

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINA NEDEN OLAN
BAKTERİLERİN ACANTHAMOEBA HATCHETTİ İLE
ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Umut BERBEROĞLU

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Gülay ARAL AKARSU**

**ANKARA
2017**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Solunum Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan Bakterilerin *Acanthamoeba hatchetti* ile Etkileşiminin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Umut BERBEROĞLU

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Umut BERBEROĞLU tarafından hazırlanan
“Solunum Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan Bakterilerin *Acanthamoeba hatchetti*
ile Etkileşiminin Araştırılması” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından PARAZİTOLOJİ DOKTORA TEZİ olarak OY
BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27.02.2017

İmza
Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Doç. Dr. Gülay ARAL AKARSU
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. Aslıhan AVCI
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Funda DOĞRUMAN
AL
Gazi Üniversitesi
Üye

İmza
Sibel ERGÜVEN
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Serbest Yaşayan Amipler ve <i>Acanthamoeba</i> spp.	2
1.1.1 <i>Acanthamoeba</i> spp. Genel Özellikleri	3
1.1.2 Klinik	7
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	9
1.2.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri	10
1.2.2 Klinik	11
1.3 <i>Moraxella catarrhalis</i>	12
1.3.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri	12
1.3.2 Klinik	13
1.4 <i>Haemophilus influenzae</i>	14
1.4.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri	14
1.4.2 Klinik	15
1.5 <i>Bordetella pertussis</i>	16
1.5.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri	16
1.5.2 Klinik	17
1.6 Amip-Bakteri Etkileşimi	18
1.6.1 Bakterilerin Amip-Bakteri Etkileşiminde Uyum Mekanizmaları	20
1.6.2 Amip-Bakteri Etkileşiminin Önemi	22
1.6.3 Çevresel örneklerde SYA'nın varlığı	25
1.6.4 Solunum yolu patojeni bakteriler ile SYA'nın etkileşimi	26
1.7 Tezin Amacı	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1 <i>Acanthamoeba</i> spp. Kültürünün Yapılması	31
2.1.1 Amip Kullanım Süspansiyonu Hazırlanması	31
2.1.2 Amip Kullanım Süspansiyonunda Sayım ve Canlılık Kontrolü	32
2.2 Bakteri Suşları Kültürlerinin Yapılması	33
2.2.1 <i>B. pertussis</i> Kültürü	33
2.2.2 <i>H. influenzae</i> Kültürü	34
2.2.3 <i>S. pneumoniae</i> Kültürü	34
2.2.4 <i>M. catarrhalis</i> Kültürü	34
2.2.5 Birincil Bakteri Süspansiyonu ve Bakteri Kullanım Süspansiyonu Hazırlanması	35
2.2.6 Bakteri Süspansiyonlarının Sayım Kontrolü	35
2.3 Hücre Dışı Bakteri-Amip Etkileşimi	36
2.3.1 Direkt Ko-kültürlerin Hazırlanması	37
2.3.2 Amip ve Bakteri Sayımları	37
2.4 Hücre İçi Bakteri-Amip Etkileşimi	38

2.4.1	Direkt Ko-kültürlerin Hazırlanması	39
2.4.2	Bakteri Sayımları	40
2.4.3	Gentamisin Sülfat ve Triton X-100 Etkinlik Kontrolü	40
2.4.3.1	Gentamisin Sülfatın Bakteri Suşları Üzerine Etkisi	41
2.4.3.2	Triton X-100'ün Bakteri Suşları Üzerine Etkisi	41
2.4.3.3	Gentamisin Sülfatın Amip Üzerine Etkisi	41
2.4.3.4	Triton X-100'ün Amip Üzerine Etkisi	42
2.5	Hücre Dışına Salınan Faktörlerin Canlılık Üzerine Etkisi	42
2.5.1	Amipten Salınan Faktörlerin Bakteri Canlılığına Etkisi	43
2.5.2	Bakterilerden Salınan Faktörlerin Amip Canlılığına Etkisi	43
2.6	İstatistiksel değerlendirme	44
3.	BULGULAR	45
3.1	Amip Kültürü Sayım ve Canlılık Kontrolü	45
3.2	Bakteri Kültürü ve Sayım Kontrolleri	46
3.2.1	Bakteri Suşlarının Koloni Görünümleri	46
3.2.2	Bakteri Kullanım Süspansiyonlarının Sayım Kontrolü	47
3.3	Hücre Dışı Amip-Bakteri Etkileşimi	47
3.3.1	<i>A. hatchetti</i> ile <i>B. pertussis</i> 'in Hücre Dışı Etkileşimi	47
3.3.1.1	<i>A. hatchetti</i> ile <i>B. pertussis</i> 'in 6 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	47
3.3.1.2	<i>A. hatchetti</i> ile <i>B. pertussis</i> 'in 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	49
3.3.1.3	<i>A. hatchetti</i> ile <i>B. pertussis</i> 'in 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	51
3.3.2	<i>A. hatchetti</i> ile <i>H. influenzae</i> 'nin Hücre Dışı Etkileşimi	53
3.3.2.1	<i>A. hatchetti</i> ile <i>H. influenzae</i> 'nin 6 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	53
3.3.2.2	<i>A. hatchetti</i> ile <i>H. influenzae</i> 'nin 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	55
3.3.2.3	<i>A. hatchetti</i> ile <i>H. influenzae</i> 'nin 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	57
3.3.3	<i>A. hatchetti</i> ile <i>M. catarrhalis</i> 'in Hücre Dışı Etkileşimi	59
3.3.3.1	<i>A. hatchetti</i> ile <i>M. catarrhalis</i> 'in 6 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	59
3.3.3.2	<i>A. hatchetti</i> ile <i>M. catarrhalis</i> 'in 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	61
3.3.3.3	<i>A. hatchetti</i> ile <i>M. catarrhalis</i> 'in 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	63
3.3.4	<i>A. hatchetti</i> ile <i>S. pneumoniae</i> 'nin Hücre Dışı Etkileşimi	66
3.3.4.1	<i>A. hatchetti</i> ile <i>S. pneumoniae</i> 'nin 6 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	66
3.3.4.2	<i>A. hatchetti</i> ile <i>S. pneumoniae</i> 'nin 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	68
3.3.4.3	<i>A. hatchetti</i> ile <i>S. pneumoniae</i> 'nin 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi	70
3.4	Hücre İçi Amip-Bakteri Etkileşimi	72
3.4.1	Gentamisin Sülfat ve Triton X-100 Solüsyonları Etkinlik Kontrolü	72
3.4.2	Amip-Bakteri Hücre İçi Etkileşim Sonuçları	73
3.5	Hücre Dışına Salınan Faktörlerin Etkisi	74
3.5.1	Amipten Salınan Faktörlerin Bakteriler Üzerine Etkisi	74
3.5.1.1	<i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>B. pertussis</i> Üzerine Etkisi	74
3.5.1.2	<i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>H. influenzae</i> Üzerine Etkisi	76
3.5.1.3	<i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>M. catarrhalis</i> Üzerine Etkisi	77
3.5.1.4	<i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>S. pneumoniae</i> Üzerine Etkisi	79
3.5.2	Bakterilerden Salınan Faktörlerin Amip Üzerine Etkisi	80
3.5.2.1	<i>M. catarrhalis</i> 'den salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi	80
3.5.2.2	<i>S. pneumoniae</i> 'dan salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi	82
4.	TARTIŞMA	84
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	97
	ÖZET	99

SUMMARY
KAYNAKLAR
ÖZGEÇMİŞ

100
101
114



ÖNSÖZ

Serbest yaşayan amipler (SYA) doğada yaşarken çeşitli mikroorganizmalarla beslenmekte ve etkileşim kurmaktadır. Amip ve bakteri etkileşimine yönelik yapılan çalışmalarda, çeşitli bakterilerin başta *Acanthamoeba* spp. olmak üzere SYA içerisinde ve/veya dışında etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bu etkileşim sonucunda amip ve/veya bakteri çeşitli faydalar sağlamaktadır. Bakteri suşları çevresel ortamda canlılıklarını daha uzun sürdürebilmekte, sayılarını ve virülanslarını arttırabilmekte, uzak mesafelere yayılabilmekte, antibiyotik ve biyosidal ürünlere direnç geliştirebilmekte ve amip hücresi içinde antrenman yaparak, insanda fagositoz yoluyla oluşan savunma mekanizmalarına dayanıklı hale gelebilmektedir. Bunun yanında, *Acanthamoeba* spp. suşlarının da bakterilerle etkileşime girerek, canlılık sürelerinde ve/veya patojenitelerinde artış ortaya çıkabilmektedir.

Günümüzde, amip ve bakteri etkileşimi ile bu etkileşim sonuçları konusunda uluslararası düzeyde çok sayıda araştırma yapılmış ve bu alana ilgi son yıllarda giderek artış göstermiştir. Çalışmaların *Legionella* spp., tüberküloz dışı mikobakteriler, *Francisella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* vb. bakteriler üzerinde yoğunlaştı bununla birlikte, tüberküloz dışı mikobakteriler ve *Legionella* dışında solunum yolu patojeni etkenleri ile amip etkileşimine yönelik araştırmaların az sayıda olduğu görülmektedir. Türkiye’de ise SYA ile ilgili çalışmalar daha çok çevresel örneklerde bulunma sıklıkları üzerine yapılmış olup amip-bakteri etkileşiminin araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır.

Şebeke suyu sistemlerinde yer alan biyofilm tabakasında bulunabilen, solunum yolu patojenlerini de içeren amibe dirençli bakterilerin, enfeksiyon oluşturma potansiyelleri yönünden dikkate alınması gerekmektedir. Bilgilerimize göre, solunum yolu patojenlerinden *B. pertussis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis*’in SYA ile etkileşimi detaylı olarak araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, Türkiye’de ilk defa, amip-bakteri etkileşiminin hastalardan izole edilen bakteri suşlarını kullanarak araştırmak; *A. hatchetti* ile *B. pertussis*, *H.*

influenzae, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* arasında nasıl bir etkileşim olduğunu in vitro olarak ortaya çıkarmak amaçlanmıştır.

