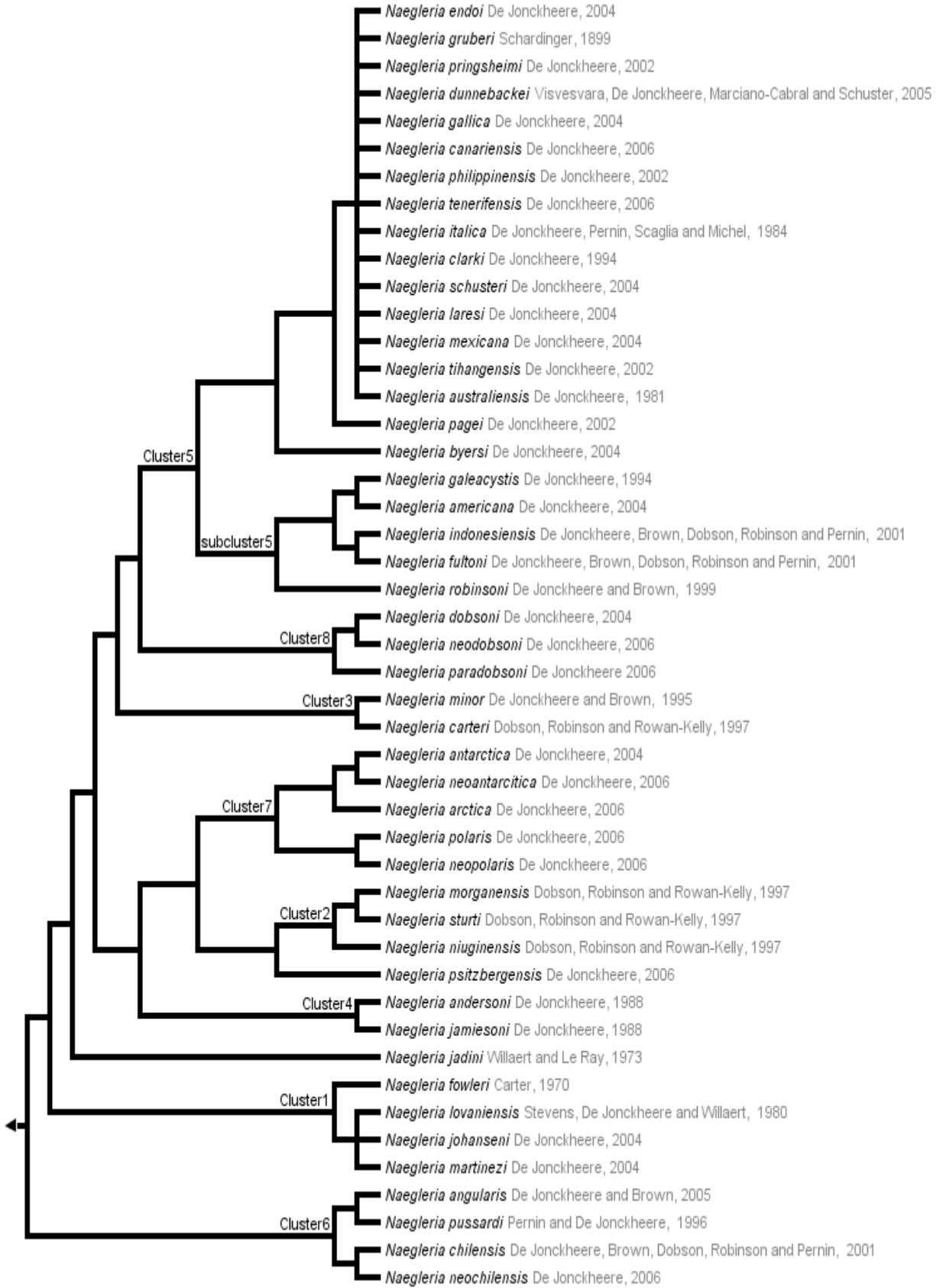
### 2.2. *Naegleria cinsi*

*Naegleria* türleri durgun tatlı sular, göl, nehir ve yüzme havuzlarında bulunur. Aerob olan bu cins amipler 22<sup>0</sup>C nin üzerindeki sıcaklığı severler; termal sularda da bulunabilirler.*Naegleria*'nın yaşam döngüsünde trofozoit ve kist dönemleri vardır. Trofozoit döneminde ise ameboid ve kamçılı olmak üzere morfolojik yönden farklı iki dönem bulunmaktadır[13].

**Amibimsi trofozoit:** 7-20 µm büyüklüğünde olup lopopod tipinde pseudopodlarla hareket eder. Atıcı (kontraktil) vaküol (bazen birden fazla olabilir) belirgindir. Tek çekirdeklidir. Canlı trofozoitte çekirdek, endoplazma ve ektoplazma ayırt edilebilir. Boyalı preparatlarda çekirdeğin büyük bir karyozoma sahip olduğu ama genellikle çekirdek zarının periferinde kromatin olmadığı dikkati çeker; sitoplazma tanelidir. *Naegleria* türleri amipsi trofozoit şeklinde, eşeysiz olarak, ikiye bölünmeyle çoğalır; bölünme promitozladır[13].

**Kamçılı trofozoit:** Amipsi şeklinde bulunduğu kültürlerde damıtık su veya besleyici değeri olmayan tampon eklenirse bir-iki saat içinde veya 20 saat gibi uzayan bir süre sonunda trofozoitler kamçılı şekle dönüşürler. Bu şeklin armut gibi uzamış olan küt ucundan iki, nadir olarak da dört kamçı çıkar. Arka uçta bir kontraktil vaküol bulunur. Çekirdek kesecik şeklinde ve tektir; çekirdekçik büyüktür. *Naegleria* türleri kamçılı trofozoit şeklinde çoğalmazlar.

**Kist:** *Naegleria*'nın kist şekli yuvarlaktır ve 7-10 µm çapındadır; kist çeperi düzdür. Trofozoitinkine benzeyen bir çekirdeği vardır; kist çeperi çifttir ve dış çeper iç çeperden daha incedir[13].Günümüze kadar yapılan çalışmalarla saptanmış olan *Naegleria* türlerinin hepsi Şekil 1 de soy ağacı şemasında küme ve alt kümeleriyle birlikte gösterilmiştir.



Şekil 1. *Naegleria* türlerinin gruplarının soy ağacı görünümü[51].

### 2.2.1. İzolasyon ve Türler

*Naegleria* türleri, klorlanmış yüzme havuzlarından, göllerden, termal sulardan, evde kullanılan sulardan, topraktan, havadan, ısıtma sistemlerinden, hücre kültürlerinden ve insan burun ve boğaz boşluklarından izole edilmiştir[11,13,47,48]. İnsan olgularından *Naegleria fowleri*'nin izole edilmesinden sonra, bu amiplerin çevreden soyutlanmasına çalışılmış elde edilen amiplerin cins ve türleri saptandıktan sonra da fareler üzerinde patojeniteleri araştırılmıştır. İnsan olgularından ve çevre materyalinden izole edilen *Naegleria* türleri şunlardır: *Naegleria fowleri*, bu tür çeşitli ülkelerde, farklı çevrelerden izole edilmiştir. *N. fowleri* Nijerya'da havadan, Belçika'da kanal, fabrika, balık çiftliğinden, İspanya'da nehirden, Yeni Zelanda'da toprak ve termal sulardan ve Avustralya'da topraktan, izole edilmiştir.

*N. gruberi*, *N. andersoni*, *N. jadini*, *N. lovaniensis* çeşitli çevrelerden izole edilmişler, fakat bu türlerin patojen etkileri bugüne kadar gösterilememiştir[11,13,47,48]. *N. australiensis* ise çeşitli ülkelerde birçok çevre materyalinden izole edilmiştir. Bu türün fareler için patojen olduğu bildirildiğinde, insan için potansiyel bir patojen olabileceği ileri sürülmüştür[13]. *Naegleria* türleri, rDNA sekansları temelinde 47 farklı tür içermektedir(Şekil). Türlerin tanımlanmasında 5.8S rDNA oldukça faydalıdır. Genus 8 farklı kümeye bölünerek tanımlanmıştır. PAM'a neden olan *N. fowleri* ılık yüzme havuzlarında rastlanan bir tür olup 45<sup>0</sup>C'nin üzerinde de üreyebilir. Bu özellik *N. lovaniensis*'de de bulunmaktadır. *Naegleria* türlerinin çoğu iki kamçılı trofozoit formuna dönüşebilir[51].

### 2.3. *Balamuthia cinsi*

Son yıllarda patojen serbest yaşayan amipler arasına katılan *B. mandrillaris*'in yaşam döngüsünde de kist ve trofozoit şekilleri vardır.

**Trofozoit:** Trofozoitler 12-60 µm büyüklüğünde olup geyik boynuzu şeklinde, düzensiz dallanmalar gösteren yalancı ayaklara sahiptir. Merkezi yerleşmiş karyozumu bulunan tek çekirdeğe (nadiren iki) sahiptir[14,17].

**Kist:** Kistler 6-30 µm çapında ve çift duvarlıdır. İç kist duvarı ince ve küresel, dış kist duvarı ise kalın, kıvrımlı veya buruşuk yani düzensizdir, genelde *Acanthamoeba* kistlerine benzer. Kist merkezi karyozumlu tek çekirdeğe sahiptir[14,17].

### 2.4. Tarihçe ve Sistematik

Serbest yaşayan amipler 1930'lu yıllardan itibaren çeşitli örneklerin ekildiği kültürlerde kontaminasyon etkeni olarak dikkati çekmişlerdir. Hatta bazı çalışmalarda yeni bir virüs olarak değerlendirilmiş ve bu yönde yoğun çalışmalar yapılmıştır. 1958 yılından başlayarak Culbertson ve arkadaşları, yaptıkları araştırmalarda bu amiplerin deney hayvanlarından fare ve maymunda, intranasal ve intraserebral yoldan verdiklerinde infeksiyona sebep olabileceklerini göstermişlerdir. Fowler ve Carter 1965 yılında Avustralya'dan ölümle sonuçlanan dört olgu bildirmişlerdir. Bunu Amerika, Çekoslovakya, İngiltere, Yeni Zellanda ve Belçika'dan bildirilen diğer olgular izlemiştir. Protozoonların sınıflandırılmasında bu gün için tam bir görüş birliğine varılmamıştır. Son kaynaklara dayanılarak serbest yaşayan amiplerin sistematığı aşağıda verilmiştir[14].

**Üst Şube (Superphylum):** Protozoa-Goldfuss, 1818;emd.von Siebold, 1846

**Şube (Phylum):** Sarcostigophora-Honigberg and Balamuth, 1963

**Alt Şube (Subphylum):** Sarcodina-Schmarda, 1871

**Üst Sınıf (Superclass):** Rhizopoda-von Siebold, 1845

**Sınıf (Class):** Lobosea-Carpender,1861

**Alt Sınıf (Subclass):**Gymnamoebida-Haeckel, 1862

**Takım (Order):** Amoebida-Kent, 1880

**Alt Takım (Suborder):** Tubulina-Bovee ve Jahn, 1966

**Aile (Family):** Entamoebidae-Chatton, 1925

**Cins (Genus) :** *Entamoeba*-Casagrandi ve Barbagallo, 1895

**Aile (Family):** Hartmannellidae-Volkonsky, 1931;emd.Page,197

**Cins (Genus):** *Hartmannellidae*-Alexeieff,1912;emd.Page, 1974

**Alt Takım (Suborder):** Acanthapodina-Page, 1976

**Aile (Family):** Acanthamoebidae-Sawyer ve Griffin, 1975

**Cins (Genus):** *Acanthamoeba*-Volkonsky, 1931 ;emd. Page, 1967

**Takım (Order) :** Schizopyrenida-Singh, 1952

**Aile (Family) :** Valkampfidae-Jollos, 1917;Zulueta 1917

**Cins (Genus) :** *Naegleria*-Alexieff, 1912; emd. Calkins, 1913

**Sınıf (Class):** Acarpomyxea-Page,1976

**Takım (Order) :** Leptomyxida-Pussard, 1975

**Aile (Family) :** Leptomyxidae-Goodey, 1915

**Cins (Genus) :** *Balamuthia*

## 2.5. Ekoloji ve Dağılımı

*Acanthamoeba* spp. protozoa içinde çevrede en çok bulunan türdür. Dünyada geniş bir yayılıma sahiptir. Toprakta, içme sularında, havalandırma sistemlerinde, yüzme havuzlarında, göz yıkama istasyonlarında, diyaliz ünitelerinde, bakteri bulaşımında, kontakt lenslerde ve memeli hücre kültürlerinden izole edilebilir[48]. *Acanthamoeba* spp. meyvelerden balık, kuş, amfibi ve memeli hayvanlardan izole edilebilir[14,31].Ayrıca sağlıklı insanların boğaz ve burun mukozalarından izole edildiği gibi [14] beyin ve akciğer dokusundan, immun yetmezliği olan hastalardan, *Acanthamoeba keratiti* olan hastaların korneal lezyonlarından izole edilebilir[26,48].

## 2.6. Hayat Döngüsü

*Acanthamoeba*'nın hayat 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 ile 40 µm büyüklüğünde olup, bakteri, alg ya da çevredeki diğer küçük mikroorganizmalar ile beslenirler. Akselik kültürlerde besinlerini pinositoz yoluyla sıvı şekilde alırlar[14].



Trofozoit formları, acanthapod adı verilen yalancı ayaklarını çıkararak ve yiyecek cebi oluşturarak fagositoz yoluyla besinlerini alırlar. Bakteri, mantar ve diğer küçük mikroorganizmaları fagositoz yoluyla sindirirler[14,22,33].

## 2.7. Morfolojisi

*Acanthamoeba*'nın hücresel yapısı elektron mikroskobu kullanılarak detaylı bir şekilde çalışılmıştır[24]. Ökaryotik hücre organellerinin bulunması, *Acanthamoeba*'nın sınıflandırılmasına katkıda bulunmuştur. *Acanthamoeba* trofozoitlerinin yapısında golgi aygıtını, mitokondrileri, düz ve yuvarlak yapılı endoplazmik retikulumu, ribozomları, mikrotübülleri göstermişlerdir[14].*Acanthamoeba* trofozoitlerinin sitoplazmik yapısında üç tabakalı plazma membranı bulunmaktadır. Buna ek olarak trofozoit yapısında, diken şeklinde acanthapod 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 nukleus içinde büyük bir merkezi nukleolus ayırt edilmektedir. Genellikle amipler tek çekirdekli olmasına karşın kültürlerinde iki çekirdekli yapıları da ortaya çıkmaktadır[33].

Çift tabakalı düz olmayan kist yapısı 13 ve 20 µm büyüklüğünde, endokist ve ekzokistten oluşur. Bu büyüklük türden türe değişiklik göstermektedir[2,33]. Sıcaklık ve pH değişimleri, besin yokluğu gibi çevresel şartların değişimi durumunda *Acanthamoeba* trofozoitleri kist yapısına dönüşürler. Kistler biyositlere (Bakteri öldüren kimyasalara), klorlama ve antibiyotiklere karşı dirençlidirler[45]. Ancak düşük sıcaklıklarda (0 ile 2 °C de) canlı kalabilirler. Bununla beraber, kistlerin Freon yada metilen oksitte parçalandığı gösterilmiştir. Uygun çevre şartları altında kistlerden eksistasyonla trofozoitler oluşur. Amip kistlerinin +4 °C deki sularda yaklaşık 24 yıl canlı kalabildiğini gösterilmiştir[14]. Trofozoit formlar, amibin patojenitesini test etmek amacıyla, deney farelerine intranazal yoldan inoküle edilmiştir. Eski izolatların virüslansının yenilere göre daha az olduğu saptanmıştır[7]. Virüslans etkisinin pasajlarla azaldığı gösterilmesine rağmen amipler fareler üzerindeki patojenik etkisini devam ettirmiştir.

## 2.8. *Acanthamoeba*'nın kültürü

*Acanthamoeba* bakterisi destekli olan nonnutritif agar (NNA) adı verilen, besleyici değeri olmayan besiyerlerinde üretilmektedir. % 1,5'lük agar ile hazırlanan NNA üzerine amip için besin olarak *E. coli* sürüldükten sonra *Acanthamoeba* içeren materyalin ekimi yapılır. *Acanthamoeba* % 2'lik proteaz peptonu, 0,2'lik yeast extract ve 0,1 M glukoz içeren aksenik bir ortama sahip olan PYG içinde de üretilir. Ayrıca serum ve hem içeren OXOİD besiyerinde de üretilirler. *Acanthamoeba* memeli hücresi içeren VERO hücre kültürlerinde, insan karaciğer embriyosunda (HEL), İnsan böbrek embriyosunda da üretilmektedir [1,2,14,33].

## 2.9. Fırsatçı patojen olarak *Acanthamoeba* spp.

### 2.9.1. GAE

GAE, akciğer yoluyla merkezi sinir sistemine bulaşan ve yavaş ilerleyerek kronikleşen bir hastalıktır. Serolojik tanı laboratuvarlarında *Acanthamoeba* türlerinin birçoğunun GAE'ye neden olduğu gösterilmiştir. GAE genellikle malignensilerde, systemic lupus erythematosus, diabetes, deri ülserleri, renal yetmezlik, siroz, tuberculosis, HIV ya da Hodgkin's hastalığına yakalanmış kişilerde oluşma sıklığı daha fazladır[7,24,35]. GAE'ye sebep olan faktörler arasında alkolizm, ilaçların kötü kullanımı, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi, radyoterapi ve organ nakilleri sayılabilir[7,14,35]. *Acanthamoeba*'nın sebep olduğu GAE sağlam genç bireylerde ve çocuklarda da görülebilmektedir[14].

GAE de bulaşma, cilt lezyonları vasıtasıyla, akciğer yoluyla ya da amibin burun yoluyla girmesi ile nefes alma esnasında inhalasyon sonucu gerçekleşmektedir. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonunun semptomları arasında baş ağrısı, kusma, ateş, huzursuzluk, mide bulantısı, fokal nörolojik yetmezlik, boyun sertliği ya da artan intrakranial basınç gösterilmektedir. Patolojik bulguları arasında hemorajik nekroz ve inflamasyon bulunmaktadır[33].

İmmünyetmezliği olan bireylerin böbrek, karaciğer ve trake gibi diğer organlarında da amibe rastlanabilir.

### 2.9.2. AIDS'li hastalarda *Acanthamoeba* enfeksiyonu

AIDS'li hastalarda ilk kez 1986 yılında *Acanthamoeba* enfeksiyonu rapor edilmiştir. Bu tarihten itibaren AIDS'li bireylerde rapor edilen *Acanthamoeba* enfeksiyonunun sayısı gün geçtikçe büyük bir artış göstermiştir. Bu teşhislerin bir çoğu hastanın enfeksiyondan ölümünden sonra yapılan raporlamalardır. Bireyin savunma mekanizmasının zayıflaması sonucunda ilk enfeksiyon bölgesindeki *Acanthamoeba* varlığının diğer doku ve organlara yayıldığı varsayılmaktadır. İmmün baskın olan bireylerde granulomatöz reaksiyonun gelişimi iyi olmayabilir. CD4 T hücrelerinin sayısının düşük olduğu (200 mm<sup>3</sup>'den daha az ) HIV'li hastalarda *Acanthamoeba* enfeksiyonunun daha hızlı ilerlediği gösterilmiştir. Böyle hastalarda ölüm de gözlenmiştir. Nörolojik semptomların başlamasından sonra bir aydan daha az bir süre içinde birçok hastanın öldüğü saptanmıştır.

HIV pozitif hastalarda *Acanthamoeba*'nın diğer yaygın belirtileri arasında kronik sinüzit, otit, *Acanthamoeba*'nın yerleştiği bölgelerde cilt ülserleri, sinüs lezyonları ve kutanöz lezyonları saptanmıştır. Cilt lezyonları *Acanthamoeba* enfeksiyonunun ilk başlangıç noktasını oluşturmasına karşılık, enfeksiyon burun yoluyla da vücuda giriş yapabilmektedir[7,14,47,49].

### 2.9.3. Kutanöz *Acanthamebiasis*

*Acanthamoeba*'nın neden olduğu kutanöz *Acanthamebiasis* hastalığına AIDS'li hastalarda ve merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumlu hastalarda rastlanmaktadır. Kutanöz *Acanthamebiasis* 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 karakterize edilir.

*Acanthamebiasis*'in kutanöz formunun erken belirtilerinde irinli papulonodüller ve gittikçe ilerleyerek artan ülserasyonlar vardır. *Acanthamoeba* enfeksiyonlarında cilt lezyonlarının yayılma gösterdiği gösterilmiştir. MSS ile ilişkisi olmayan solunum sistemi, sinüsler ve MSS'inde olduğu gibi *Acanthamoeba* enfeksiyonunun cilt lezyonlarında da ilk noktasını oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir[14].

MSS ile ilişkili olmayan bireylerde Kutanöz *Acanthamebiasis* hastalığının mortalitesinin oranı (ölüm oranı) % 73 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca MSS tutulumlu hastalarda Kutanöz *Acanthamebiasis* mortalitesinin %100 olduğu rapor edilmiştir. Kutanöz lezyonların histolojik çalışmalarında, ölmüş doku hücreleri etrafında, damar iltihaplarında *Acanthamoeba*'nın kist ve trofozoit formları gösterilmiştir. Bununla beraber cilt lezyonlarının histolojik görünümü, mantar, virüs ve mikobakterilere benzer şekilde olabilir[14].

#### **2.9.4. Fırsatçı patojen *Acanthamoeba* ssp. ve amibik keratiti**

*Acanthamoeba* türlerinin (*A.castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A.quina* ve *A. lugdunensis*) *Acanthamoeba* keratitine (AK) sebep olduğu rapor edilmiştir[8,12,16,25,26,29,38,39]. Amibik keratit immun yeterli bireylerde de görülür[16].

1980'li yılların ortasında kontakt lenslerin kullanılmasının artmasıyla birlikte *Acanthamoeba* epidemisinde bir artış gözlenmiştir. *Acanthamoeba*, lens kutuları ve lens temizleme solüsyonlarından üretilmiştir[10,12]. AK için kontakt lens takanların ilk risk oluşturan gruplar olduğu bilinmektedir [1,10,39]. AK'nin semptomları arasında gözde kızarma, gözün yaşarması, fotofobi, göz kapağı ödemleri sayılabilir. AK'nin histopatolojik tanımı farklıdır. Başlangıçta AK enfeksiyonunun kornea epiteli ile sınırlı olduğu hastalığın ilerlemesi ile de enfeksiyonun stromaya yayıldığı, stromada büyük zarara sebep olduğu ve önemli görme hasarlarına yol açtığı tespit edilmiştir[1,3].

AK'nin en önemli karakteristik klinik özelliği bir halkaya benzeyen stromal sızıntı ve nötrofillere benzeyen iltihaplı hücrelerin bölgeye gelmesidir. Klinik açıdan konjunktival hiperemi, kornea iltihabı ve skleritis oluşur. Trofozoitler kornea sinirlerini istila edebilir ve nekroza sebep olabilir[3,14]. Ayrıca *Acanthamoeba* korneadan retinaya yayılabilir ve chorioretinitise sebep olabilir. İlaç tedavisine cevap vermeyen olgularda, cerrahi müdahale ile tümörün ya da enfekte bölgenin gözden uzaklaştırılması gerekmektedir[14].

*Acanthamoeba* keratitinin tedavisi ve teşhisi oldukça zordur. AK, fungal keratit, *herpes simplex* keratiti ile karıştırılabilmektedir[3]. *Acanthamoeba* keratitinin tanısını, ikincil bakteriyel enfeksiyonlar zorlaştırmaktadır. Antibakteriyal, antiviral ya da kortikosteroid tedaviler, AK tanısını güçleştirmektedir. Doku içerisindeki amip kist formları birçok ilaca karşı dirençli olduğundan kistlerin erken tanısının ve uygun tanı yönteminin kullanılmasının erken tedavi açısından önemli olduğu bildirilmektedir. Kontakt lens kutuları ya da kontakt lenslerin temizleme solüsyonları AK için önemli bir kaynaktır. Kontakt lens ve lens solüsyonlarının dezenfeksiyonu için % 3'lük hidrojen peroksit kullanılır. Çünkü hidrojen peroksit *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerine karşı aktif bir rol oynamaktadır[14]. Amip aktiviteleri için hazır ticari kontakt lens solüsyonları değerlendirilmiş ve hidrojen peroksitin 8 saat sonra ıslak lens ya da lens kutuları üzerinde dezenfektan görevi gördüğü yapılan deneylerle gösterilmiştir. 1:2'lik dilüsyon ile hazırlanan % 3'lük hidrojen peroksitin 9 saat sonra *A. castellanii* kistlerini öldürdüğü açıklanmıştır. Amip aktivitesini önlemek için % 0,6 yerine % 3'lük hidrojen peroksit içeren dezenfektanların kullanılmasını önerilmiştir. 3 aşamalı seanslar sonrasında mikrodalga ışınlarının da *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerini yok ettiği rapor edilmiştir. Keratit riskini azaltmak için tek kullanımlık disposable kontakt lenslerin kullanılması da önerilmektedir[14].

## **2.10. *Acanthamoeba* enfeksiyonunun tanısı**

### **2.10.1. GAE**

MSS semptomları içeren hastalarda *Acanthamoeba*'nın tanısında, MSS sedimantlarının boyanarak direkt mikroskopisi yapılabilir[36]. Ayrıca GAE'nin tanısında BOS'un değerlendirilmesi önemlidir. Ancak lomber ponksiyonunun kontrendike olması kafa içi basıncı artırabilir. Trofozoitlerin parçalanmaması için BOS içeren materyalin düşük hızda santrifüj (250xg) edilmesi gereklidir. BOS materyalinden hazırlanan preperatta trofozoitlere rastlanabilir, fakat ilk aşamada trofozoitler tanınmayabilir. Çünkü trofozoitler savunma mekanizmasında rol oynayan makrofajlar ile karıştırılabirler. BOS içeren materyal lama sürülür daha sonra metanol ile muamele edilir. Bu işlemden sonrada Giemsa-Wright ile boyanır.