Doktora eğitimimin ilk üç yılında, akademik çalışmalarında bilgi ve tecrübesini eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR'e,

Doktora eğitimimin son dört yılında tez ve diğer akademik çalışmalarında bilgi ve tecrübe kazanmamda desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülay ARAL AKARSU'ya,

Çalışmalarında kullandığım *A. hachetti* suşunu temin etmemde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Zübeyde Akın POLAT'a ve bakteri suşlarının temininde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Zeynep Ceren KARAHAN ile Sayın Uzm. Dr. Selin NAR ve Uzm. Dr. Meral TURAN'a,

Çalışmamda kullandığım istatistik değerlendirmelerde danışmanlığı ve desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Can ATEŞ ve Sayın Batuhan BAKIRARAR'a,

Çalışmamın laboratuvar süreçleri ve tez yazım sürecinde tecrübe ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Asiye Evren EKEN BERBEROĞLU'na ve ayrıca kızım Ayça'ya,

Bu süreçte bana gösterdikleri destek, anlayış ve sabırdan dolayı Anneme Babama, Ablama

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADB	Amibe dirençli bakteri
AK	<i>Acanthamoeba</i> keratiti
BGA	Bordet gengou agar
BKİA	Beyin-kalp infüzyon agar
BKİB	Beyin-kalp infüzyon broth
BOS	Beyin omurilik sıvısı
ÇA	Çikolata agar
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FHA	Flamentöz hemaglütinin
GAE	Granülomatöz amibik ensefalit
GKY	Gentamisin koruma yöntemi
GS	Gentamisin sülfat
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> Tip b
Kob	Koloni oluşturan birim
KKA	Koyun kanlı agar
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LBAP	Legionella benzeri amip patojenleri
LOS	Lipooligosakkarit
MSS	Merkezi sinir sistemi
N	Birincil bakteri süspansiyonu
NTHi	Tiplendirilemeyen <i>Haemophilus influenzae</i>
IPH	İnvaziv pnömokokal hastalık
OD	Optik dansite
PAS	Page's amoeba saline
PT	Pertussis toksin
PYG	Proteos pepton yeast ekstrakt glukoz
SYA	Serbest yaşayan amipler
TKP	Toplum kaynaklı pnömoni
TPS	Tuzlu peptonlu su

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin yaşam döngüsü.	5
Şekil 1.2. <i>Acanthamoeba</i> kistlerinin morfolojik farklılıklarının interferans kontrast mikroskopta görünümü.	6
Şekil 1.3. SYA ile ilgili 1960-2010 yılları arasında yayınlanmış makale sayıları.	20
Şekil 1.4. Amip bakteri etkileşiminde bakteri uyum mekanizmaları.	21
Şekil 1.5. ADB'in amip tarafından alınması ve sonraki olası sonuçlar.	22
Şekil 2.1. Amip sayım ve canlılık kontrolü için kullanılan Neubauer sayma lamı.	33
Şekil 2.2. Bakteri kullanım süspansiyonu sayım kontrolü çalışma düzeneği.	36
Şekil 2.3. Hücre dışı etkileşim çalışmaları ko-kültür çalışma düzeneği.	38
Şekil 2.4. Hücre içi etkileşim çalışmalarında ko-kültür çalışma düzeneği.	40
Şekil 2.5. Hücre dışına salınan faktörlerin canlılık üzerine etkisinin araştırılmasında gerçekleştirilen çalışma düzeneği.	42
Şekil 3.1. Amip sayımı ve canlılık kontrolü çalışmalarındaki mikroskop görüntüleri.	45
Şekil 3.2. Bakteri suşlarına ait koloni görünümleri.	46
Şekil 3.3. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	48
Şekil 3.4. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	50
Şekil 3.5. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	52
Şekil 3.6. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	54
Şekil 3.7. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	55
Şekil 3.8. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	57
Şekil 3.9. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	60

Şekil 3.10. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	62
Şekil 3.11. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	64
Şekil 3.12. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	66
Şekil 3.13. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	68
Şekil 3.14. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.	70
Şekil 3.15. <i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>B. pertussis</i> üzerine etkisi sonuç grafikleri.	75
Şekil 3.16. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin <i>H. influenzae</i> üzerine etkisi sonuç grafikleri.	76
Şekil 3.17. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin <i>M. catarrhalis</i> üzerine etkisi sonuç grafikleri.	77
Şekil 3.18. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin <i>S. pneumoniae</i> üzerine etkisi sonuç grafikleri.	79
Şekil 3.19. <i>M. catarrhalis</i> 'den salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi sonuç grafikleri.	81
Şekil 3.20. <i>S. pneumoniae</i> 'dan salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi sonuç grafikleri.	82

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Bakteri kullanım süspansiyonu sayım kontrolleri.	47
Çizelge 3.2. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	48
Çizelge 3.3. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	48
Çizelge 3.4. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	50
Çizelge 3.5. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	50
Çizelge 3.6. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	52
Çizelge 3.7. Hücre dışı amip- <i>B. pertussis</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	52
Çizelge 3.8. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	54
Çizelge 3.9. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	54
Çizelge 3.10. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	56
Çizelge 3.11. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	56
Çizelge 3.12. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	58
Çizelge 3.13. Hücre dışı amip- <i>H. influenzae</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	58
Çizelge 3.14. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	60
Çizelge 3.15. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	60
Çizelge 3.16. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	62

Çizelge 3.17. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	62
Çizelge 3.18. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	64
Çizelge 3.19. Hücre dışı amip- <i>M. catarrhalis</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	65
Çizelge 3.20. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	67
Çizelge 3.21. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	67
Çizelge 3.22. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	68
Çizelge 3.23. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	69
Çizelge 3.24. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.	71
Çizelge 3.25. Hücre dışı amip- <i>S. pneumoniae</i> etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.	71
Çizelge 3.26. Kullanılan GS ve %0,4 Triton X-100'ün amip ve bakteri suşları üzerine etkisi.	73
Çizelge 3.27. Amip-bakteri hücre içi etkileşimi direkt ko-kültür çalışma sonuç tabloları.	74
Çizelge 3.28. <i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>B. pertussis</i> üzerine etkisi sonuç tablosu.	75
Çizelge 3.29. <i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>B. pertussis</i> üzerine etkisi istatistik verileri.	75
Çizelge 3.30. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin <i>H. influenzae</i> üzerine etkisi sonuç tablosu.	76
Çizelge 3.31. <i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>H. influenzae</i> üzerine etkisi istatistik verileri.	76
Çizelge 3.32. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin <i>M. catarrhalis</i> üzerine etkisi sonuç tablosu.	78
Çizelge 3.33. <i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>M. catarrhalis</i> üzerine etkisi istatistik verileri.	78

Çizelge 3.34. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin <i>S. pneumoniae</i> üzerine etkisi sonuç tablosu.	79
Çizelge 3.35. <i>A. hatchetti</i> 'den salınan faktörlerin <i>S. pneumoniae</i> üzerine etkisi istatistik verileri.	79
Çizelge 3.36. <i>M. catarrhalis</i> 'den salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi sonuç tablosu.	81
Çizelge 3.37. <i>M. catarrhalis</i> 'den salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi istatistik verileri.	81
Çizelge 3.38. <i>S. pneumoniae</i> 'dan salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi sonuç tablosu.	82
Çizelge 3.39. <i>S. pneumoniae</i> 'dan salınan faktörlerin <i>A. hatchetti</i> üzerine etkisi istatistik verileri.	82

1. GİRİŞ

Serbest yaşayan amipler (SYA) (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Hartmannella* vb.) ile patojen bakteriler arasındaki etkileşimler hem amipler hem de bakteriler açısından önem taşımaktadır. Amipler toprak, su gibi çevresel ortamlarda, özellikle bu ortamlardaki mikrobiyal biyofilm tabakalarında bulunmakta ve çeşitli mikroorganizmalarla beslenmektedir. Bu ortamlardaki bazı bakterilerin de amiplerle göstermiş oldukları etkileşim, bakterilere olumsuz durumlarda canlılıklarını sürdürmek, hastalık yapıcı özelliklerini arttırmak ve antibiyotiklere direnç geliştirmek gibi avantajlar sağlayabilmektedir. Böylelikle, özellikle fırsatçı patojen bakteriler çevresel ortamlarda daha uzun süre canlı kalmakta ve yayılma ihtimalleri artmaktadır. Patojen bakteriler ile SYA arasındaki etkileşimlerin nasıl, hangi türler arasında ve ne şekilde gerçekleştiğinin incelenmesi ile bu patojen etkenlere yönelik gerekli ve doğru önlemlerin alınması, halk sağlığının korunması açısından önem kazanmaktadır (Guimaraes ve ark., 2016 ve Khan ve Siddiqui, 2014).

Solunum yolu enfeksiyonlarına en sık neden olan patojen bakteriler arasında *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Bordetella pertussis* sayılabilir. Bu etkenler, farklı yaş gruplarında üst ve alt solunum yollarında asemptomatik taşıyıcılıktan pnömoni ve menenjit gibi ciddi enfeksiyonlara kadar değişen hastalıklara sebep olabilmekte ve Türkiye’de de rutin olarak izlenen bildirim zorunlu hastalık etkenleri arasında yer almaktadırlar (Akbaş E ve ark., 2014). Bunların yanında, önceden normal solunum yolu florası olarak değerlendirilen *Moraxella catarrhalis* de son yıllarda önemi gittikçe artmaya başlayan solunum yolu patojenleri arasında yer almaya başlamıştır (Hallström ve ark., 2011).

Bu çalışmada, Türkiye’de ilk defa, hastalardan izole edilmiş olan solunum yolu patojenleri *S. pneumoniae*, *H. influenzae* *B. pertussis* ve *M. catarrhalis*’in *Acanthamoeba hatchetti* ile etkileşimini göstermeye yönelik çalışmalar yapılması planlanmıştır. Çalışma sonucunda, solunum yolu enfeksiyon etkenleri arasında önemli bir yere sahip olan bu bakterilerin, çevrede yaygın olarak bulunan

Acanthamoeba türleri ile nasıl etkileşime girdiklerinin gösterilmesi ve bu durumun halk sağlığı açısından öneminin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

1.1 Serbest Yaşayan Amipler ve *Acanthamoeba* spp.

SYA doğada yaygın olarak her yerde bulunan fırsatçı protozodur. Toprak, toz, hava, deniz suyu, yüzme havuzu suyu, şebeke suyu, içme suyu, atık su, kontakt lens solüsyonları, klima sistemleri, diyaliz üniteleri ve diş tedavi üniteleri gibi yerlerde bulunabilirler. SYA arasında *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Sappinia* olmak üzere başlıca dört cins amip, insan ve hayvanlarda fırsatçı ve fırsatçı olmayan enfeksiyonlara neden olmaktadır. Daha nadir olarak ise *Hartmannella* bu gruba eklenebilir. Klasik sınıflandırmada *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia* ve *Hartmannella* Protozoa şubesi altında Amoebida sınıfında, *Naegleria* ise Schizopyrenida sınıfında yer almaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan yeni sınıflandırmada *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia* ve *Hartmannella* ökaryotlar altında yer alan Amoebozoa süper grubunda, *Naegleria* ise Excavata süper grubunda sınıflandırılmıştır (Smirnov ve ark., 2011; Trabelsi ve ark., 2012 ve Visvesvara ve Schuster, 2008).