Serebrospinal sıvıda lenfositlerin artması, lökositlerin çok sayıda çekirdeğe sahip olması, düşük glukoz düzeyi ile yüksek protein düzeyi GAE'de olağan durumlardır. Solunum sistemi hastalarında ya da GAE'li hastalarda amibin ortaya çıkarılmasında bronkoalveoler lavajdan hazırlanan preparat incelenebilir[14]. Ayrıca *Acanthamoeba* trofozoitlerinin karakteristik özellikleri olan nükleolus, kontraktil vakoullar ile sitoplazmik yapılar trikoma, hematoksilen ya da eozin boyaları ile muamele edilen preparatlarda daha iyi bir şekilde gözlemlenebilir[2,3].

Ayrıca havada kurutma yöntemiyle hazırlanan preparatlar yerine cytocentrifugation yöntemiyle hazırlanan preparatlar *Acanthamoeba*'nın karakteristik özelliklerinin teşhisinde daha kullanışlı olmaktadır. Bazı hastalar üzerinde bilgisayarlı tomografi ve magnetik rezonans görüntüleme sistemleri uygulanabilir. Bu yöntemlerle birçok hastada artan ya da azalan lezyonlar kolaylıkla gösterilebilir. Bilgisayarlı tomografi ya da magnetik rezonans görüntüleme sistemiyle beyindeki tümörlü ya da abseli bölgeler ortaya çıkarılabilir[14].

*Acanthamoeba*'nın in vitro koşullarda üretilmesi laboratuvar tanısında kullanılmaktadır. BOS beyin dokusu, kutanöz yapıdan alınan materyal, sinüs lezyonlarından alınan materyal, NNA plaklarına *E.coli* ya da *Enterobacter aerogenes* amip için besin olarak ekilmek suretiyle ya da memeli hücre kültürü içeren plaklarına inoküle edilerek *Acanthamoeba*'nın üreyip üremediği gözlenir[33,42]. Besiyeri ortamında (plakta), bakteri ya da diğer hücre parçalarıyla beslenmiş olan amipler bir hafta sonra gözlemlenebilir. Bununla beraber BOS'dan ya da enfekte dokudan *Acanthamoeba*'nın izole edilmesi zordur. Çünkü amipler bu ortamda kist haline geçerler[2,3].

Buna ek olarak beyin bölgesinden ya da kutanöz lezyondan alınmış biopsi materyalinin hematoksilen ve eozinle muamele edilen preparatı dondurularak ya da parafine gömülerek histolojik teşhisi de yapılabilir[14]. Gram ve giemsa boyaları da hematoksilen ve eozin boyamadan farklı değildir. Bunlarda da makrofaj ya da diğer savunma hücreleri amip trofozoitinin nükleer yapısından ayırt edilebilir. *Acanthamoeba*'nın nükleer yapısı, karyozom ve çevresindeki 'Halo' diğer inflamasyon hücrelerine benzemeyen karakteristik bir yapıdadır. Bununla beraber, doku bölgeleri içindeki kistlerin teşhisinde kullanılan boyama yöntemlerinin birçoğu faydalı olmuştur. Periodik asid- schiff boyaması kist duvarını kırmızıya, gomori-methenamine silver

boyaması kisti siyaha boyar. Ek olarak calcoflour white boyaması beyin dokusundaki kistin teşhisinde kullanılmaktadır[33]. Hematoksilen ve eozin boyaları dokular içindeki fokal nekrozları, amip trofozoitlerini, lezyondaki kistleri, prevasküler alan ve kan damarları içine yayılmış kist ve trofozoitleri ortaya çıkarır[33]. Immunofluorescent ve immunoperoxidase boyamaları sonrasında parafine gömülmüş, enfekte dokudan alınmış materyalin elektron mikroskobu ile yapılan incelemesinde *Acanthamoeba*'nın teşhisi oldukça başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Immunofluorescent boyama doku bölgeleri içindeki amip türlerinin *Acanthamoeba*'nın hangi türüne ait olduğu konusunda da bilgi sağlamaktadır[14].

### 2.10.2. Amip keratitinin tanısı

*Acanthamoeba* enfeksiyonunun klinik açıdan erken tanısı oldukça önemlidir. Korneal ülser, antibiyotik tedavisine cevap vermiyorsa bunun AK olabilme ihtimali gözden kaçırılmamalıdır. Ayrıca *Acanthamoeba*'lı oküler enfeksiyonların teşhisi zordur. Çünkü bunlar mantar enfeksiyonları, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Herpes simplex* virüsüne benzeyebilir. Sonuç olarak tedaviye başlamadan önce tanı koymak açısından yapılan yaklaşımların kesinlik kazanması önemli ve anlamlıdır. *Acanthamoeba*'nın izole edilmesinde kullanılan kornea ve konjunktival sürüntüler genellikle uygun olmayabilir. Doku içindeki trofozoit ve kistlerin ortaya çıkarılması için kornea kazıntısı ya da kornea biopsisinden elde edilen örnekler kullanılmaktadır. Korneal kazıntı materyali NNA besiyeri içeren petri plaklarına *E. coli* sürülerek kültür yapılır. Bununla beraber korneal kazıntısında bakteri ya da mantar olabileceği için *Acanthamoeba*'nın tanısı zorlaşabili[14].

Kornea dokusundan yapılan kültür negatif olduğunda lens temizleme solüsyonlarından, lens kutularından ya da kontakt lenslerden de *Acanthamoeba* kültürü yapılabilir[12].Korneal kazıntıdan yapılan kültürün negatif sonuç vermesi durumunda korneal biopsiden tekrar kültür yapılması önerilir[12].Sitolojik teşhis için çeşitli boyama yöntemlerine başvurulur. İndirekt immunofluoresan-antikör yöntemi doku biopsileri içindeki ya da korneal kazıntıdaki amibin ortaya çıkarılmasında kullanılır[12,14]. Calcofluor white boyası ile amip kistin polissakkarit yapısının boyaması yapılır. Böylelikle kornea dokusu içindeki amip kistin teşhisi kolaylaşmış olur.

Ek olarak akridin orange boyası kornea kazıntısı ya da BOS materyalini sade bir şekilde boyadığından ve AK'nin histopatolojik teşhisinde hızlı ve güvenli bir yöntem olduğundan tavsiye edilmektedir[14].

Boyama yöntemlerinin çeşitliliğine ek olarak *Acanthamoeba*'nın ortaya çıkarılmasında PCR yöntemi olumlu faydalar sağlamaktadır. Boyama yöntemi ile belirlenemeyen spesifik türler PCR yöntemiyle belirlenebilmektedir[18]. *Acanthamoeba*'nın spesifik türlerinin ortaya çıkarılmasında kullanılan PCR yönteminin temelinde DNA'ya başvurulur ve DNA'dan elde edilen materyalin değişebilen bölgelerinden 26S rRNA klonlanır. PCR tekniği kullanılarak 10 hücreden daha az *Acanthamoeba* bulunduğu durumlarda bile tanı konulabilir. Çevresel örneklerden ya da AK'li hastalardan elde edilen örneklerden spesifik *Acanthamoeba* türlerinin ortaya çıkarılabilmesi için bir PCR primer çiftine ihtiyaç duyulur[14].

Çevresel ya da klinik örneklerde *Acanthamoeba*'nın teşhisinde çeşitli moleküler yöntemler kullanılır. Bu analizlerden biri olan RFLP metodunda 18S rRNA gen sekansının nükleer parçaları mitokondrial 16S rRNA'nın tamamı, analiz edilen DNA sekansının tamamı, 18S rRNA kodu içeren DNA fragmentleri kullanılır. Birçok araştırmacı *Acanthamoeba*'nın teşhisinde invaziv olmayan bir teknik olarak tandem scanning confocal mikroskobu kullandıklarını rapor etmiştir. Confocal mikroskoplar kornea bölgelerindeki trofozoit ve kistlerin bilgisayar ortamında yüksek çözünürlük seviyesinde görüntülenmesine olanak sağlamaktadır. Böylelikle doku içindeki *Acanthamoeba*'nın ortaya çıkarılmasında bu teknik hızlı bir sonuç vermektedir[14].

### **2.10.3. Kutanöz *Acanthamebiasis*'in tanısı**

Deriden alınan materyal, üzerine *E.coli* ya da *Enterobacter aerogenes* sürülmüş NNA ya da memeli hücre kültürüne ekilerek inkübasyonu yapılır ve inkübasyon sonrasında parazitin laboratuvar teşhisi için mikroskopta preparat incelemesi yapılır. Kutanöz lezyondan alınan biopsi materyalinde *Acanthamoeba*'nın histolojik tanısı için hematoksilin ve eozin ile periodik asid-schiff ya da calcoflour white boyaması kullanılır. Buna ek olarak DNA bazlı yapılan *Acanthamoeba* teşhisinde kullanılan moleküler yöntemlerde RFLP ve DNA analizi gibi yöntemlere başvurulur[14].



## 2.11. *Acanthamoeba* enfeksiyonunun immunolojisi ve patolojisi

*Acanthamoeba*'ya maruz kalmış ve semptomları fazla gelişmemiş sağlıklı bireylerin serum örneklerinde amibe karşı hazır bir antikor savunmasının olduğu açıklanmıştır[4,8]. Ancak çevredeki *Acanthamoeba* kist ve trofozoit prevalansının yüksek olmasına rağmen ölümcül enfeksiyonun ortaya çıkış oranı düşüktür. *Acanthamoeba* sağlıklı bireylerin burun boşluğundan izole edilmiştir[14,33]. *Acanthamoeba* sağlıklı bireylerde kısa süreli enfeksiyonlara sebep olsa da, bireyin savunma sistemleri tarafından enfeksiyon kontrol altına alınır. Sonunda da organizma yok edilir.

Rheumatoid arthrit (RA) hastalarında *A. polyphaga* enfeksiyonuna karşı oluşan IgM düzeyinin IgG düzeyinden daha yüksek olduğu ve RA hastalarında *A. polyphaga*'ya karşı oluşturulan yüksek titredeki IgM düzeyinin antijenik uyarımlar ile olduğu rapor edilmiştir. Bununla beraber RA hastalarında *A. polyphaga* antijenlerine karşı oluşan immun rekasiyondaki semptomlar bilinmemektedir. *Acanthamoeba* enfeksiyonunda doğal direnç mekanizması, istila eden organizmaya ve aktivitesine karşı ilk savunma mekanizmasını oluşturmaktadır[14]. Bununla beraber *Acanthamoeba* enfeksiyonuna karşı oluşturulan aktivasyon mekanizmasının sistemi bilinmemektedir. C3a ve C5a componentlerinin aktivitelerinin artmasıyla patojenite de bir artış olur. Gerçekte inflamasyon bölgesi ve dokuda zarara yol açan amip kalıntılarına karşı savunma oluşturarak enfeksiyonun elemine edilmesine yardım eder. Kompleman amibin enfeksiyon etkisine karşı hastayı koruyabilir. *A. culbertsoni* gibi yüksek patojen etkiye sahip *Acanthamoeba* türleri nonpatojen olan türlere göre kompleman lizisine karşı daha dirençlidirler. Komplemanın q1 parçasının *Acanthamoeba*'nın patojenik suşları ile olan etkileşimi gösterilmiştir. Bu bağlantı bloke edildiğinde bu yol çalışmamaktadır. Bu durumda kompleman lizisi durdurulabilir[14].

*Acanthamoeba* enfeksiyonunda antikor aktivitesi çözümsüz kalabilir. Amiplerin oluşumu esnasında nötrofillerin enfeksiyon bölgesinde toplandığı rapor edilmiştir. Ayrıca nötrofiller, TNF (tümör nekroz faktör) ile etkileşmezse *Acanthamoeba*'nın ortadan kaldırılması başarısız olur. In vitro olarak *Acanthamoeba*'nın ortadan kaldırılması için hem antikorlar hem de komplemana ihtiyaç vardır.

Laboratuvar ortamında deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmada *Acanthamoeba* ile enfekte edilen farede nötrofil, makrofaj ve vücut savunması ile ilgili diğer hücrelerin enfeksiyon bölgesine doğru göç ettiği gösterilmiştir. *Acanthamoeba*'ların yok edilmesinde makrofajlar nötrofillere göre daha önemli bir etkiye sahiptir. Bu hücreler *Acanthamoeba* kistleriyle kaplı dokular ile karşı karşıya geldiklerinde daha büyük hücre komponentleri oluştururlar[14].

Son zamanlarda beyinde sabit olarak bulunan ve amip aktivitelerine karşı harekete geçen mikroglia hücreleri gözlemlenerek rapor edilmiştir.Yeni doğmuş fare yavrularına enjekte edilen *A. castellanii* kist ve trofozoit yapılarını mikroglia hücrelerinin fagositik yöntem ile yok ettiği gösterilmiştir. Ayrıca *A. castellanii* ve *A. culbertsoni* kültürlerinde mikroglia hücrelerinin mRNA'yı IL-1alfa, IL-1 beta ve TNF üretimi için teşvik ettiği ispat edilmiştir[14].

### 2.12.1. Amibik keratitte immun sistemin rolü

Deney hayvanları ve hastalarda yapılan çalışmalarda *Acanthamoeba*'nın göz enfeksiyonlarında hücreyel savunma mekanizmasının vermiş olduğu yanıt hakkında yapılan araştırmalar sınırlıdır. Makrofajlar ve nötrofiller amip ve amip kistleri etrafında oluşan büyük inflamasyon hücreleridir. Kronik inflamasyonlu iki AK hastanın korneal alt tabakasında elektron mikroskobu kullanılarak yapılan çalışmalarda inflamasyona cevap oluşturan hücre tipleri immunohistokimyasal olarak isimlendirilmiştir[8].Ciddi bir korneal sızıntıya nötrofillerin verdiği cevap kanıt olmasına rağmen böyle hastalardaki enfeksiyon korneayı matlaştırmakta ve korneaya zarar vermektedir. *Acanthamoeba* antijenlerinin hücreyel immun cevabı baskıladığı, makrofajların işlevini ve lenfositlerin inflamasyon bölgesine toplanmasını önlediği gösterilmiştir[14].

*Acanthamoeba* keratitine maruz kalmış hastalarda *A. polyphaga* ve *A.castellanii* izole edildikten sonra Wistar sıçanları, domuz, fare ve chinesei hamsterları gibi hayvan modelleriyle trofozoit ve kistlere karşı oluşturulan immun cevap ile ilgili çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada *A. poyphaga*, Wistar sıçanlarının korneal stromasına inoküle edildiğinde nötrofil ve makrofajlar tarafından kuvvetli bir inflamator cevabın oluştugu gösterilmiştir[2,14].İnsan serumundaki antikorların *Acanthamoeba* keratiti üzerindeki etkisi ya da deney hayvanlarında oluşturulan enfeksiyondaki etkisi belirsizdir.

Western Blotting yöntemiyle serada çalışan 20 bireyde bir çalışma yapılmış ve 2 bireyde *Acanthamoeba* keratiti tesbit edilmiştir. *Acanthamoeba* keratiti tesbit edilen bu iki hastada *Acanthamoeba*'ya karşı immun reaksiyon gösteren IgG, IgM ve IgA çalışılmıştır[14]. Böylece patojenik *Acanthamoeba* izolatu ile nonpatojenik *Acanthamoeba* izolatu arasındaki immunolojik aktivite farklılıkları değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada bütün sera çalışanlarında pozitif anti-*Acanthamoeba* antikorları bulunmuştur. Patojenik suşlara göre, nonpatojenik suşlarda IgA aktivitesinin yüksek olduğu, patojenik ve nonpatojenik suşlarda IgA profilinin farklılık sağladığı öne sürülmüştür. Ayrıca sera çalışanlardan *Acanthamoeba* keratiti hastalarında zayıf immun reaksiyon geliştiği gösterilmiştir. Özet olarak oluşturulmuş bilgilerde kazanılmış ve doğal immun cevap sistemi *Acanthamoeba* keratitinde rol oynamaktadır. IgA korneal hücrelerde amip oluşumunu ve enfeksiyonunu önleyebilir. Buna ek olarak amip enfeksiyonlarında enfeksiyon bölgesine nötrofiller, makrofajlar göç ederek amibin yok edilmesinde etkili olur[14].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sivas il merkezinde 2011 Kasım ayında çevreden alınan 13 su örneği, 2011 Haziran ayında Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarı, Kan Merkezi ve Radyoloji Ünitelerinin klima sistemlerinden alınan 23 sürüntü örneği ile yine Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göz Anabilim Dalı Polikliniğine çeşitli yakınmalarla gelen hastalardan 2012 Eylül-Kasım aylarında toplanan 500 gözyaşı ve/veya alt göz kapağı sürüntü örneği serbest yaşayan amip türleri bakımından laboratuvar ortamında incelemeye alınmıştır.

#### 3.1. Örneklerin toplanması

**3.1.1. Göz kapağı sürüntü örneklerinin alınışı:** Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göz Anabilim Dalı polikliniğinde, çeşitli nedenlerle muayene için gelen hastaların onayları alındıktan sonra, adı, soyadı, yaşı ve yakınmalarını içeren kısa bir anket uygulanmıştır. Herbir hastaya numara verilerek kayıt edilmiştir. Alt göz kapağının iç kısmından steril pamuk uçlu eküvyonlar ile alınan göz yaşı ve sürüntü örnekleri, içinde 1 ml serum fizyolojik bulunan steril tüplere (Mediko Kimya, Türkiye) alınmıştır.

**3.1.2. Klima sistemlerinden sürüntü örneklerinin alınışı:** Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarı, Kan Merkezi ve Radyoloji Anabilim dalına ait ünitelerdeki klima sistemlerinden elde edilen örnekler, içinde 1 ml serum fizyolojik bulunan tüplere steril eküvyonlar(Mediko Kimya, Türkiye) kullanarak alınmıştır.

**3.1.3. Su örneklerinin alınışı:** Sivas il merkezinden, köylerden ve kaplıcalardan sağlanan örnekler 500 ml'lik steril pet şişeler ile toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Su örneklerinin toplandığı yerler şunlardır:

1. Tavra dere suyu (Paşabahçe mesire alanının 2 km kuzeyi)
2. Çeltek köyüne ait çeşme suyu
3. Kepenek suyu
4. Tıp Fakültesi çeşmesinden alınan su

5. Tavra kaynak suyu (Paşabahçe mesire alanının 2 km kuzeyindeki çeşmeden alınan su)
6. Tavra kaynak suyu (Paşabahçe mesire alanının 2 km kuzeyindeki çeşmeden kürün dibinden alınan su)
7. Tavra kaynak suyu (Paşabahçe mesire alanının 2 km kuzeyindeki köyün girişindeki çeşmeden alınan su)
8. Sıcak çermik akıntı suyu
9. Sıcak çermik banyo suyu
10. Soğuk çermik havuz suyu
11. Kangal kaplıcasından alınan havuz suyu
12. Kangal kaplıcasından alınan çeşme suyu
13. Kangal kaplıca ırmağından alınan su

### **3.2.Örneklerin muhafaza edilmesi ve ekilmesi**

Elde edilen örnekler, eküvyona bulaşan parazitlerin serum fizyolojik sıvısı içine düşmesi için laboratuvara getirilerek oda ortamında bir gece bekletildi. Ertesi gün daha önceden petri plaklarına dökülen Besleyici Değeri Olmayan Agar=Non nutrition agar(NNA) üzerine önceden üretilmiş olan canlı *E. coli* ekimi yapıldı. Alınan örnekler bu ortama inoküle edildi. Ekim işlemi yapıldıktan sonra plaklar 5 gün inkübe edilmek üzere 30 °C deki etüvlere konuldu.

### **3.3.Örneklerin ışık mikroskopunda incelenmesi**

Etüvde 5 gün bekletilen plaklar ilk kontrol için etüvden dışarı çıkartılarak ışık mikroskopunda 10'luk objektif altında kontrol edildi. İlk kontrolde negatif sonuç veren plaklar 2 hafta sonra tekrar incelenmek üzere oda ısısında muhafaza edildi. Pozitif çıkan örneklerin ise mikroskopta detaylı incelemesi yapılarak hem kist hem de trofozoit formları yönünden ilgili anahtarlar kullanılarak tanımlamaları yapıldı[41,50]. Kist ve trofozoit formlarının ayrı ayrı fotoğrafları çekildi ve pozitif çıkan bu plaklardan tekrar pasaj yapılarak örnekler yeniden elde edildi.

İki haftalık süre geçtikten sonra ilk kontrollerde negatif çıkan plaklar tekrar incelendi ve pozitif çıkan plaklar yine ayrıntılı incelenerek kist ve trofozoit formlarının fotoğrafları çekildi. Daha sonra bunların da tekrar pasajı yapılarak yeniden örnekler üretildi. İkinci inceleme sonrası negatif çıkan örnekler çöpe atılmak üzere depolandı.

Pasaj yapılan pozitif örnekler kamçı deneyi yapılmak üzere tekrar mikroskopta incelenerek amiplerin agarda yoğun olan bölgelerinden kazıntı yapılarak toplandı. Daha sonra bu kazıntı örnekleri içinde 2 ml damıtık su bulunan tüplere konularak karıştırıldı ve yaklaşık 3 saat etüvde 37<sup>0</sup>C de bekletildi. Üç saat sonunda tüpün içindeki sıvı alttaki çöküntü dipte kalacak şekilde döküldü. Tüpün dibinde kalan çöküntü lam üzerine dökülüp üzeri lamelle kapatılarak mikroskopta incelendi. Burada kamçı deneyindeki amaç; *Acantamoeba* ve *Naegleria* türlerini birbirinden ayırmaktır. *Naegleria* türleri kamçı dönemine sahipken, *Acantamoeba* türleri kamçı dönemine sahip değildir ve kamçı oluşturmaz. Kamçı deneyi ile şayet varsa *Naegleria* formları kamçılı forma geçmektedirler ve mikroskop altında da rahat bir şekilde ayırt edilebilmektedirler.

### **3.4.Örneklerin fotoğraflarının çekilmesi**

Serbest yaşayan amip açısından pozitif bulunan petri plaklarının mikroskop altında kist ve trofozoit fotoğrafları net bir şekilde çekildi. Ayrıca bu plaklardan alınan sürüntü örneklerinin serum fizyolojik (SF) içinde hazırlanan lam lamel arası incelemelerle de özellikle 40x lik büyütmede fotoğrafları alınmıştır.

### **3.5. Kamçı deneyi**

*Naegleria* türleri için uygulanan bu deneyde; daha önceden plaklarda üretilmiş SYA'lerden agar yüzeyinde ışık mikroskobu ile tespit edilen bölgelerden yıkama ve kazıma yöntemleri ile toplanan amipler damıtık su bulunan cam tüpler içine konulmuş ve iki saat oda ısısında bekletilerek kamçılı forma geçmesi için uygun ortam oluşturulmuştur.2-3 saat sonunda tüpün üst kısımdaki sıvı dökülerek, alt kısımdaki sıvıdan bir miktar lam üzerine damlatılarak üstüne lamel kapatılmış ve 40'lık büyütmede, mikroskop altında incelenerek amiplerin kamçılı forma geçip geçmedikleri izlenmiştir.

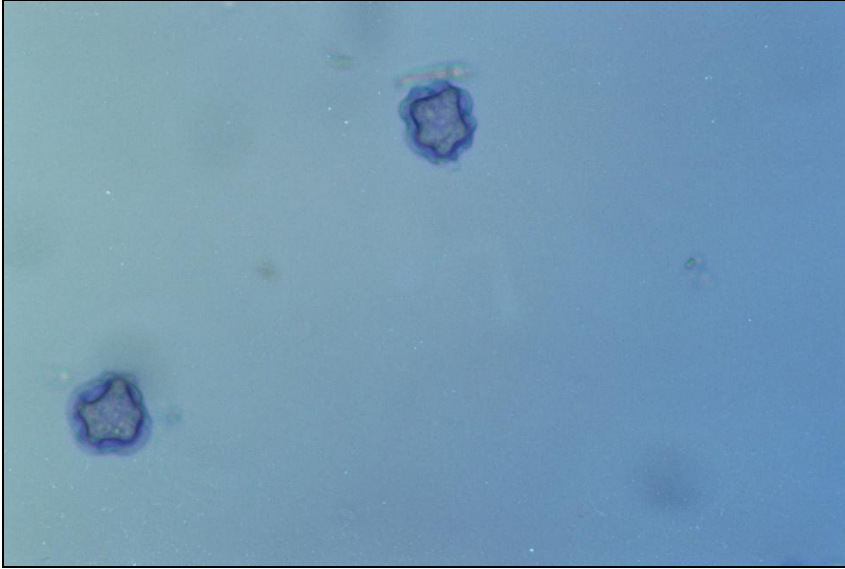
### 3.6. Isı tolerans testi

Pozitif örneklerden tekrar amipleri üretmek için ışık mikroskopunda, besiyerinde amip kist ve trofozoitlerinin belirlendiği bölgelerden bek alevi yanında bistüri aracılığı ile kesitler alınarak, üzerine *E. coli* ekimi yapılmış olan iki yeni NNA bulunan pedri plağına kesitler ters çevrilerek (kesitteki amipli yüzey agara yapıştırılmıştır) pasaj yapılmıştır. Bunlardan biri 42<sup>0</sup>C de diğeri 52 <sup>0</sup>Cde inkübe edilmiştir. Bir gün sonra bu plaklarda amip üreyip üremediği kontrol edilmiştir. Bu test izole edilen amip türlerinin canlılar için patojen olup olmadıklarının belirlenmesine yöneliktir.