Acanthamoeba'nın birçok türü (*A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis* ve *A. divionensis*), *Balamuthia*'nın bilinen tek türü *B. mandrillaris*, *Naegleria*'nın sadece bir türü *Naegleria fowleri* ve *Sappinia* türleri hastalık etkeni olarak gösterilmiştir (Visvesvara ve ark., 2007). *Hartmannella* cinsi içerisinde de *Hartmannella vermiformis*'in insanlarda hastalık etkeni olduğu bildirilmiştir (Abedkhozasteh ve ark., 2013 ve Niyatti ve ark., 2014). Günümüzde *H. vermiformis*, *Hartmannella*'nın diğer türlerinden önemli farklılıklara sahip olduğu için *Vermamoeba vermiformis* olarak adlandırılmaktadır (Smirnov ve ark., 2011).

1.1.1 *Acanthamoeba* spp. Genel Özellikleri

İlk kez 1930'da Castellani tarafından maya kültürü kontaminantı olarak tespit edildikten sonra yaklaşık 30 yıl büyük ölçüde dikkate alınmamıştır. Adını yüzeyinde ince çıkıntı veya iğne benzeri yapılara sahip olduğu için Latince dikensi çıkıntı anlamına gelen "acanth"dan almaktadır. *Acanthamoeba*, 1960'larda granüloamatöz ensefalit ile ilişkilendirilmeye başlanmış ve 1970'lerde keratite neden olduğu gösterildikten sonra önemi artmıştır (Siddiqui ve Khan 2012b). İnsanda tanımlanmış ilk granüloamatöz amibik ensefaliti (GAE) 1972 yılında, ilk *Acanthamoeba* keratiti (AK) ise 1974 yılında yayınlanmıştır. Bu dönemden sonra önemi gittikçe artmıştır (Nagington ve ark., 1974 ve Jager ve Stamm, 1972).

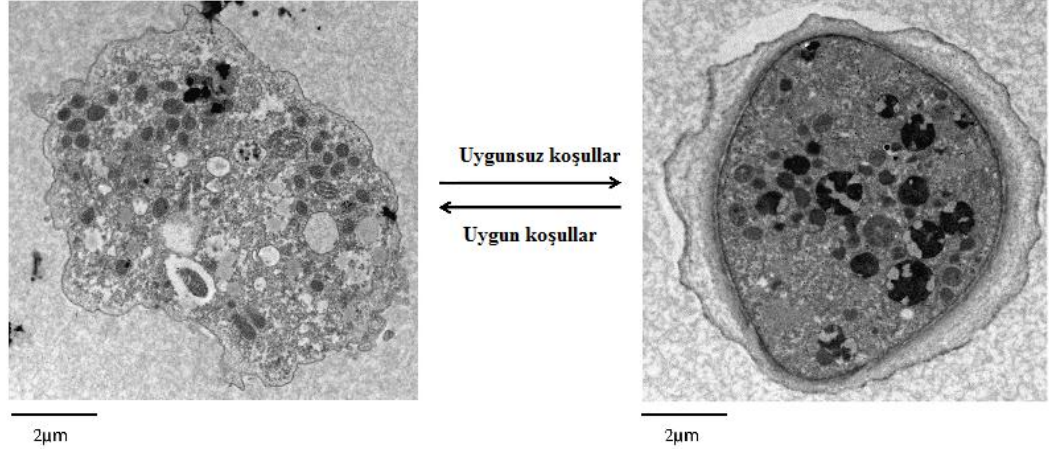
Acanthamoeba, doğada yaygın olarak bulunan fırsatçı bir protozodur. Tuzlu veya tatlı sularda, atık suda, saksı toprağında, ev akvaryumlarında, nemlendirici-ısıtıcılarda, hastane ortamlarında diş servisleri ve diyaliz ünitelerinde yaşayabilmektedir. *Acanthamoeba* ozmolarite, sıcaklık, tuzluluk ve pH şartlarını geniş bir aralıkta tolere edebildiği için 37 °C ve üzeri vücut sıcaklıklarında hayatta kalabilmektedir. Böylece bazı *Acanthamoeba* türleri (*A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis* ve *A. divionensis*) insanda enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Diğer bazı türler de termo-toleran olmakla birlikte patojen olduklarına dair bulgu bulunmamaktadır. (Schuster ve Visvesvara, 2004). *Acanthamoeba* cinsi, bitkiler, bazı hayvanlar (kuşlar, sürüngenler, köpekler, maymunlar, balıklar), pulmoner sekresyonlar, maksiller sinüs ve dışkı örneklerinden de izole edilmiştir (Visvesvara ve ark., 2007).

Çevresel ve klinik *Acanthamoeba* suşları in vitro olarak ksenik veya aksenik kültür ortamlarında üretilmektedir. Ksenik kültür, canlı veya ölü bakteri eklenmiş herhangi bir besleyici madde içermeyen agar ya da düşük düzeyde besin içeren agarlı (%0,05 peptone %0,05 yeast extract ve %0,1 glukoz) plaklar üzerine örneğin ve/veya amibin ekilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Çoğunlukla ksenik kültürler için mukoid özellikte olmayan *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. (*Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter cloacae*) veya *Escherichia coli* bakterileri tercih

edilmektedir (Shuster, 2002). Aksenik kültürlerde ise bakteri kullanılmaz ve temel besiyeri içeriği proteose peptone/peptone, yeast extract ve glukozdur. Bakteri kontaminasyonunu engellemek amacıyla besiyerine penisilin, gentamisin veya streptomisin eklenebilir. Bazı *Acanthamoeba* suşları'nın özellikle klinik örneklerden izolasyonu için ise bu temel besiyerine serum ve bazı vitaminlerin (B12, tiamin, biotin vb.) eklenmesinin kültür şansını arttırdığı bildirilmektedir (Shuster, 2002 ve Zeybek ve ark., 2009).

Patojen ve patojen olmayan suşların oda sıcaklığında (yaklaşık 25 °C) ve iki gün içerisinde üreyebilmekte ancak, özellikle ilk izolasyon kültürlerinde amip olmadığının tespit edilmesi için yedi gün beklenmesi gerekmektedir. Bazı klinik suşlar ≥ 37 °C'de üreyebilse de özellikle kornea enfeksiyonundan izole edilen suşların uygun üreme sıcaklığı yaklaşık 30 °C'dir (Greub ve Raoult, 2004; Khan, 2006 ve Shuster ve Visvesvera, 2004).

Acanthamoeba yaşam döngüsünde, trofozoit (8-40 µm) ve hareketsiz kist (8-29 µm) olmak üzere iki evrim şekli bulunmaktadır. Trofozoit yapısı tek çekirdek ve vücut yüzeyinden dışarıya uzanan akantapodlarının bulunması ile karakterizedir. Akantopodlar amibin yüzeylere tutunmasını, hücre hareketini ve besinleri yakalamasını sağlamaktadır. Trofozoit; bakteri, alg, mantar veya küçük organik partiküller ile beslenip ikiye bölünerek çoğalmaktadır (Khan, 2006). Bu bulaşıcı ve yayılan form olumsuz çevre koşullarında (aşırı sıcaklık ve pH, besin eksikliği, hiper veya hipo-ozmolarite) uzun süre canlı kalamamakta ve ikili duvar yapısına sahip (endo ve ektokist) kiste dönüşmektedir. Bu dayanıklı şekil, çevresel değişiklikleri izlemekte kullandığı açıklıklara sahiptir. Böylece uzun süre açlık, kuruluk, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlardan korunabilmektedir (Aksozek ve ark., 2002). Kistlerin 20 yıldan fazla canlı kalabildikleri gözlenmiştir (Mazur ve ark., 1995). *Acanthamoeba*'nın trofozoit ve kist formu Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

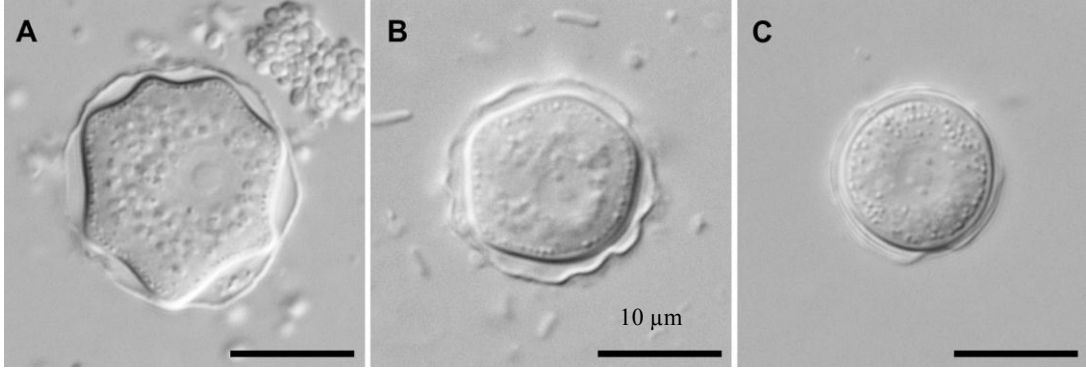


Şekil 1.1. *Acanthamoeba* spp.'nin yaşam döngüsü.

Uygun koşullarda amip, soldaki trofozoit formda bulunur ve ikiye bölünerek çoğalır. Uygunsuz koşullarda ise sağdaki şekilde, kist formuna dönüşerek olumsuz çevresel koşullara dayanıklı hale gelir (Siddiqui ve Khan, 2012b).

Acanthamoeba'nın 24'den fazla türü kistin morfolojik özelliklerine ve büyüklüklerine dayalı olarak üç grupta tanımlanmıştır (Khan, 2006; Shuster ve Visvesvara, 2004; Stothard ve ark., 1998 ve Visvesvara ve ark., 2007). Morfolojik gruplandırmada kist yapıları arasındaki farklılıklar Şekil 1.2'de gösterilmiştir.