## 4. BULGULAR

Çalışmada, 500 kişiden alınan göz kapağı sürüntü örneğinin birinde *Acanthamoeba* spp(%0.2), birinde ise *Hartmannella* spp.(%0.2) üremiştir. 23 farklı klimadan alınan sürüntü örneğinin 18(%43.5)'inde serbest yaşayan amip üretilmiş olup bunlardan dördünde *Acanthamoeba* spp., 4'ünde *Naegleria* spp., 10'unda *Hartmannella* spp., üretilmiştir. 13 su örneğinin ise 4'ünde *Acanthamoeba* spp. saptanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

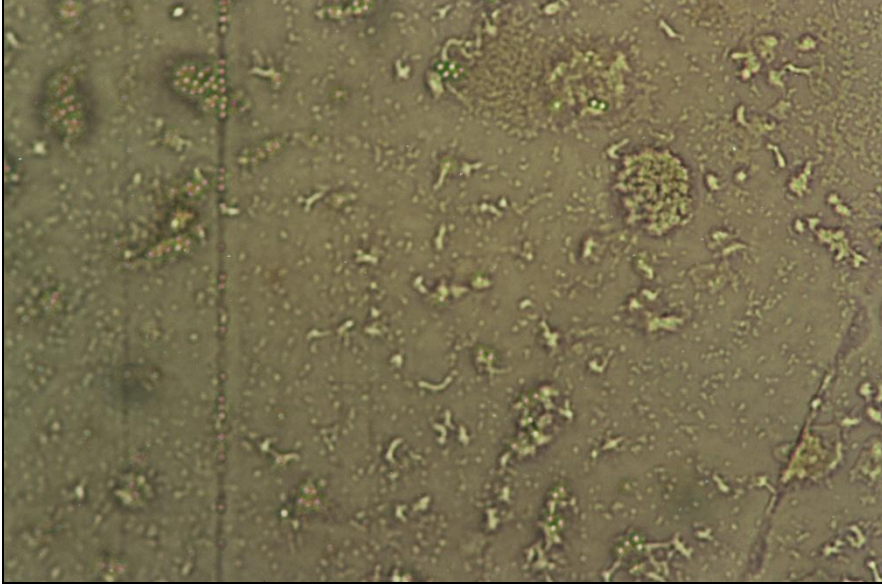
**4.1 Göz kapağından alınan sürüntü örneklerinden elde edilen bulgular:** Çalışmanın bu bölümünde hergün 20 civarında hastadan alınan toplam 500 örnek incelendiğinde sadece iki kişide serbest yaşayan amip türlerine rastlanmıştır. 69 nolu ve 115 nolu hastalardan alınan örneklerin kültürleri pozitif çıkmıştır. Bunlardan 69 numaralı hastada hem plaklar üzerinde yapılan kist ve trofozoit formların incelenmesinde hemde lam lamel arası serum fizyolojikle yapılan incelemelerde morfotiplendirme kaynaklarından da faydalanılarak tanımlamalar yapılmıştır[41,50].Bu örneğin *Acanthamoeba* spp. olduğu kist formlarının endokist ve ekzokistindeki girinti ve çıkıntılardan anlaşılmıştır(Şekil 2).



**Şekil 2.**Alt göz kapağı sürüntüsünden üretilen *Acanthamoeba* spp. kistlerinin SF içinde hazırlanan preparatta 40x de görünümü(Endokistin daha belirginleşmesi için lam-lamel arasına metilen mavisi damlatılmıştır).

Aynı örneğin NNA üzerinde üreyen trofozoit görüntüsü Şekil 3 de,serum fizyolojik içinde hazırlanan preparattaki görüntüsü, acanthapod yapıları Şekil 4 de sunulmuştur.



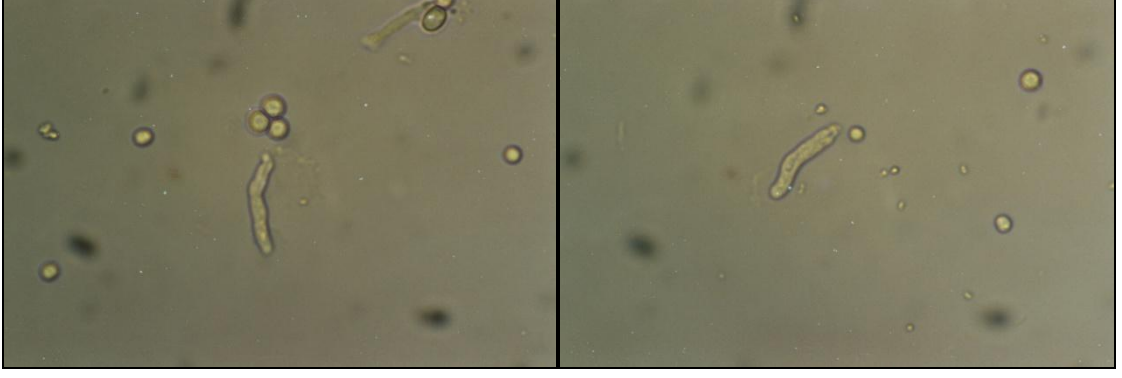


**Şekil 3.** Alt göz kapağı sürüntüsünden üretilen *Acanthamoeba* spp.trofozoitlerinin plak üzerinden 10x de görünümü

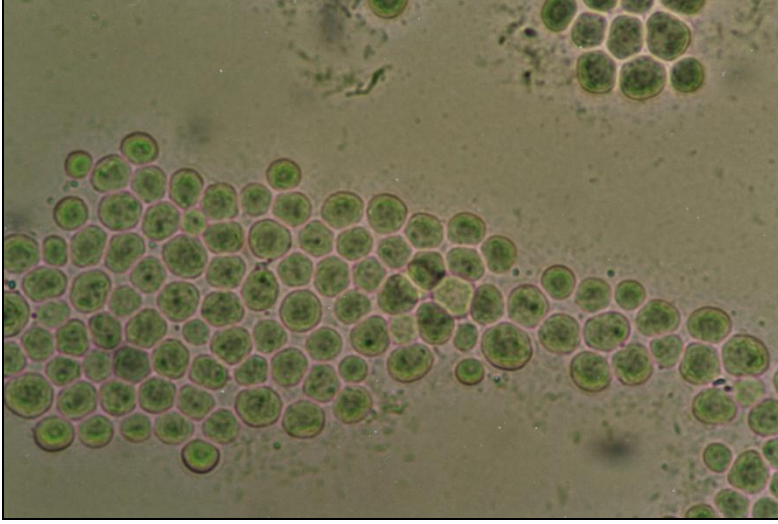


**Şekil 4.** Alt göz kapağı sürüntüsünden üretilen *Acanthamoeba* spp.trofozoitlerinin SF içinde hazırlanan preparatta 40x de görünümü

Göz polikliniği hastalarından alınan sürüntü örneklerinden birinde de *Hartmannella* spp. üretilmiştir. Bu 115 numaralı hastanın sürüntü örneklerinden üretilen amibin SF içinde hazırlanan preparatlarda ince uzun çubuk şeklinde görülen tipik trofozoitleri Şekil 5 de, kist yapıları Şekil 6'da gösterilmiştir.



**Şekil 5.** Göz sürüntü örneğinden üretilmiş olan *Hartmannella* spp. nin trofozoit formunun SF içinde hazırlanan preparatta 40x deki görünümü



**Şekil 6.** Göz sürüntü örneğinden üretilmiş olan *Hartmannella* spp. nin kist formunun NNA yüzeyinden 40x deki görünümü

İncelenen 500 hastanın genel olarak uygulanan anket sonucunda yaş, cinsiyet ve yakınmaları açısından elde edilen bulguları Tablo 1 de sunulmuştur.

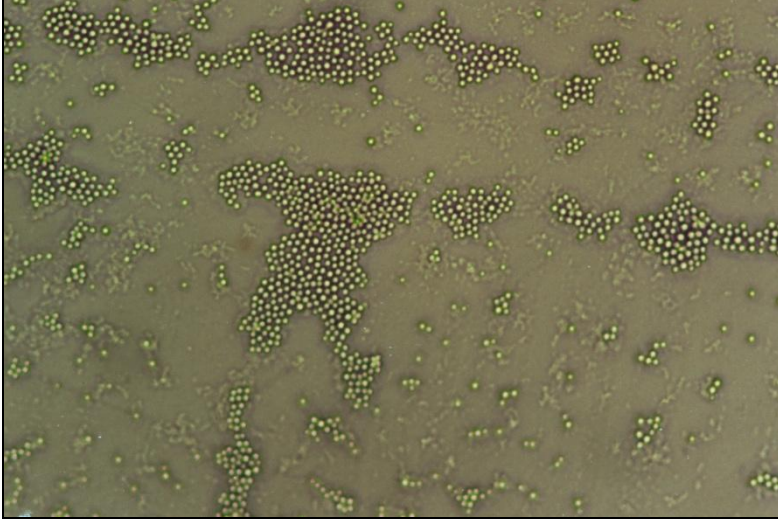
**TABLO 1.** Göz polikliniğine gelen hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı,yaş aralıkları ve polikliniğe gelme nedenleri

Yaş Aralığı	Erkek Hasta Sayısı	Kadın Hasta Sayısı	Hastanın Göz Polikliniğine Geliş Nedeni
18 – 31	79	54	Kontakt lens kullanımına bağlı enfeksiyon Bakteriyal enfeksiyon Kontakt lens kullanımına bağlı göz kuruluğu Kızarıklık yanma ve şişlik
31 – 41	45	40	Yabancı cisim batması Bakteriyal enfeksiyon Batma ve yanma Blefarit
41 – 51	18	31	Glokom Katarakt Ağrı ve yanma
51 – 61	40	42	Katarakt Yanma ve batma Görme bozukluğu
61 – 71	47	28	Katarakt amaliyatı sonrası enfeksiyon Batma ve yanma Görme kaybı
71 – 91	27	22	Katarakt Üveyit Blefarit Görme kaybı

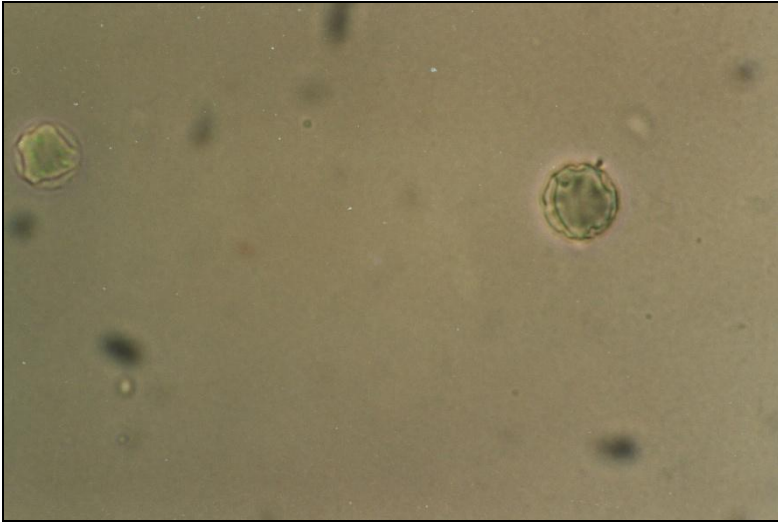
**4.2. CÜSHAU Hastanesindeki farklı birimlerde bulunan klimaların filtrelerinden elde edilen bulgular:** Kan merkezinden alınan 4 örnekten üçünde SYA saptanmış olup, bunlardan 2'sinde *Hartmannella* spp, 1'inde *Acanthamoeba* spp üremiştir. Hematoloji laboratuvarından alınan 3 örnekte de SYA üremiştir. Bunlardan 1'inde *Acanthamoeba* spp., 1'inde *Naegleria* spp.,1'inde de *Hartmannella* spp.üremiştir. Biyokimya laboratuvarından alınan 8 örneğin 6'sında SYA üremiştir. 1'inde *Acanthamoeba* spp., 3'ünde *Hartmannella* spp., 2'sinde *Naegleria* spp. üremiştir. Radyolojiden alınan 9 örneğin 6'sında SYA üremiştir. 4'ünde *Hartmannella* spp., 1'inde *Acanthamoeba* spp, 1'inde de *Naegleria* spp tanımlanmıştır(Tablo 2).

**Tablo 2.** Klima sistemlerinden alınan örneklerin toplandığı noktalar ve SYA görülme durumları

Örnek No	Kan Merkezi Laboratuvarı	Hematoloji Laboratuvarı	Biyokimya Laboratuvarı	Radyoloji Laboratuvarı
1	+			
2	-			
3	+			
4	+			
5		+		
6		+		
7		+		
8			+	
9			-	
10			+	
11			+	
12			-	
13			+	
14			+	
15			+	
16				+
17				-
18				+
19				+
20				+
21				+
22				-
23				+
24				-



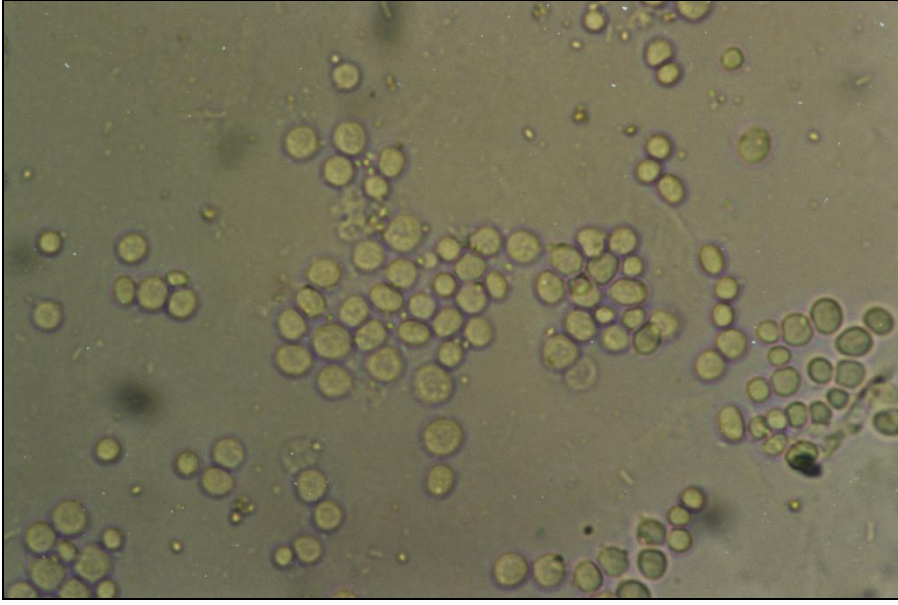
**Şekil 7.** NNA yüzeyinden SYAlerin kist ve trofozoitlerinin 10x de görünümü



**Şekil 8.** Kan merkezinden alınan örnekte üreyen *Acanthamoeba* spp. kist görünümü, SF içinde hazırlanmış ve 40x de görüntülenmiştir.