- **Grup 1:** Diğer gruptakilerden büyük (18-30 µm), yıldız şeklinde endokist ve düz/kırışik ektokisti olan kistlere sahip türleri (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* ve *A. tubiashi*) içermektedir.
- **Grup 2:** Türlerin büyük bölümünü içeren gruptur. Bu grupta 18 µm'ye yakın veya küçük boyutlarda dalgalı ektokist ve poligonal, oval veya yıldız şeklinde endokisti olan kistlere sahip türler (*A.mauritaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A.divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. paradivionensis* ve *A. hatchetti*.) yer almaktadır.
- **Grup 3:** Büyüklükleri 18 µm ve altında olan ince ve düz ektokist ile küre veya oval endokist yapısına sahip kistleri olan türleri (*A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* ve *A. pustulosa*) içermektedir.



Şekil 1.2. *Acanthamoeba* kistlerinin morfolojik farklılıklarının interferans kontrast mikroskopta görünümü.

A: Grup 1, B: Grup 2 ve C: Grup 3. (Lorenzo-Morales ve ark., 2015).

Kültür şartlarına bağlı olarak kist yapısında meydana gelen değişiklikler nedeni ile bu sınıflandırmanın güvenilir olmadığı düşünüldüğünden, araştırmacılar son zamanlarda amibin 18 S rRNA genlerinin sekanslanmasına dayalı tanımlamaya yönelmişlerdir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucu sekans değişikliklerine dayalı 18 farklı genotipin (T1-T18) olduğu bildirilmiştir (Corsaro ve Venditti, 2010; Corsaro ve Venditti, 2011; Gast, 2001; Hewett ve ark., 2003; Horn ve ark., 1999; Qvarnstrom ve ark., 2013; Nuprasert ve ark., 2010 ve Stothard ve ark., 1998). Her bir genotip arasında %5 veya daha fazla sekans farklılığı olduğu gösterilmiştir. Ancak, *Acanthamoeba*'nın patojenitesi bazı genotipler ile sınırlı olup (T1, T2, T4, T6, T10, T11, T12) insan enfeksiyonları ile en sık ilişkili genotip T4'tür (Khan, 2006).

Booton ve ark. (2005), çalışmalarında keratit dışı *Acanthamoeba* enfeksiyonlarında baskın genotipin T4 olduğunu, daha az oranda ise T1, T10 ve T12'nin tespit edildiğini belirtmiştir. Verani ve ark. (2009) ABD'ndeki bir AK salgın araştırmasında izole edilen hasta suşlarının %91'inin T4, diğerlerinin T3 ve T14 olduklarını saptamıştır. Arnalich-Montiel ve ark. (2014) ise AK vakalarında izole edilen baskın genotipin T4, daha az oranda T3 ve T11 olduğunu tespit etmiştir.

1.1.2 Klinik

Acanthamoeba'nın bazı türleri mikroorganizmalara konaklık yapmalarının yanı sıra kendileri de insan için patojen olabilmektedir. SYA ile temas için birçok fırsat olduğu düşünülürse hayvan ve insanlardaki *Acanthamoeba* enfeksiyonları aslında oldukça nadir görülmektedir. Özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda GAE, nazofarengial ve kutanöz acanthamoebiasis ile immun sistemi sağlıklı olan ve çoğunlukla kontakt lens kullananlarda ağırlı keratite neden olabilmektedirler. (Shuster ve Visvesvara, 2004). Sağlıklı insan popülasyonunun %80'den fazlasının *Acanthamoeba*'ya karşı antikorlara sahip olduğu gösterilmiştir. *Acanthamoeba* patojenitesinde amibin muköz adezyon ve doku göçü kapasitesinin de rolü olduğu bilinmektedir (Chappel ve ark., 2001).

GAE, nazofarengial ve kutanöz lezyonlar amibin sistemik enfeksiyonlarıdır. Nazofarengial ve kutanöz enfeksiyonlar, amibin dolaşım sistemi yoluyla merkezi sinir sistemine (MSS) ulaşması sonucu GAE'e dönüşebilmektedir (Trabelsi ve ark., 2012).

GAE, oldukça nadir görülür. Bugüne kadar tüm dünyada yaklaşık 150 vaka bildirilmiştir. GAE tanısının konulmasındaki problemler nedeni ile başka vakaların olduğu fakat yanlış tanı konulması veya tanı konulamaması nedeni ile vaka sayısının az olduğu düşünülmektedir. Fransa'da serebral yayılımı olan tek ve ölümcül *A. lenticulata* GAE vakası rapor edilmiştir (Barete ve ark., 2007). GAE, immun yetmezliği olan kişiler için (özellikle AIDS'li hastalar, diabetik veya organ nakli olan hastalar) fırsatçı ve ölümcül bir hastalıktır. Ancak sağlıklı kişilerden de bazı vakalar bildirilmiştir (Visvesvara ve ark., 2007).

Etken genellikle, alt solunum yolu ve deriden vücuda girdikten sonra hematojen yolla yayılmaktadır. *Acanthamoeba*'nın MSS'ne girişi büyük bir olasılıkla kan-beyin bariyeri yoluyla olmaktadır. Bazı vakalarda, serebrospinal sıvıya ulaşan patojen, koroid pleksus'dan girer. MSS dışında etkilenmiş organlar deri, deri altı dokusu, karaciğer, akciğer, böbrek, böbrek üstü bezi, pankreas, prostat, lenf nodları

ve kemik iliğidir. Kutanöz veya solunum yolu enfeksiyonları birkaç aydan fazla sürede gelişebilmekte ancak MSS tutulumu haftalar içinde ölümcül sonuçlar verebilmektedir. Hastalık oluşturma mekanizması ise hala bilinmemektedir (Khan, 2006 ve Martinez ve Visvesvara, 1997).

Kutanöz acanthamoebiasis ise immun sistemi baskılanmış hastalarda görülen nadir fırsatçı bir enfeksiyondur. İlk vaka AIDS'li bir hasta olup 1986 yılında yayınlanmıştır (Gonzalez ve ark., 1986). Ardından Chandrasekar ve ark. (1997) ve Torno ve ark. (2000), AIDS'li hastalarda kutanöz acanthamoebiasis tespit etmişlerdir.

AK ise çoğunlukla immun sistemi sağlam kişilerde gelişen ve görmeyi tehdit eden oküler bir enfeksiyondur. Başlıca risk faktörleri uzun süreli kontakt lens takılması, korneal travma, steril olmayan lens solüsyonları, lenslerde oluşan biyofilm ve kontakt lens takılı olarak kirli suda yüzülmesidir. Tek gözün etkilenmesi tipiktir ancak çift taraflı keratit de bildirilmiştir. Korneaya *Acanthamoeba* bulaşı, etkenin virulansına ve korneanın fizyolojik durumuna bağlıdır. Korneal travma, kontakt lens kullanan ve kullanmayanlardaki keratitlerin çoğunluğunda görülmektedir. AK saptanan kontakt lens kullanıcılarının %85'inde korneanın zarar gördüğü tespit edilmiştir (Lorenzo-Morales ve ark., 2015 ve Trabelsi ve ark., 2012).

Son yıllarda, gelişmekte olan ülkelerde kontakt lens kullanımındaki artışa bağlı olarak AK vakaları da artmaktadır. Kontakt lens kullanıcıları arasında AK görülme oranının ABD'nde 1,36/milyon, İngiltere'de ise 17-21/milyon olduğu tahmin edilmektedir (Seal, 2003). Walochnik ve ark., (2000a) kontakt lens kullanan 18 keratit hastasının tamamının lens kutularında toplam 20 SYA tespit etmiştir. Tespit edilen SYA'nın 15'inin *Acanthamoeba*, üçünün *Vahlkampfia* ve ikisinin *Hartmannella* cinsi olduğu saptanmıştır. Tespit edilen 15 *Acanthamoeba* suşu arasında da bir *A. polyphaga* ve iki *A. hatchetti* suşu olmak üzere toplam üç virülan suş saptanmıştır. Avusturya'da son 20 yılda, *Acanthamoeba* spp'nin neden olduğu 154 AK, üç de GAE vakası olduğu, AK vakalarında baskın genotipin T4 diğer

genotiplerin T3, T5, T6 ve T11 bunun yanında GAE vakalarında ise T2, T4 ve T5 genotiplerinin neden olduğu tespit edilmiştir (Walochnik ve ark., 2015).

Türkiye’de ilk AK olgusu 1996 yılında Elazığ’da, ikincisi ise 1999’da İzmir’de bildirilmiştir (Akısu ve ark., 1999; Akyol ve ark., 1996 ve Saygı ve Polat, 2003). Ertabaklar ve ark. (2009) kontakt lens kullanan bir hastada AK etkeninin T4 genotipinde *A. castellanii* olduğunu saptamıştır. Ertabaklar ve ark. (2007) kontakt lens kullanmayan bir hastada T4 genotipinde *A. castellanii* ve T9 genotipinde *A. comandoni* türlerinin birlikte neden olduğu bir AK olgusu tespit etmiştir. Ozkoc ve ark. (2008) da kontakt lens kullanmayan bir hastada T4 genotipinde *Acanthamoeba* kaynaklı keratit rapor etmiştir. Erdem ve ark. (2014) ise Türkiye’de ilk bölgesel çalışmayı yaparak kontakt lens ile ilişkili olmayan 26 AK vakası bildirmiştir.

1.2 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae (pnömokok) tüm dünyada bulunan ve akut bakteriyel enfeksiyonlara neden olan bir patojendir. İlk kez kuduzlu bir hastanın tükürüğünden Pasteur tarafından 1881 yılında izole edilmiştir. Etkenin hayvan ve artropod vektörü yoktur. Temel bulaş kaynağı, nazofarenksinde bakteriyi taşıyan asemptomatik kişilerdir. Bulaş, solunum yolu damlacıkları ile kişiden kişiye temas veya üst solunum yollarına etkenin kişi tarafından otoinokülasyonu şeklinde gerçekleşmektedir. Serotip özelliklerine bağlı olarak asemptomatik taşıyıcılıktan otitis media, sinüzit ile menenjit ve pnömoni başta olmak invaziv pnömokokal hastalıklara (İPH) kadar çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Hamborsky ve ark., 2015a). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl 1,6 milyon insan İPH nedeniyle ölmekte ve bunların yaklaşık bir milyonunu beş yaşından küçük çocuklar oluşturmaktadır (Werno ve Murdoch, 2008).

DSÖ, pnömokok kaynaklı olanların da içinde bulunduğu menenjitlerin ve diğer invaziv hastalıkların (pnömoni, bakteriyemi vb.) dünya genelinde azaltılmasına yönelik yaygın bir program yürütmekte olup ülkemizde İPH, bildirimi zorunlu

hastalıklar arasında yer almaktadır. Etkili bir konjugat aşısı bulunması nedeniyle, İPH aşısı ile önlenbilir enfeksiyonlar arasında da yer almaktadır (Akbaş E ve ark., 2014a).

1.2.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri

S. pneumoniae, gram pozitif, lanset şeklinde, fakültatif anaerob bir mikroorganizmadır. Genellikle diplokok şeklinde görünmekle birlikte nadir olarak tek tek veya kısa zincirler şeklinde de bulunabilmektedir. *S. pneumoniae* 35-37 °C ve %5 CO₂'li ortamda rahatlıkla üremekte ve kolonileri koyun kanlı agar plağında alfa-hemolitik, küçük ve gri renkli gözlenmektedir. 24-48 saatlik kültürlerde koloniler düzleşmeye ve ortası çökmeye başlar. Bu koloni morfolojisiyle, viridans streptokoklardan ayrılabilir (Ryan KJ., 2004a).

Bu bakterilerdeki virülans ile ilişkili kapsüler polisakkaritin, antijenik özellikleri ve kimyasal yapısı ile patojenitedeki rolü, 1915-1945 yılları arasında açıkça gösterilmiştir. Kapsüler polisakkaritler, pnömokokların serotip sınıflandırılmasında temel yapılar olup, 2011 yılına kadar tip spesifik antikorlar ile reaksiyona giren 92 serotip olduğu bildirilmiştir. Bu antikorlar opsonizasyonu ve fagositozu gerçekleştirerek etkenin temizlenmesini sağlar. Pek çok serotip hastalığa neden olsa da dünya çapında çoğunlukla belli serotiplerin (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, ve 23F) invaziv enfeksiyonlara yol açtığı gösterilmiştir. (Hamborsky ve ark., 2015a ve Richter ve ark., 2013).

1980'lerin ortalarından itibaren önce penisiline sonra da çoklu ilaca dirençli pnömokokların saptanması, etkenin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanıp, duyarlılık testleriyle birlikte raporlanmasının önemini arttırmıştır. Giderek artan antibiyotik direnci nedeniyle, İPH'in kontrolünde aşılara olan gereksinim ön plana çıkmıştır. Beş yaş altı çocuklarda, enfeksiyonların %80'inden sorumlu pnömokokların kan ve beyin omurilik sıvılarından izole edilen yedi serotipi (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F ve 23F) için üretilen PVC7 konjugat aşısı, 2000 yılında ABD'nde uygulanmaya başlanmıştır.

Bunun ardından ilave altı serotipi içeren (1, 3, 5, 6A, 7F ve 19A) PVC 13 konjugat aşısı da 2010 yılında kullanıma girmiştir (Pilishvili ve ark., 2012 ve Rickter ve ark., 2013). Türkiye’de konjuge pnömokok aşısı 2008 yılında ulusal bağışıklama programına alınmış ve uygulanmaya başlanmıştır.

1.2.2 Klinik

Pnömokok hastalıklarının en önemli olanları başta pnömoni olmak üzere, bakteriyemi ve menenjittir. İPH dünyanın hemen her yerinde çocuk ve erişkinlerde ciddi seyreden enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir. Etken, osteomyelit, septik artrit, endokardit, perikardit, peritonit veya neonatal invaziv enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Bakterinin neden olduğu invaziv olmayan hastalıklar arasında ise akut otitis media, sinüzit, konjonktivit bulunmaktadır. Akut otitis media en sık gözlenen pnömokok enfeksiyonu olup, bu enfeksiyonu altı yaşa kadar hemen her çocuğun geçirdiği tahmin edilmektedir (Hamborsky ve ark., 2015a ve Pilishvili ve ark., 2012).

Pnömokokkal pnömoni, ani başlayan ve titremeye yükselen ateş, plöretik göğüs ağrısı, dispne, takipne, öksürük ve pürülan balgamla karakterizedir. Bebek ve küçük çocuklarda ateş, kusma ve konvülsiyonla da ortaya çıkabilmekte, yaşlılarda ise ateş, dispne ve bilinç durumundaki değişiklikler ilk bulgular olabilmektedir. Hastalığın seyri sırasında olguların %25-30’unda bakteriyemi gelişebilmekte ve kan kültüründe *S. pneumoniae* saptanabilmektedir. Bakteriyemide ortalama vaka ölüm oranı %20 kadardır fakat özellikle yaşlı vakalarda bu oran %60’a kadar yükselebilmektedir (Ryan KJ., 2004a).

Pnömokokkal menenjit, diğer akut bakteriyel menenjitler gibi ani yükselen ateş, letarji veya koma ve meningeal irritasyon bulguları ile karakterizedir. Bilinen risk gruplarının dışında, kohlear implantı veya baziller kırığı olan hastalar da invaziv pnömokokkal hastalık için yüksek risk grubundadır. ABD’inde yılda 3 000-6 000

vaka olduğu, çocuklarda ölüm oranının %8; yetişkinlerde ise %22 oranında olduğu tahmin edilmektedir (Hamborsky ve ark., 2015a).

1.3 *Moraxella catarrhalis*

Üst solunum yollarında kommensal olarak bulunan, yaşamın ilk yılında çocukların büyük bölümünde nazofarenks ve orofarenkste kolonize olan bir bakteridir. Son 20-30 yılda üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olduğu gösterildikten sonra önemsenmeye başlanmıştır. Çocuklarda akut otitis media ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH), yetişkinlerde ise alt solunum yolu enfeksiyonlarının önemli sebepleri arasındadır (Hallström ve ark., 2011).

1.3.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri

İlk olarak 1896 yılında bulunmuş ve *Micrococcus catarrhalis* olarak adlandırılmıştır. *Moraxella* cinsinde sınıflandırılmaya ise 1984 yılından itibaren başlanmıştır (Bernharda ve ark., 2012). Aerop, hareketsiz, katalaz ve oksidaz pozitif, mikroskopik olarak gram negatif, diplokok morfolojide, 0,5-1,5 µm boyutlarında ve yalnız insan patojeni olan bir mikroorganizmadır. Kanlı agar ve çikolata agar gibi pek çok genel üretici besiyerinde 35-37 °C’de bir gecelik inkübasyondan sonra 1-3 mm çaplı düzgün krem renkli koloniler oluşturur (Engelkirk ve Duben-Engelkirk, 2008).

M. catarrhalis, dış membranında “Lipooligosakkarit (LOS)” olarak adlandırılan, benzersiz ve kompleks oligopeptit yapısında bir bileşene sahiptir. LOS, bakterinin önemli bir virülans faktörüdür ve aşı çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılmaktadır. LOS’in yapısal açıdan ufak farklılıkları ile *M. catarrhalis*’in A, B ve C olmak üzere üç serotipi tespit edilmiştir. Hastalık etkeni olarak izole edilen suşların %95’inde bu üç serotipten birisi olduğu bulunmuştur (Frank ve ark., 2015 ve Edward ve ark., 2005).

1.3.2 Klinik

Moraxella türleri normalde genital organ, muköz membran, deri ve orofarenkste bulunmasına rağmen insanlarda ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. En sık izole edilen türü olan *M. catarrhalis*, üst solunum yolu enfeksiyonlarının önemli bir etkenidir. Akut otitis media, kronik otitis media, akut ve kronik sinüzit, üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları ve diyabet, alkolizm, malignite gibi immüniteyi bozan bazı durumlarda menenjit, bakteriyemi, endokardit, keratit ve artrit gibi enfeksiyonlara yol açmaktadır (Ryan ve Ray, 2004).

Akut otitis media çocukluk çağının en sık karşılaşılan bakteriyel enfeksiyonudur ve üç yaşına kadar çocuklarda yaklaşık %80 oranında görülebilmektedir. *S. pneumoniae*, tiplendirilmeyen *H. influenzae* ve *M. catarrhalis* en sık izole edilen etkenler arasında bulunmaktadır (Ruohola ve ark., 2006).

M. catarrhalis, KOAH olan kişilerde alt solunum yolu enfeksiyonlarının önemli etkenleri arasında yer almaktadır. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda da pnömoni, menenjit, endokardit ve septisemi gibi ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Ayrıca nozokomial enfeksiyon etkenleri arasında da yer almakta ve tüm bu nedenlerle önemi her geçen gün artmaktadır. Yine kronik bronşitin akut alevlenmelerinde alt solunum yolu örneklerinde *H. influenzae*'dan sonra ikinci sırada bulunmuştur (Hallström ve ark., 2011; Özerol ve ark., 2002 ve Verduin ve ark., 2002).

Çocuklardaki akut bakteriyel sinüzitlerin %20'sinden *M. catarrhalis* sorumluyken bu oran yetişkinlerde düşmektedir. Özellikle kardiyopulmoner hastalığı olan yaşlı hastalarda nadiren pnömoni etkeni olduğu bilinmektedir. Bunların yanında nadir olarak septik artrit, neonatal menenjit ve endokardite de sebep olduğu gösterilmiştir (Murphy ve Paramesvaran, 2009).

1.4 *Haemophilus influenzae*

Özellikle bebekler arasında çok ciddi enfeksiyonlara neden olduğundan önemini koruyan bir mikroorganizmadır. İlk kez 1892 yılında Pfeiffer tarafından tanımlandıktan sonra 1930'larda kapsüllü ve kapsülsüz suşlarının bulunduğu ve kapsüllü izolatların da altı farklı kapsül çeşidine sahip olduğu anlaşılmıştır. BOS ve kandan izole edilen invaziv suşların ise b tipinde (Hib) olduğu gösterilmiştir. Etkili aşısı bulunana kadar beş yaşın altındaki çocuklarda önde gelen invaziv bakteriyel hastalık ve bakteriyel menenjit etkenleri arasında yer almıştır (Ödek ve ark., 2010 ve Hamborsky ve ark., 2015b).

DSÖ, *H. influenzae*'nin da içinde bulunduğu invaziv hastalıkların (özellikle menenjit, pnömoni, septisemi vb.) dünya genelinde azaltılmasına yönelik yaygın bir program yürütmektedir. *H. influenzae*'nin neden olduğu invaziv hastalıklar, bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır (Akbaş E ve ark., 2014b).