Klima sistemlerinden toplanan sürüntü örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba*, *Naegleria* ve *Hartmannella* spp. nin saptanmış olan **görüntüleri Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14 ve Şekil 15'te** sunulmuştur.

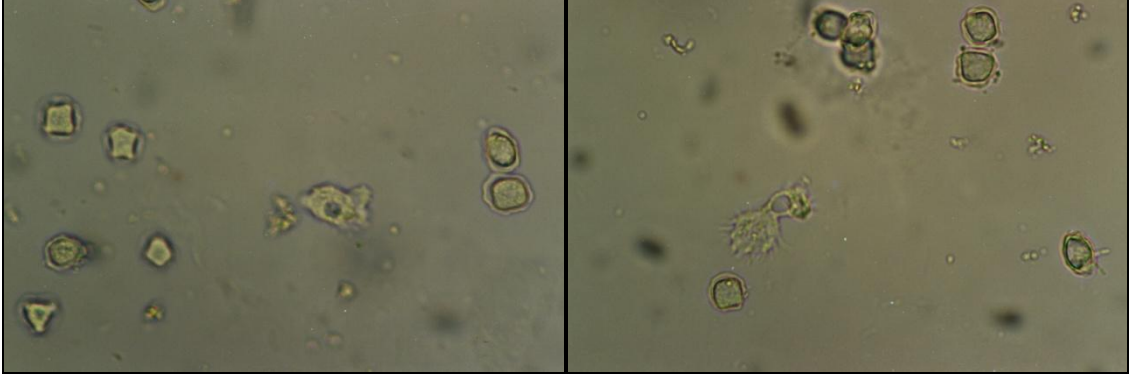




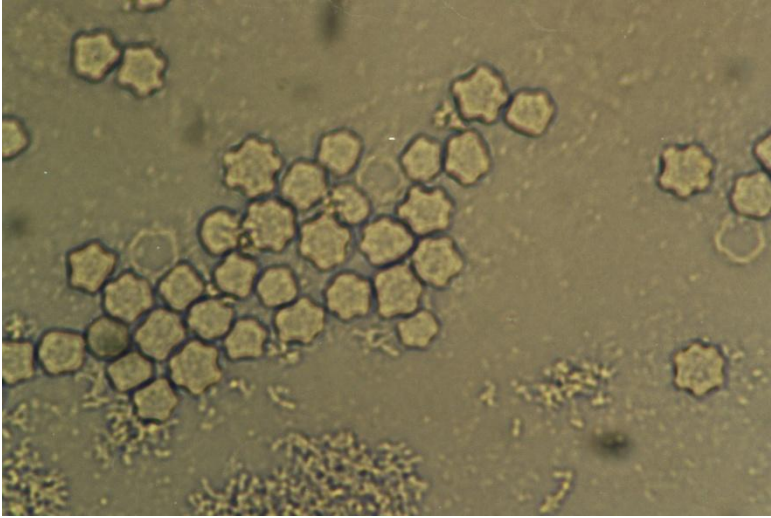
**Şekil 9.** *Hartmannella* spp. (Çeşitli birimlerden üretilen *Hartmannella* spp.kistlerine örnek, SF içinde hazırlanan preparatta 40x )



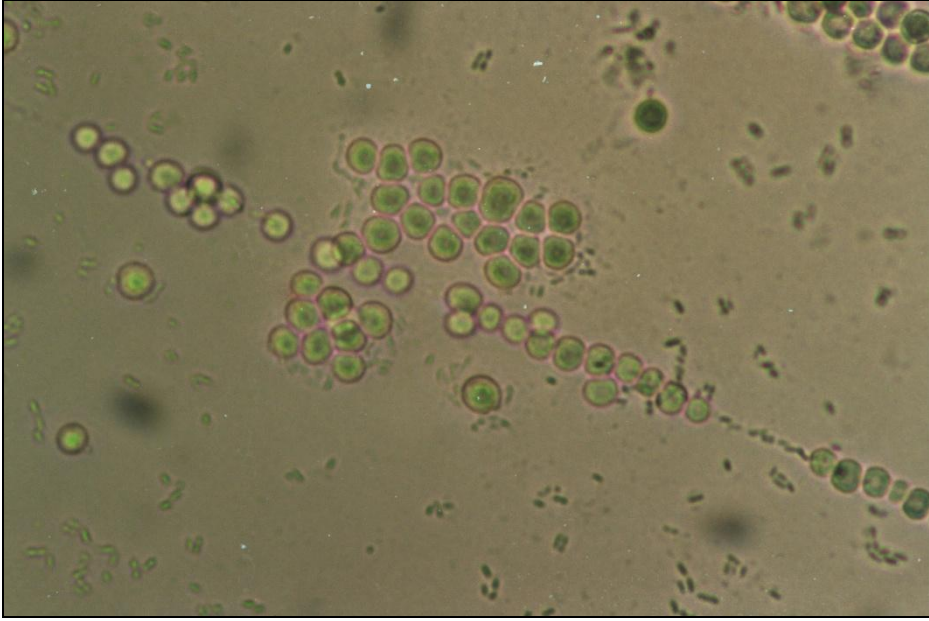
**Şekil 10.** *Hartmannella* spp trofozoit . (Çeşitli birimlerden üretilen *Hartmannella* spp.kistlerine örnek, SF içinde hazırlanan preparatta 40x )



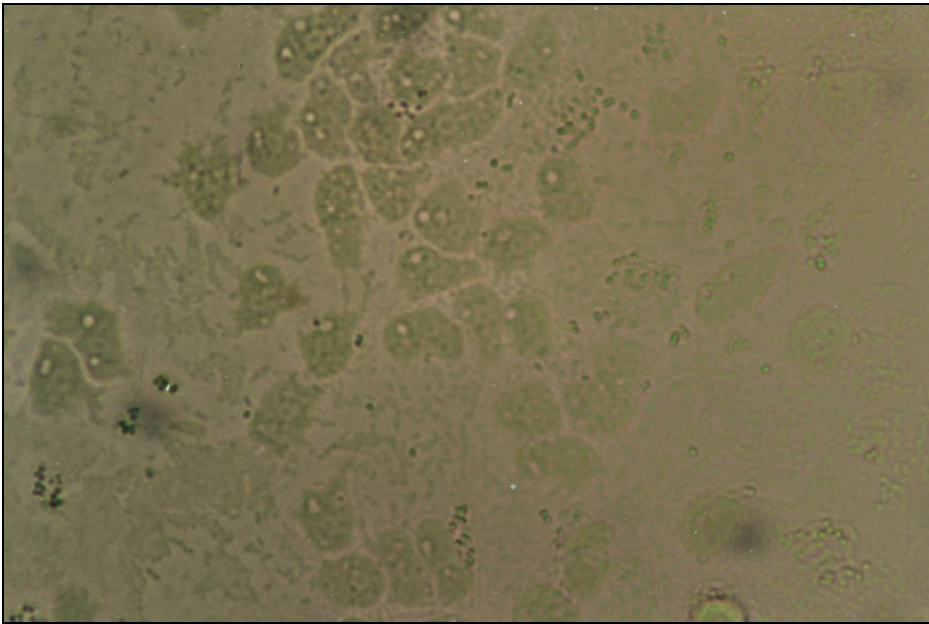
**Şekil 11.** *Acanthamoeba* spp. kist ve trofozoitleri, SF içinde hazırlanmış ve 40xde görüntülenmiştir.



**Şekil 12.** *Acanthamoeba* spp. kist görünümü, NNA yüzeyinden, 40xde görüntülenmiştir.

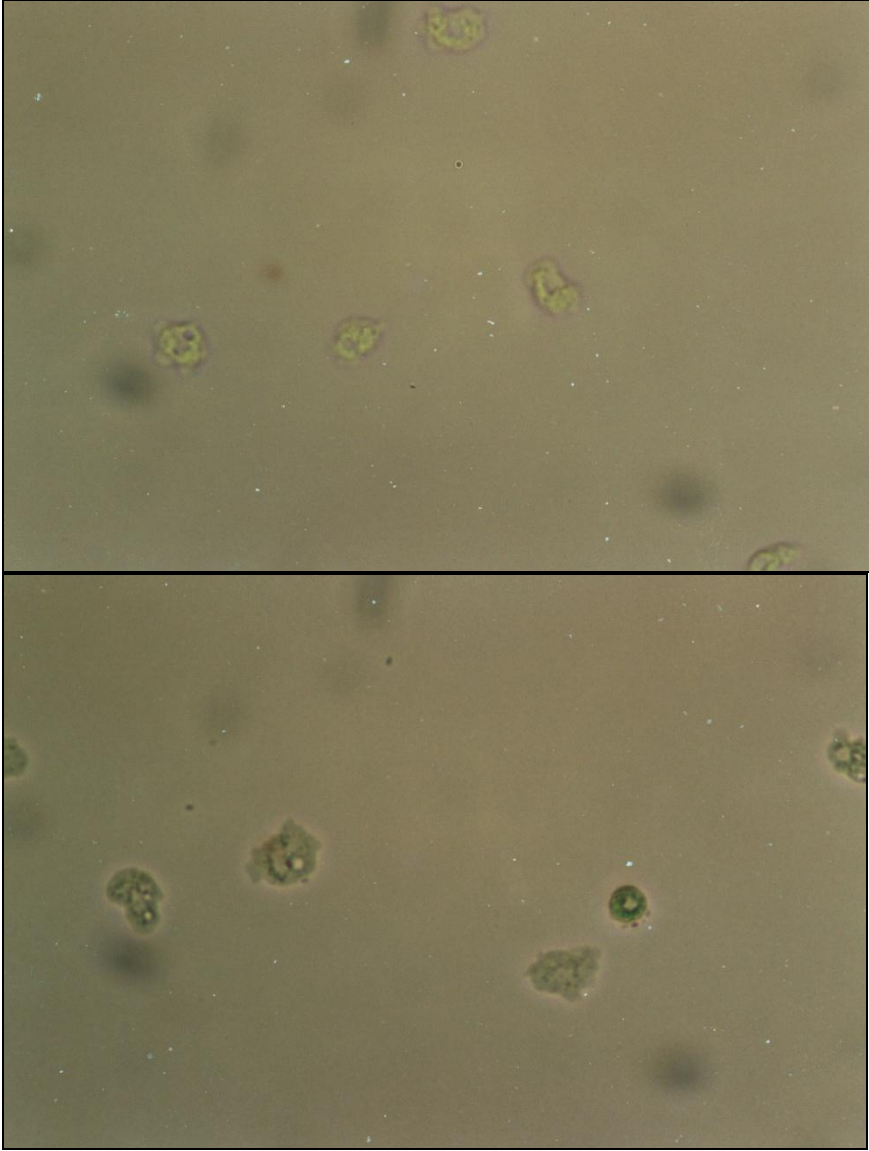


**Şekil 13.** *Naegleria* spp. kistleri (40x) (NNA yüzeyinden 40x de görüntülenmiştir)



**Şekil 14.** *Naegleria* spp. trofozoitleri, NNA yüzeyinden 40x büyütmede görüntülenmiştir.





**Şekil 15.** *Naegleria* spp. trofozoitleri , (SF içinde hazırlanmış preparatta 40x de görüntülenmiştir)

**4.3. Su örneklerinden elde edilen bulgular: Su örneklerinde ise;** 2,9,12 ve 13 nolu yerlerden alınan örnekler üzerinde yapılan çalışmalar sonrasında kist ve trofozoit evreleri, ışık mikroskopunda saptanarak fotoğrafları çekildi(Şekil 16)



**Şekil 16.** Çeşitli su örneklerden üretilen ve SF içinde hazırlanan preparatlardan 40x de görüntülenen *Acanthamoeba* spp kist ve trofozoitlerinin görünümü.

Pozitif bulunan bütün örneklerin *Neogleria fowleri* açısından kamçı deneyleri yapılmış ancak lam lamel arası mikroskop incelemesinde kamçı gözlenilmemiştir. Ayrıca ısı tolerans testlerinde de 42<sup>0</sup>C ve 52<sup>0</sup>C de herhangi bir üreme saptanamamıştır.