1.4.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri

Haemophilus cinsi bakteriler *Pasteurellaceae* ailesinde bulunan, 0,2-0,3x1,0-2,0 µm boyutlarında, fakültatif anaerop, gram negatif, pleomorfik kokobasillerdir. *H. influenzae* güç üreyen bir mikroorganizmadır. Üremek için ortamda hemin (X faktör) ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD/V faktör) maddelerine ihtiyaç duymaktadır. Bu maddeleri içeren çikolata agar gibi besiyerlerinde en iyi 35-37 °C'de ve ~ %5 CO₂'li ortamda 18-24 saatte düz yüzeyli, renksiz, opak koloniler oluşturmaktadır. *H. influenzae* bu büyüme faktörlerinin her ikisine birden olan gereksinimi nedeniyle aynı zamanda diğer *Haemophilus* türlerinden de ayrılmaktadır (Castillo ve ark., 2011).

Tek konağı insandır. Doğal hayvan konağı yoktur ve cansız yüzeylerde hayatta kalamaz. Hib enfeksiyonu, taşıyıcı veya hastaların solunum yolundan saçılan damlacıklara maruz kalma sonucu gelişir. Doğum öncesi amniyon sıvısının

aspirasyonu veya genital kanal sıvılarına temas yoluyla da bulaşabilir (Hamborsky ve ark., 2015b).

Bakterinin en dışında bulunan polisakkarit yapıdaki kapsülü başlıca virülans faktörü olup organizmayı fagositozdan korumaktadır. *H. influenzae* kapsüllü ya da kapsülsüz olabilmekte, kapsülsüz *H. influenzae* suşları tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) olarak adlandırılırken, kapsüllü türler polisakkarit kapsülün yapısına göre 6 farklı serotipe (a, b, c, d, e, f) ayrılmaktadır. Bunlardan invaziv hastalığa en sık neden olan tür *H. influenzae* tip b (Hib)'dir. Kapsül içermeyen NTHi de invaziv hastalığa neden olabilmektedir (Ryan, 2004b).

1.4.2 Klinik

Kapsüllü suşların etken olduğu invaziv enfeksiyonlar arasında menenjit, bakteriyemi, epiglottit, pnömoni, septik artrit, osteomyelit, perikardit ve selülit bulunmaktadır. Etkili aşının uygulanmasından önce beş yaş altı çocuklarda invaziv *H. influenzae* enfeksiyonlarının %95'inden fazlasına Hib'in sebep olduğu ve ölüme neden olabildiği gösterilmiştir. Çoğunlukla tiplendirilemeyen kapsülsüz suşların neden olduğu mukozal hastalıklar arasında ise bronşit, sinüzit ve otitis media yer almaktadır. (Briere ve Wang, 2015). Polisakkarit ve konjugat aşılardan kullanılmaya başlandığı sırasıyla 1985 ve 1990 yıllarından sonra beş yaşın altındaki çocuklarda invaziv *H. influenzae* enfeksiyonlarının insidansı %99 oranında düşmüştür. Ancak günümüzde başlıca invaziv *H. influenzae* enfeksiyonlarına tiplendirilmeyen suşların sebep olabileceği düşünülmektedir (Briere ve Wang, 2015).

Ülkemizde çocukluk çağı menenjit etkenleri belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada Hib, %18,1 oranı ile meningokok ve pnömokoktan sonra en sık tespit edilen etken olarak karşımıza çıkmaktadır (Ceyhan ve ark., 2014). Çocukluk çağı menenjitlerinde daha sıklıkla görülen meningokok ve pnömokoktan Hib'in en önemli farkı, ülkemiz de dahil gelişmiş ülkelerin hepsinde rutin uygulamaya konmuş ve etkin olduğu gösterilmiş konjuge aşılardan bulunmasıdır (Akbaş ve ark., 2014b).

1.5 *Bordetella pertussis*

Boğmaca, *Bordetella pertussis*'in etken olduğu akut, bulaşıcı bir solunum sistemi enfeksiyonu olup 20. yüzyılın ilk yarısında en sık rastlanan çocukluk çağı hastalıklarından birisi olmuştur. Aşı uygulaması öncesi, ABD'de yıllık 200.000'den fazla vaka görülürken ve çocuk ölümlerinin ana sebepleri arasındayken, aşı uygulamaya başlandıktan sonra vaka oranları %80 oranında düşmüştür. Buna rağmen boğmaca, gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. DSÖ tahminlerine göre 2008 yılında, dünyada yaklaşık 195 000 boğmaca vakası ölümlerine sonuçlanmıştır. Görülme sıklığı, aşı ve antibiyotik öncesi dönemlere göre azalmış olsa da boğmaca halen tüm dünyada endemik olan bir hastalıktır (Hamborsky ve ark., 2015c).

Boğmaca bildirim zorunlu bir hastalık olup T.C. Sağlık Bakanlığı, Genişletilmiş Bağışıklama Programı kapsamında kontrolüne yönelik çalışmalar yürütülmektedir (Akbaş ve ark., 2014c).

1.5.1 Mikroorganizma Genel Özellikleri

Yalnızca insan için patojen olan, küçük, aerop, zor üreyen, hareketsiz, gram negatif, 0,3-0,5 μm x 0,5-2,0 μm boyutunda, kokobasil yapıda bir bakteridir. *B. pertussis* izolasyonu için özel besiyerlerine ihtiyaç duyulmakta ve aerop şartlarda 35-37 °C'de 3-7 gün içerisinde üretilmektedir. En sık kullanılan izolasyon besiyeri olan Bordet-Gengou agar üzerinde düzgün kenarlı, parlak görünümlü koloniler oluşturmaktadır (Gedikoğlu S, 2002).

Bakterinin en önemli virülans faktörleri adezinleri ve toksinleridir. Filamentöz hemaglütinin (FHA) bakterinin temel adezini olup, fagositik hücrelere ve epitel hücrelerine tutunmasında rol oynamaktadır. FHA'nın yapısında Fim 2 veya Fim 3 major alt ünite ve Fim D minör alt ünitelerden oluşan fibrinler bulunmaktadır. Fibrinlerin larenks mukozasının enfeksiyonlarında rol oynadığı gösterilmiştir. Diğer

adezinleri ise pertaktin ve trakeal kolonizasyon faktördür. Her iki protein fagositik hücrelere bağlanmada rol almaktadır. Bakterinin solunum yolu epitel hücrelerinin fonksiyonlarını bozarak etki gösteren “pertussis toksin” (PT), “adenilat siklaz hemolizin” ve “sitotrakeal toksin” olmak üzere son derece önemli üç toksin ürettiği bilinmektedir (Guillot ve Guiso, 2014).

1.5.2 Klinik

Bulaş, enfekte bireylerin solunum salgılarının damlacık yoluyla yayılması sonucu olmakta ve hasta ile ev içinde temas eden bireylerden bağışık olmayanların %90'ı etkeni alabilmektedir. Çocukluk çağı aşılama programlarının etkin bir şekilde uygulandığı gelişmiş ülkelerde bağışıklığın yaşla giderek azalması sonucunda, ergen ve erişkin bireyler boğmacanın önemli bir kaynağı haline gelmişlerdir. Boğmacanın inkübasyon periyodu genellikle 7-10 gün olup (ortalama 4-21 gün) nadiren 40 güne kadar uzayabilir. Tipik hastalığın seyri birbirini takip eden üç dönemden oluşmakta olup bunlar; kataral dönem (1-2 hafta), paroksizmal dönem (1-6 hafta) ve nekahat dönemidir (haftalar veya aylar) (Matto ve Chery, 2005 ve Hamborsky ve ark., 2015c).

Kataral dönem boğmacanın burun akıntısı, gözde yaşarma, halsizlik ve düşük ateş gibi hafif üst solunum yolu enfeksiyonuna benzer belirtiler ile başladığı ve seyrettiği dönemdir. Ardından kuru öksürük başlamakta ve çok geçmeden boğmaca için karakteristik şiddetli öksürük nöbetleri ile paroksizmal dönem gelişmektedir. Bu dönemde bir dizi ekspiratuvar patlama tarzı öksürüğü tipik bir nefes alma sesi (whooping) takip etmektedir. Öksürüğün şiddeti ile hasta siyanotik bir görünüm alır ve kusar. Hasta olan tüm yaş gruplarında öksürük aylarca sürebilmektedir (Ryan, 2004b ve Amirthalingam ve ark., 2012).

Boğmaca çok nadir de olsa aşılansız sağlıklı kişilerde ciddi komplikasyonlara neden olabilmekle beraber, ölüm veya komplikasyon riski en fazla olan bebeklerdir. Tüm yaş gruplarında en sık komplikasyon pnömonidir. Epileptik nöbetler ve

ensefalopati de sadece çocuklar arasında görülmektedir. Nadir olarak, aşılammamış çocuklar arasında da ölüme rastlanabilmektedir (Faulkner ve ark., 2015).

B. pertussis dışında insanda hastalık yapan *Bordetella* türleri *B. parapertussis*, *B. holmesii* ve *B. bronchiseptica*'dır. *B. parapertussis* pertussis toksin üretmediği için hafif seyirli boğmaca benzeri hastalığa sebep olmaktadır. Ancak *B. pertussis* dışındaki bu türlerin neden olduğu hastalıkların bildirimini zorunlu değildir.

1.6 Amip-Bakteri Etkileşimi

SYA ve bunlar içerisinde özellikle *Acanthamoeba*'nın pek çok mikroorganizmaya konaklık yaptığı bilinmektedir. SYA'nın konaklık yaptığı bilinen en fazla çeşitliliğe sahip mikroorganizma grubu bakterilerdir (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Bartonella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Chlamydophila*, *Coxiella*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Mycobacteria*, *Pasteurella*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*). Bunlar dışında virüsler (Mimivirus, Coxsackievirüs, Adenovirüs, Poliovirüs, Echovirüs, Enterovirüs, Vesicular Stomatitis virüs vb.), mantarlar (*Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Sporothrix*, *Histoplasma*, *Streptomyces*, *Exophiala*) ve protistler (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii*) de SYA'ı konak olarak kullanabilmektedir (Guimaraes ve ark., 2016; Khan, 2006; Siddiqui ve Khan 2012a ve Siddiqui ve Khan 2012b).

SYA ile patojen bakterilerin etkileşimine yönelik yapılan ilk çalışmalarda, amiplerle *Legionella pneumophila* ve *Mycobacterium* spp.'nin etkileşimi araştırılmıştır. *L. pneumophila*'nın amipler içerisinde yaşadığı ve çoğaldığı gösterilmiştir. Bu şekilde bakteriler amip içerisinde anti-mikrobiyal ajanlardan korunmakta ve amibin hareketleri sayesinde aktif olarak yayılmaktadır. Gıda ve su kaynaklı patojenlerin de benzer yolla SYA'den faydalandığı gösterilmiştir (Singer, 2010 ve Vaerewijck ve ark., 2014).

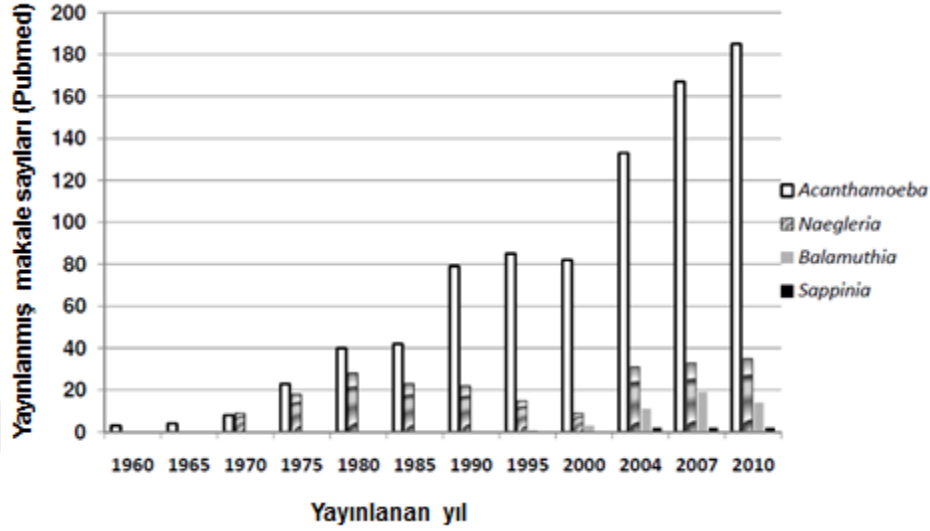
SYA'in patojen bakterilere konaklık ederek bu bakterilerin çevredeki rezervuarı olarak rol almaları üzerine yapılan çalışmalar son elli yılda her geçen gün artmaktadır. *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*, *Mycobacterium* spp, *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazaki* günümüze kadar amiple etkileşimleri üzerinde en fazla araştırma yapılan bakteriler olmuştur (Bar'e ve ark., 2010; Doyscher ve ark., 2013; Obristsch ve ark., 2005; Rahman ve ark., 2008 ve Thomas ve ark., 2010).

Acanthamoeba spp., yaygın olması ve kolay bir şekilde elde edilebilmesinden dolayı amip ile bakteri etkileşiminin araştırıldığı çalışmalarda, en sık kullanılan SYA olarak karşımıza çıkmaktadır. *Acanthamoeba*'nın içinde bakteri barındırdığı ilk kez 1954 yılında gösterilmiştir (Drozanski, 1956). *Acanthamoeba* türlerinin pek çoğunda endosimbiont (başka bir organizmanın içerisinde yaşayan organizma) bakterilerin canlılığını sürdürerek çoğaldığı ve patojen fakültatif mikobakteriler için rezervuar olduğu ilk kez sırasıyla 1975 ve 1978 yıllarında yayınlanan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Proca-Ciobanu ve ark., 1975 ve Krishna-Prasad ve Gupta, 1978). *Acanthamoeba*'nın lejyoner hastalığı ile ilk bağlantısı da 1980 yılında yayınlanan çalışma ile ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda, lejyoner hastalığının bulaş kaynağının serbest bulunan bakteriler yerine bakteri dolu amipler olabileceği ifade edilmiştir (Rowbotham, 1980).

Acanthamoeba'nın, yapmış olduğu çevresel konaklık yanında, *C. burnetii* (Q ateşi) (La Scola ve Raoult, 2001), *Pseudomonas aeruginosa* (keratit) (Michel ve ark., 1995), *V. cholerae* (kolera) (Thom ve ark., 1992), *H. pylori* (gastrik ülser) (Winiecka-Krusnell ve ark., 2002) *L. monocytogenes* (listeriyozis) (Ly ve Müller, 1990) ve *L. pneumophila* (lejyoner hastalığı ve pontiac ateşi) (Berk ve ark., 1998 ve Rowbotham, 1986) patojenlerinin konağa geçerek hastalık oluşturmalarında da vektörlük yaptığı saptanmıştır.

Bu çalışma ve bulguların ardından tüm dünyada, *Acanthamoeba* kullanılarak yapılan araştırmalar ciddi düzeyde artış göstermiştir ve her geçen gün de SYA

kullanılarak yapılan çalışma sayıları artmaktadır (Khan, 2006 ve Siddiqui ve Khan, 2012b). Bu konuda yaklaşık son 50 yılda yayınlanan makale sayıları Şekil 1.3’de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. SYA ile ilgili 1960-2010 yılları arasında yayınlanmış makale sayıları. (Siddiqui ve Khan, 2012b).

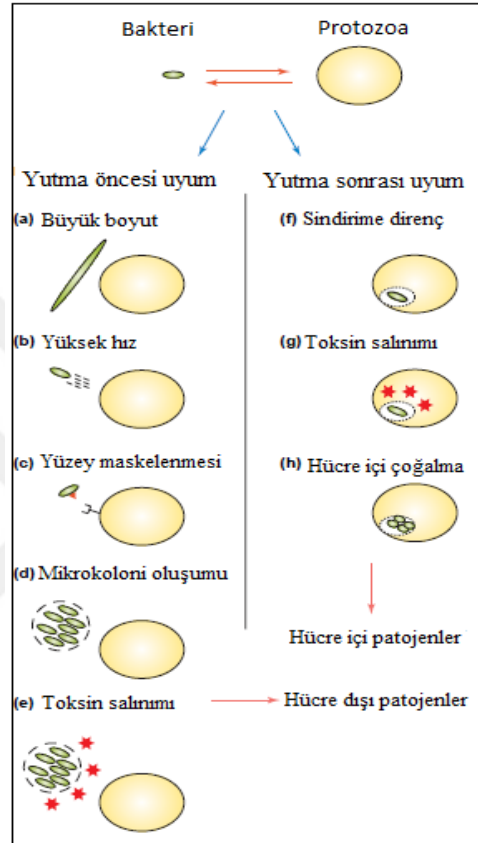
Kültürü yapılamayan *Chlamydia* ve *Rickettsia* gibi endosimbiyont bakterilerin klinik ve çevresel *Acanthamoeba* suşlarında bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca insanda enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Acanthamoeba* suşlarının %26’sında, çevresel izolatların ise %24’ünde çeşitli endosimbiyontların bulunduğu dikkat çekmiştir (Fritsche ve ark., 1993).

Amip-bakteri etkileşimi temas olmadan sadece hücre dışı salgıların varlığında da gerçekleşebilmektedir. Amip salgılarının *Vibrio parahaemolyticus*’un üremesini arttırdığı gözlenmiştir (Laskowski-Arce ve Orth, 2008).

1.6.1 Bakterilerin Amip-Bakteri Etkileşiminde Uyum Mekanizmaları

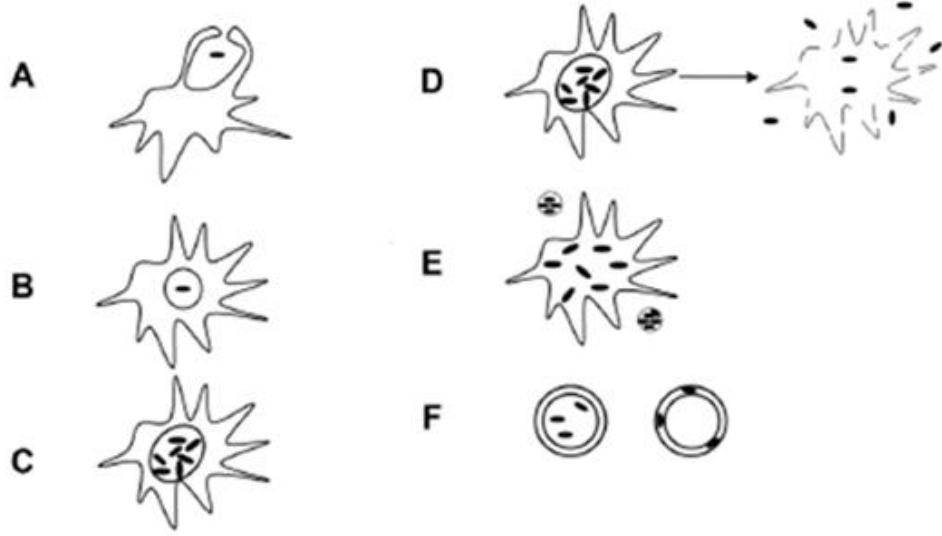
Günümüzde amip-bakteri etkileşimine yönelik araştırmalarda, endosimbiyont bakteri yerine çoğunlukla amip sindirimine dirençli oldukları hatta bazı zamanlarda buldukları amibi parçalamaları sebebiyle “Amibe Dirençli Bakteri” (ADB) tanımı

kullanılmaktadır (Greub ve ark. 2003). ADB'ler, zorunlu hücre içinde bulunan türler ve geçici olarak amip konakta bulunan türler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Greub ve Raoult, 2004). Amibe dirençli hücre içi ve hücre dışı patojen bakterilerin amip sindirimine karşı gösterdikleri uyum mekanizmaları Şekil 1.4'de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Amip bakteri etkileşiminde bakteri uyum mekanizmaları. (Matz ve Kjellebreg, 2005).

Amip tarafından yutulan ancak sindirilemeyen bakterilerle gerçekleşen amip-bakteri etkileşiminde farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bakteri üremeden canlılığını sürdürebilmekte, bakteri amip içerisinde üreyebilmekte, bakteri amip içerisinde üredikten sonra amibi parçalamadan veya parçalayarak çevreye yayılabilmektedir. Bunun yanında amip kisti içerisinde de bakteri bulunabilmekte ve uzun süre kist ile birlikte canlı kalabilmektedir (Barker ve Brown, 1994 ve Vaerewijck ve ark., 2014). Bakterinin amiple olan etkileşiminde ortaya çıkabilecek sonuçlar, Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. ADB'in amip tarafından alınması ve sonraki olası sonuçlar.