## 5.TARTIŞMA

Serbest yaşıyan amipler, GAE, AK ve kutanöz lezyonlar ile sinüs lezyonlara neden olan etkenlerdir. *Acanthamoeba Keratiti* bağışıklığı yeterli ve bağışıklığı az olan bireylerde meydana gelebiliyorken GAE ve kutanöz *Acanthamoebiasis* vakalarına yatkınlık AIDS’li hastalar da dahil olmak üzere bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde bulunmuştur. *Acanthamoeba*’nın çabuk teşhisi başarılı bir tedavi için oldukça önemlidir. *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının teşhisi ve tedavisi, enfeksiyonun nadirliğinden, çoğu doktorun hastalık belirtilerine aşinalıklarının azlığı nedeniyle zordur.

Amiplerin in vitro kültürü ve doku bölgeleri için tür belirleme prosedürlerinin uygulanması veya sitolojik hazırlıklar laboratuvar teşhisinin yapılmasında yarar sağlar. Dokularda *Acanthamoeba*’yı tanımlamak için yeni moleküler yöntemlerin kullanımı enfeksiyonu teşhis etmek için daha hızlı yollar sağlamaktadır. Hücre temasına bağılı veya bağımsız prosesleri içine alan çoklu hareket durumlarının bulunabileceğı açık olmasına rağmen *Acanthamoeba*’nın hastalığa neden olduğı mekanizmalar hala çözülememektedir. Benzer olarak bağışıklık sisteminin enfeksiyona dirençteki rolü çözülmemiştir. Son zamanlardaki çalışmalar sIgA’nın tamamlayıcı unsurların, nötrofillerin ve makrofajların enfeksiyona dirençte önemli rol oynayabileceğı ileri sürülmüştür.

İnsan hastalığına neden olan bir potansiyele sahip olduğı bilinen çeşitli bakterilerle, *Acanthamoeba*’nın zincir oluşturduğunun fark edilmesi, bu amiplerin bakteriyel patojenler için bir rezerv hizmeti gördüğü ileri sürülmektedir. Son olarak bildirilen *Acanthamoeba* enfeksiyonu vakalarındaki artış bu organizmaların hastalık için sahip oldukları potansiyelin daha fazla farkına varılmasının bir sonucu olabilir. *Acanthamoeba* enfeksiyonunun artmasında HIV virüsü taşıyan, kanser tedavisi gören hastaların artması ve organ nakilleri tedavisi sırasında bağışıklığı bastırıcı tedavilerin uygulanması gibi çok sayıda faktör hesaba katılabilir[14].

Çevresel ve klinik örneklerde *Acanthamoeba* spp. ve *Naegleria* spp. varlığının araştırılması adlı çalışmamızda elde elden bulgular 3 temel başlık altında tartışılmıştır

a)Amiplerin çevresel ve klinik ortamlardan izolasyonu ile ilgili çalışmalar

**b)İzole edilen örneklerin besiyerlerine ekimi ve mikroskopik olarak incelenmesi**

**c)Serbest yaşayan amip açısından pozitif bulunan örneklerin patojenite testlerinin yapılması**

**a)Serbest yaşayan amiplerin çevreden izole edilmesi amacıyla bir çok çevresel materyaller örnek olarak kullanılmıştır. Bunlar arasında deniz suyu, toprak, toz partikülleri, taze sular, yüzme havuzları, mahalle suları yer almaktadır[6].Örneğin 2009 yılında yapılan bir çalışmada İran'da farklı 14 şehirde bulunan hastanelerden elde etmiş oldukları 94 içme suyu örneğini Baqiyatallah Üniversitesi Parazitoloji laboratavârında incelemişler ve 45 (% 48) su örneğinde *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerini saptamışlardır. Toplanan su örneklerini 0,22-0,45 mikrometrelik filtrelerden geçirmişlerdir. Daha sonra elde ettikleri süzüntüyü 56 °C benmaride 20 dakika bekleterek öldürdükleri *E. coli* sürülmüş besleyici değeri olmayan (non nutrition agar) agar içeren petri plaklarına ekmişlerdir. Ekimi tamamlanan plakları etüve kaldırarak 2 hafta sonra kontrollerini yapmışlar ve mikroskopik olarak plakları incelemişlerdir[7].**

Ayrıca serbest yaşayan amipleri elde etmek için bilim adamları otomobil ve konutlarda bulunan klima sistemlerinden elde ettikleri sürüntü örneklerini de incelemişlerdir.2011 yılında Li-Li Chan ve arkadaşları Malezya'da yapmış oldukları bir çalışmada klima sistemlerinden topladıkları 87 toz partikül örneğini incelemişlerdir. Li-Li Chan ve arkadaşları klima sistemlerinden elde ettikleri örnekleri canlı *E. coli* sürülmüş besleyici değeri olmayan (non nutretion agar) agar içeren plaklara ekmiş ve 26-28 °C sıcaklıkta etüvde 2 hafta bekletildikten sonra mikroskopik olarak incelemişlerdir. Daha sonra pozitif bulunan örneklerin moleküler düzeydeki analizleri yapılmıştır[27].

Yapmış olduğumuz çalışmada ise biz 24'ü klima sistemlerinden ve 13'ü de su örneklerinden olmak üzere toplamda 37 çevresel örnek kullandık. Klima sistemlerinden toplanan örneklerin hepsi Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Uygulama Hastanesi laboratuarlarından alındı. Örnekler steril pamuk uçlu eküvyonlar ile toplanmış ve içinde serum fizyolojik bulunan daha önceden steril edilmiş olan cam tüplere konularak muhafaza edilmiştir. Klima sistemlerinden elde edilen örneklerden 18'i SYA yönünden pozitif sonuç vermiştir.

Çevresel ortamdan elde edilen su örnekleri ise Sivas merkez ve ilçelerinden çeşitli noktalardan toplandı. Toplanan 13 örneğin 4'ünde *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerine rastlandı.

Serbest yaşayan amiplerin klinik örneklerden izole edilmesinde daha çok keratitli hastalardan elde edilen kornea kazıntıları ya da kontakt lens solüsyonlarından elde edilen materyaller kullanıldı. Bunun yanında keratitli olmayan sağlıklı bireylerden göz florasından toplanan sürüntü örnekleri de *Acanthamoeba* açısından araştırıldı.

2005 yılında Malezya'da Anisah ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada kontakt lens kullanmayan sağlıklı okul öğrencilerinden oluşan deneklerden toplamda 286 göz sürüntü örneği toplamışlardır. Anisah ve arkadaşları steril pamuk uçlu eküvyonlar kullanarak gözün normal florasından elde ettikleri sürüntü örneklerini, *E. coli* ekilmiş besleyici değeri olmayan (non nutretion agar) agar içeren plaklara ekmiş ve 30 °C'de 2 hafta inkübe ettikten sonra ışık mikroskobunda incelemişlerdir. Fakat yapılan bu çalışmada *Acanthamoeba* açısından pozitif bir sonuç elde edilememiştir.

Anisah ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada şu sonuca varmıştır. Denek olarak kullanılan öğrenciler çevresel kaynaklara maruz kalmamış olabilir. Serbest yaşayan amipler sağlıklı olan bu bireylerin göz florasına yerleşmemiş olabilir.2)Serbest yaşayan amipler göz içinde var olabilir. Fakat amibi elde etmek için kullanılan yöntem yeterince hassas ve uygun değildir. 3)Serbest yaşayan amip göz florasında bulunabilir. Fakat numune hacmi ve seçimi yeterli değildir[6].

1998 yılında Mathers ve arkadaşları tarafından Iowa Üniversitesinde yapılan bir çalışmada 1993 ve 1996 yılları arasında göz polikliniğine gelen 1726 hasta incelenmiş ve bunlardan 865'inin kornea hastası olduğu teşhis edilmiştir. Kornea hastalarından yapılan mikroskobik çalışmalarda ise 137 hastada amip olduğu kanıtlanmış ve epitelyum biopsilerinde *Acanthamoeba* açısından pozitiflik elde edilmiştir[29].

Ülkemizde ise Aydın Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları kliniğine, her iki gözde kızarıklık, batma, yanma ve görmede bulanıklık şikâyetleri ile başvuran 23 yaşındaki kontakt lens kullanan olgu klinik ve laboratuvar

incelemeleri sonrasında AK tanısı almıştır. Etken izole edilmiş ve 'T4' genotipinde '*Acanthamoeba castellanii*' olarak tanımlanmıştır[18].

Yine ülkemizde Demirci ve arkadaşları Kocaeli'nde 2006 yılında beş yaşında kontakt lens kullanmayan bir çocukta *Acanthamoeba* spp. saptadıklarını bildirmişler fakat etkenin genotiplendirilmesi yapılmamıştır[16].

Yapmış olduğumuz çalışmada ise klinik olarak Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göz Polikliniğine 2012 Ağustos ve Kasım ayları arasında görme problemi ya da göz enfeksiyonu şikâyeti ile başvuran toplam 500 hastadan örnek toplandı. Steril pamuk uçlu eküvyonlar kullanılarak hastaya zarar vermeden göz pınarı bölgesinden elde edilen sürüntü örnekleri ya da göz muayenesi esnasında kullanılan içerikçe zengin materyaller değerlendirilmek suretiyle, elde edilen örnekler, içinde serum fizyolojik bulunan plastik tüplerde muhafaza edildi. Yapılan bu çalışmada 500 hastadan 2'si serbest yaşayan amip açısından pozitif bulundu. Bu amiplerin *Acanthamoeba* ve *Hartmanella* olduğu mikroskopik çalışmalarla kanıtlandı.

b)Yapmış olduğumuz bu çalışmada besiyeri olarak besleyici değeri olmayan (BDOB) kullanıldı. Bu besiyeri 1 litre damıtık su üzerine % 1,5'lik agar eklenerek hazırlanmaktadır. Bu besiyeri 121<sup>0</sup>C'de yaklaşık 1,5 saat otoklavda steril edildikten sonra steril koşullarda 10-15 ml'lik steril petri plaklarına dökülmüş ve ekimlerde kullanılmak üzere buz dolabında saklandı. Çevresel ortamlardan toplanan su ve klima sürüntü örnekleri ile göz polikliniğine gelen hastalardan elde edilen sürüntü örnekleri laboratuarda steril bir şekilde günlük olarak petri plaklarında hazırlanan besiyerlerine ekildi. Ekim yapılmadan önce petri plaklarına amip için besin teşkil etsin diye önceden üretilerek etüvde muhafaza edilen *E. coli* sürüldü.

Ekim işlemleri tamamlandıktan sonra petri plakları ütüve kaldırılarak 37<sup>0</sup>C'de yaklaşık 5-10 gün arasında bekletildi. Bu süre sonrasında petri plakları etüvden çıkarılarak ışık mikroskopunda 10x ve 40x objektiflerinde değerlendirildi.

Daha sonra trofozoit ve kist açısından pozitif bulunan örnekler üzerinden yeniden pasajlar yapıldı. Orjinal kültürlerden ilk pasajlar şu şekilde yapıldı. Mikroskoptaki incelemede kist ve trofozoitlerin yoğun olduğu noktalar petri plağının dışından kalemlerle

işaretlenerek alev yanında steril lansetlerle kesilip lanset üzerine alındı. Bu parça üzerine canlı *E. coli* sürülmüş olan yeni bir plak üzerine ters çevrilerek aktarıldı. Çalışmamızda moleküler düzeyde bir araştırma yapılmadığı için pozitif bulunan örneklerin sadece kist ve trofozoit dönemlerinin fotoğrafları çekildi.

c) Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz pozitif örnekler *Naegleria fowleri* açısından da değerlendirildi. Bunun için pozitif örneklerden kamçı deneyleri yapıldı. Agar besiyerlerindeki amip kültürlerine damıtık su eklendi ve 37<sup>0</sup>C'de 2 saat bekletildi. Bu süre sonrasında sıvıdan preperat hazırlanarak ışık mikroskobunda 10x ve 40x objektifte incelendi. Ancak yapılan kamçı deneylerinde kamçı gözlenemedi ve *Naegleria* açısından pozitif sonuç alınamadı.

Pozitif örneklerin patojenite testleri de yapıldı Bunun için pasajlardan elde edilen örnekler yeni plaklara ekildi ve 72 saat 37<sup>0</sup>C üzerindeki ısılarda üreyip üremedikleri kontrol edildi. Bu süre sonunda plaklar ışık mikroskobunda değerlendirildi. Fakat bu plaklarda amip kist ve trofozoitlerine rastlanılmadı. Böylece çevresel ortamlardan ve klinikte hastalardan elde edilen pozitif örneklerin patojen türler açısından negatif oldukları saptandı.

Çalışmada, henüz patojen olarak tanımlanmamış ancak içlerinde taşıyabilecekleri bakteri ve virüs gibi patojenler nedeniyle potansiyel patojen olarak adlandırılan *Hartmannella* spp.'ye rastlanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda bu cinse ait amipler herhangi bir klinik ya da çevresel ortamdaki bildirilmemiştir. Bu nedenle özellikle göz sürüntü örneklerinden saptamış olduğumuz *Hartmannella* spp. önem arz etmektedir.

Çevresel ve klinik çalışmalarda *Acanthamoeba* spp.'nin ülkemizde de izole edilmesi sağlanmış ve molüküler düzeyde tiplendirilmesi başarılmıştır[18]. Ülkemizde gerek hekimlerin, gerekse laboratuvar sorumlularının serbest yaşayan amipler konusunda daha bilinçli hareket etmeleri yararlı olacaktır kanısındayız. Çalışmalardan da görüldüğü üzere keratiti olmayan ya da kontakt lens kullanmayan bireylerinde *Acanthamoeba* enfeksiyonu açısından risk altında olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle insanların *Acanthamoeba* enfeksiyonları açısından uyarılmaları ve bilgilendirilmeleri gerekir. Ayrıca serbest yaşayan amiplerin gözde yerleşiminin kliniklerde daha detaylı bir şekilde incelenmesi ve irdelenmesi gerekmektedir.

Bu amiplerin tıpkı bir Truva atı gibi içlerinde taşıyabildikleri bazı bakteriyel ve viral patojenlerin de varlığı unutulmamalı, hastalık oluşturma potansiyelleri göz önünde bulundurulmalı düşüncesindeyiz.



## 6.SONUÇ

Yapmış olduğumuz bu çalışmada 24'ü klima sistemlerinden ve 13'ü de su örneklerinden olmak üzere toplamda 37 çevresel örnek kullandık. Klima sistemlerinden toplanan örneklerin hepsi Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Uygulama Hastanesi laboratuvarlarından alındı. Örnekler steril pamuk uçlu eküvyonlar ile toplandı ve içinde serum fizyolojik bulunan daha önceden steril edilmiş olan cam tüplere konularak muhafaza edildi. Klima sistemlerinden elde edilen örneklerden 18'i SYA yönünden pozitif sonuç verdi. Çevresel ortamdaki elde edilen su örnekleri ise Sivas merkez ve ilçelerinden çeşitli noktalardan toplandı. Toplanan 13 örneğin 4'ünde *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerine rastlandı.

Klinik olarak da Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göz Polikliniğine 2012 Ağustos ve Kasım ayları arasında görme problemi ya da göz enfeksiyonu yakınmaları ile başvuran toplam 500 hastadan örnek toplandı. Steril pamuk uçlu eküvyonlar kullanılarak hastaya zarar vermeden göz pınarı bölgesinden elde edilen sürüntü örnekleri ya da göz muayenesi esnasında kullanılan içerikçe zengin materyaller değerlendirilmek suretiyle, elde edilen örnekler, içinde serum fizyolojik bulunan plastik tüplerde muhafaza edildi. Yapılan bu çalışmada 500 hastadan 2'si serbest yaşayan amip açısından pozitif bulundu. Bu amiplerin *Acanthamoeba* ve *Hartmannella* cinslerine ait olduğu mikroskopik çalışmalarla kanıtlandı.

Elde edilen sonuçlar çerçevesinde, 500 kişiden alınan göz kapağı sürüntü örneğinin birinde *Acanthamoeba* spp(%0.2), birinde ise *Hartmannella* spp.(%0.2) üretildi. 23 farklı klimadan alınan sürüntü örneğinin 18(%43.5)'inde serbest yaşayan amip üretilmiş olup bunlardan dördünde *Acanthamoeba* spp., 4'ünde *Naegleria* spp., 10'unda *Hartmannella* spp., üretildi. 13 su örneğinin ise 4'ünde *Acanthamoeba* spp. saptandı.

Bulgularımıza göre hem çevresel kaynaklarda hem de insanlarda gözde gerek havadan gerekse çeşme sularından bulaşabilen SYA türleri bulunabilmektedir. İzole edilen bu amiplerin insan ve diğer canlılar için patojenliklerinin belirlenmesi ve tür ayrımlarının yapılabilmesi için moleküler düzeyde çalışmalar yapılması gereklidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Akın Polat Z, Vural A, Cetin A. 2007. Efficacy of contact lens storage solutions against trophozoite and cyst of *Acanthamoeba castellanii* strain 1BU and their cytotoxic potential on corneal cells. *Parasitol Research*. 101(4): 997-1001
2. Akın Polat Z.2001.Toprak ve su örneklerinden özgür yaşayan amiplerin soyutulması tanımlanması özelliklerinin belirlenmesi ve patojenliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cumhuriyet Üniversitesi.
3. Akın Polat Z.2005. Deneysel olarak oluşturulan *Acanthamoeba* keratitinin histopatolojik gelişimi ve hastalığın tedavisi üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cumhuriyet Üniversitesi.
4. Alizadeh, H, Apte S, El Agha MS, Li L, Hurt M, Howard K, Cavanagh HD, McCulley JP, Niederkorn JY. 2001. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 20:622–627.
5. Alsam S, Ryoul JS, Dudley R, Khan NA.2008. Role of human tear fluid in *Acanthamoeba* interactiowins with the human corneal epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 329-336
6. Anisah N, Amal H, Kamel A.G, Yusof S, Noraina A.R, Norhayati M. 2005. Isolation of *Acanthamoeba* sp. from conjunctival sac of healthy individuals using swab.*Tropical Biomedicine* 22(1): 11-14
7. Armstrong, M. 2000. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infect. Dis. Rev.* 2:65–73.
8. Auaran JD, Star MB, Jakobiec FA.1987. *Acanthamoeba* keratitis a review of the literature. *Cornea*.6:2-26
9. Badirzadeh A, Niyati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Rezaian M.2011. Isolation of Free Amoebae from Sarein Hot Springs in Ardebil Province, Iran. *Iranian J Parasitol* Vol.6, No.2,pp,1-8
10. Beattie T.K, Tomlinson A, Seal D.V. 2002. Anti-*Acanthamoeba* efficacy in contact lens disinfecting systems. *BR. J. Ophthalmol.* 86: 1319-1320
11. Benson RL, Ansbacher L, Hutchison RE, Rogers W. 1985. Cerebrospinal fluid centrifuge analysis in primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109:668–671.

12. Booton, G.C., Kelyy D.J., Chu Y.W., Seal D.V., Houang E., Lam D.S., Byers T.J. and Fuerst P.A.2002. 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. 40: 1621-1625
13. Cabral FM.1988. Biology of *Naegleria* spp. Microbiol. Rev. 52:114–133.
14. Cabral FM, Cabral G.2003. *Acanthamoeba* ssp. as Agents of Disease in Humans. Clinical Microbiology Reviewe.273-307
15. Carlesso AM, Artuso G, Caumo K, Rott MB.2010. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. Curr Microbiol 60:185-190
16. Demirci G, Ay GM, Karabas LV, Altintas O, Tamer GS, Çağlar Y, 2006 *Acanthamoeba* keratitis in a 5-years- old boy with out a history of contact lens wearer in Turkey. Parasitol Res. 100(2): 241-246
17. Denney, C. F., V. J. Iragui, L. D. Uber-Zak, N. C. Karpinski, E. J. Ziegler, G. S. Visvesvara, and S. L. Reed. 1997. Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: case report and review. Clin. Infect. Dis. 25: 1354–1358.
18. Erta baklar Hatice Dayanır Volkan, Apaydın Pınar, Ertuğ Sema, Walochnik Julia.2009. *Acanthamoeba* Keratiti. Türkiye Parazitoloji Dergisi.33(4): 283-285
19. Gelman, B. B., S. J. Rauf, R. Nader, V. Popov, J. Borkowski, G. Chaljub, H. W. Nauta, and G. S. Visvesvara. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. JAMA 285:2450–2451.
20. Gianinazzi Christian, Schild Marc, Zumkehr Beatrice, Wüthrich Fritz, Nüesch Irina, Ryter Regula, Schürch Nadia, Gottstein Bruno, Müller Norbert.2010. Screening of Swiss hot spring resort for potentially pathogenic free-living amoebae. Experimental Parasitology 126:45-53
21. Gömnik K, Kuzna Grygiel W.2004. Presence of virulent strain of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. Ann Agric Environ Med.11.233-236
22. Huang Shih – Wei, Hsu Bing Mu, Chen Nai – Hsiung, Huang Chin – Chun, Huang Kuan – Hao, Chen Jung – Sheng, Kao Po – Min.2011. Isolation and identification of *Legionella* and their host amoebae from weak alkaline carbonate spring water using a culture method combined with PCR. Parasitol Res 109:1233-1241

23. Jones, D.B., Visvesvara G.S. and Robinson N.M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol. Soc.V.K.* 95:221-232
24. Khan NA. 2001. Pathogenicity, Morphology, and Differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* Vol.43:391-395
25. Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer David G, and Matheson Melville.2004. *Acanthamoeba* Keratitis: The Role of Domestic Tap Water Contamination in the United Kingdom. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 45:165-169
26. Lam DSC, Houang E, Fan DSP, Lyon D, Seal D, Wong E and the Hong Kong Microbial Keratitis Study Group.2002. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: Comparison with Europe and North America. *Eye* 16:608-618
27. Li-Li Chan, Joon-Wah Mak, Yoon-Tong Low, Thuan-Tzen Koh, Init Ithoi and Shar Mariam Mohamed. 2011. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. From air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica.* 117(1): 23-30
28. Lorenzo-Morales Jacob, Miranda-Monteverde A.Carlos, Jimenez Concepcion, Tejedor Luisa Maria, Valladares Basilio, Rivas – Ortega Antonio.2005. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary islands, Spain. *Ann Agric Environ Med.* 12, 233-236
29. Mathers William D, Sutphin John E, Lane James A, Folberg Robert. 1998. Correlation between surface water contamination with amoeba and the onset of symptoms and diagnosis of amoeba – like keratitis 82:1143-1146
30. Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Rahimi F, Motevalli-Haghi A, Martin-Navarro, Shohreh Farnia CM, Valladares B, Rezaei M. 2009. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strain from dust source in Iran. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 425-427
31. Nuprasert W, Putapornpip C, Pariyakanok L, and Jongwutiwes S.2010. Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology.*4636-4640
32. Radford C F, Minassian D C, Dart J K G.2002. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: Incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol.*86:536-542
33. Saygı G. 2009. Paraziter Hastalıklar ve Parazitler. Es Form Ofset Ltd.Şti. Sivas
34. Saygı G, Polat ZA.2003.Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitler. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 25 (3): 140-149

35. Siddiqui R, Khan NA.2012.Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites and Vectors 5:6
36. Sharma S, Garg P, Gullapalli R.2000.Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. Br f Ophthalmol 84:1103-1108
37. Simmons RB, Rose LJ, Crow SA, Ahearn DG. The Occurrence and Persistence of Mixed Biofilms in Automobile Air Conditioning Systems.1999. Current Microbiology Vol.39:141-145
38. Stehr-Green, J.K., Bailey T.M. and Visvesvara G.S. 1990. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. Am. J. Ophthalmol. 107:331-336
39. Stehr-Green, J.K., Bailey T.M. ,Brandt F.H. Carr J.H. ,Bond W.W. and Visvesvara G.S.1987. *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers:a case-control study. JAMA 258:57-60
40. Stockman LJ, Wright CJ, Visvesvara GS, Fields BS, Beach MJ.2011.Prevalence of *Acanthamoeba* ssp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA-1990-1992. Parasitol Res 108:621-627
41. Smirnov AV, Goodkov AV. 1999. An illustrated list of basic morphotypes of Gymnamoebia (Rhizopoda, Lobosea), Protistology 1:20-29
42. Szenasi, Z., T. Endo, K. Yagita, and E. Nagy. 1998. Isolation, identification and increasing importance of "free-living" amoebae causing human disease. J. Med. Microbiol. 47:5–16.
43. Thomas JM, and Ashbolt NJ.2011.Do Free-Living Amoebae in Treated Drinking Water Systems Present an Emerging Health Risk? Environmental Science and Technology / Vol 45:860-869
44. Walker P L, Prociv P, Gardiner W G, Moorehouse D E. 1986. Isolation of free - living amoebae from air samples and an air – conditioner filter in Brisbane [ letter ]. Medical Journal of Australia 145: 175
45. Walochnick J, Obwaller A and Aspöck H.2000.Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* ssp. Applied and Environmental Microbiology, p.4408-4413
46. Winck MAT, Caumo K, Rott MB. 2011. Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande do Sul, Brazil. Curr Microbiol.63:464-469

- 47.** Visvesvara G S, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria* and *Sappinia diplodea*. FEMS Microbiology and Medical Microbiology 50(1):1-26
- 48.** Visvesvara G.S. and Stehr-Green, J.K. 1990. Epidemiology of free-living ameba infection J.Protozool.37:25-33
- 49.** Zohreh L, Maryam N, H. Ali, S. Saed, B. Farid Tahvildar, T. Niloofar, E. Mohammad, M. Ehsan Nazemalhosseini.2011.Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. Parasitof Res 109:575-580
- 50.** Dykova I, Pindova Z, Fiala I, Dvorakova H, Machackova B. 2005. Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967: morphology, phylogeny and molecular diagnosis of the species in tissue lesions. Folia Parasitologica 52:295-303
- 51.** <http://tolweb.org/Naegleria/124653/2008.09.21> in The Tree of Life Web Project,

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı-Soyadı:** Önder YÜNLÜ

**Doğum yeri ve yılı:** SİVAS 31.08.1982

**Yabancı Dil(ler):**İngilizce

**Adres:** Alibaba Mah. 47. Sok. No: 9

**(Cep Tel.)** 0536 776 38 96

**E-mail:** onder218@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

**Lise:** Sivas Atatürk Lisesi

**Lisans:**2001-2005 Cumhuriyet Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü

**Tez Konusu:** Bal arıları