A: Bakterinin amip tarafından yutulması B: Amip içerisinde bakterinin canlı kalması (Ör: *Mycobacteria* spp.) C: Amip içinde bakterinin canlı kalması ve çoğalması (Ör: *V. cholerae*) D: Bakterinin çoğalması ve amibin parçalanmasından sonra serbest kalması (Ör: *Legionella* spp. ve *L. monocytogenes*) E: Bakterinin amipten dışarı atılması F: Kist veya kist duvarı içerisinde bakterinin canlı kalması (Ör: *Legionella* spp. ve *Mycobacteria* spp.) (Vaerewijck ve ark., 2014).

1.6.2 Amip-Bakteri Etkileşiminin Önemi

SYA'in, özellikle bakterilerle beslenerek canlılıklarını sürdürürken patojen bakterilerle etkileşime girdiği ve bakterilerin bu birliktelikten pek çok fayda sağladığı gözlenmiştir.

Bakteriler, SYA'in sindiriminden korunmak için geliştirdikleri kaçma/savunma mekanizmaları ve stratejilerini insanların savunma sisteminin önemli elemanı olan makrofaj hücreleri karşısında dayanıklı kalmak için de kullanırlar (Bozue ve Johnson, 1996 ve Cirillo ve ark., 1997; Bruggemann ve ark., 2006). Bu nedenle, amiplerin patojen bakteriler için "biyolojik antrenman ortamı" (Harb ve ark., 2000), "evrimsel geliştirici" (Greub ve Raoult, 2004) veya "eğitim alanı" (Molmeret, 2005) şeklinde görev yaptığı düşünülmektedir. Amibin, bakterilerin insandaki birincil savunma sisteminden kaçmasını sağlayacak şekilde, adeta bir "Truva atı" gibi görev yaptığı da belirlenmiştir (Greub ve Raoult, 2004).

Amiple etkileşime giren bazı bakteri suşlarının virülanslarının arttığı gösterilmiştir. Cirillo ve ark. (1997)'nin çalışmasında amiple etkileşime giren *M. avium* suşunun normal kültür şartlarında üretilen suşlardan daha virülan olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, *L. pneumophila*'nın virülansında da amip ile etkileşimi sonucu bir artış olduğu tespit edilmiştir (Cirillo ve ark., 1999 ve Koubar ve ark., 2011).

Bazı bakterilerin *Acanthamoeba* ile girdikleri etkileşim sonucunda, klor bazlı ve benzeri dezenfektanlar ile antibiyotiklere karşı dayanıklılıkları da artmaktadır (King ve ark., 1988). *L. pneumophila*'nın amip içerisinde üredikten sonra rifampin ve siprofloksasine karşı 1000 kat direnç kazandığı gösterilmiştir (Barker ve ark., 1993). Miltner ve Bermudez (2000) ise *A. castellanii* ile birlikte bulunan *M. avium*'a karşı rifabutun, azitromisin ve klaritromisin'in etkili olmadığını saptamıştır.

L. pneumophila'nın *A. polyphaga* kisti içerisinde yüksek düzey klor (>50 mg/L) oranlarında canlılığını koruduğu bulunmuştur (Kilvington ve Price, 1990). Bunun yanında *C. jejuni*'nin *A. castellanii* ile etkileşimi sonucunda, gıda alanında kullanılan Virudin adlı dezenfektana anlamlı düzeyde dirençli olduğu tespit edilmiştir (Snelling ve ark., 2005). Steinert ve ark. (1998) ise *M. avium*'un *A. polyphaga* kisti içerisinde canlılığını koruyarak uygunsuz çevresel ortama uyum sağladığını gözlemlemiştir.

Amiplerin patojen bakterilerin üremesini ve patojenitesini arttırması yanında, bazı durumlarda, ADB'inde, amibin üremesini, canlılığını ve virülansını arttırdığı ve kistleşmesini geciktirdiği belirlenmiştir. *A. castellanii*'nin farklı bakterilerle birlikteliğinin (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* ve *S. aureus*) trofozoitlerin canlılık süresini ve üremesini arttırdığı ve kistleşmesini geciktirdiği bulunmuştur (Moraes ve Alfieri, 2008). Endosimbiont içeren *Acanthamoeba*'nın ise fibroblast hücreleri üzerine daha fazla sitopatik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Fritsche ve ark., 1998). Ancak *Acanthamoeba* virülansının sadece amip içerisinde bulunan bakterilere dayandırılmayacağı belirtilmektedir (Paterson ve ark., 2011).

Amip'in bakterilerle birlikte bulunmasının insanlarda enfeksiyon yapabilmesinde kolaylaştırıcı olduğu belirtilmektedir. AK'inde bakteri varlığının rol oynadığı ve kontakt lens yüzeyinde *P. aeruginosa* varlığının trofozoitlerin lense tutunarak AK oluşturma şansını arttırdığı ortaya konulmuştur (Simon ve ark., 1998 ve Winiecka-Krusnell ve Linder 2001).

Bakteri veya amip lehine ortaya çıkan bu durumların nedenleri araştırılırken amip içerisindeki bakterilerin konak ve/veya kendi aralarında genetik materyallerini değiştirebildiği bulunmuştur. Suşların daha dayanıklı ve daha virülan özellik kazanması bu şekilde açıklanmaya çalışılmaktadır (Bertelli ve Greub, 2012; McCuddin ve ark., 2006 ve Moliner ve ark., 2010).

Günümüzde *Acanthamoeba*, laboratuvar koşullarında bakterilerin memeli hücrelerindeki patogenezi mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılabilir. Patojen-konak etkileşimine yönelik olan bu çalışmalarda memeli hücresi kullanılması uzun üreme döngüsü, hücrelerin elde edilme zorluğu, yasal ve etik gerekliliklerden dolayı sorunlu bir durumdur. *Acanthamoeba*'nın konak olarak yer aldığı modeller, pek çok patojen bakterinin patogeneziinde rol oynayan yeni genlerin tanımlanması, konak hücrenin vereceği cevapların araştırılması ve mikroorganizmalara karşı ilaç ve aşı çalışmalarının yapılabilmesini sağlamaktadır (Sandström ve ark., 2011).

Amip bakteri etkileşiminin kullanım alanlarından birisi de özellikle zor üretilen *Legionella*, *Mycobacteria* ve *Chlamydia* benzeri hücre içi mikroorganizmaların laboratuvar şartlarında üretilmesidir. Amip ko-kültürü ya da amiple zenginleştirme yöntemlerinin kullanılması ile klinik ve çevresel örneklerden, özellikle yeni patojen bakterilerin tespiti yönünde ilerlemeler sağlanabilecektir (Greub ve ark., 2004 ve Jacquier ve ark., 2013). Scola ve ark. (2001), *Legionella anisa* suşunu ve Adekambi ve ark. (2004) *Mycobacterium massiliense* suşunu balgam örneklerinden amip ko-kültürü kullanarak izole etmişlerdir.

SYA'in bakteriyel patojenlerin canlılığının devamı, üremesi ve yayılımında kolaylaştırıcı bir rol alması, bakterilerin yararına olmakta ve bu durum muhtemel halk sağlığı riski olarak karşımıza çıkmaktadır (Siddiqui ve Khan, 2012a).

1.6.3 Çevresel örneklerde SYA'in varlığı

Türkiye'de SYA ile ilgili olarak yapılan çalışmaların hemen hepsi, su ve diğer çevresel örneklerde SYA varlığının araştırılmasına yöneliktir. Kılıç ve ark. (2004) tarafından Türkiye'de ilk kez *Acanthamoeba* suşlarının çevresel dağılımının bildirildiği çalışmada, toplam 30 çevresel örneğin 18'inde amip tespit edilmiştir. Özçelik ve ark. (2012), Sivas ilinde çeşme suyu örneklerinin %29,4'ü ve çevresel su kaynaklarının %33,3'ünde SYA (*Acanthamoeba spp.*, *Naegleria spp.* ve *Hartmannella spp.*) saptarken, Ataş (2012) şebeke sularının %9,33'ünde *Acanthamoeba spp.* izole etmiştir.

Kayseri ilinde, Yazar ve ark. (2011) kuyu sularında %19,2 oranında SYA (*Acanthamoeba spp.*, *Naegleria spp.*) bildirirken, Doğan ve ark. (2013) toprak örneklerinde %40 *Acanthamoeba* ve %13 *Naegleria* tespit etmiştir. *Acanthamoeba keratiti* tanısı konulan 10 hastanın evinden alınan çeşme suyu örneklerinin incelendiği bir çalışmada ise Eroğlu ve ark. (2011), tüm su örneklerini *Acanthamoeba spp.* yönünden pozitif bulmuştur. Araştırmacılar, su örneklerinde bu kadar yaygın SYA tespit edilmesini, hem amibin kendisi hem de amibin taşıdığı çeşitli bakteriler nedeni ile halk sağlığı yönünden riskli bir durum olarak değerlendirmiştir.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda özellikle çevresel su örneklerinde SYA bulunma oranının %20-%92,9 arasında olduğu görülmektedir. Tung ve ark. (2013) Tayvan'daki rekreasyonel sularda *Naegleria spp.* ve *Acanthamoeba spp.* bulunma oranını sırasıyla %32 ve %20 olarak saptamıştır. Mısır'da farklı su çeşitlerinde yapılan araştırmada Al-Herrawy ve ark. (2014) *Naegleria spp.* bulunma oranını %38 olarak tespit etmiştir. Wang ve ark. (2014) ise Çin'deki çalışmasında, su örneklerinde

Naegleria spp. oranını %92,9 olarak bulmuştur. Hindistan'daki bir çalışmada su örneklerinde %40 oranında SYA olduğu tespit edilmiştir (Panda ve ark., 2015). Lass ve ark. (2014) da çevresel yüzey sularında *Acanthamoeba* spp. bulunma oranını %65 olarak bildirmiştir.

1.6.4 Solunum yolu patojeni bakteriler ile SYA'in etkileşimi

Günümüzde, su kaynaklı salgınların pek çoğunda fekal-oral yolla bulaşan patojenler tanımlanmış ve artırılmış içme sularının dışkı ile kirlenmesi sorumlu tutulmuştur. Ancak *Legionella*, legionella-benzeri amip patojenleri (LBAP) ve su kaynaklı *Mycobacterium* gibi su kaynaklarında bulunabilen ve toplum kaynaklı pnömoni (TKP) olarak bilinen akut solunum yolu hastalığıyla sonuçlanan enfeksiyona neden olabilen patojenlere ilgi de giderek artmaktadır (Lamoth ve Greub, 2010). Bu patojenlerle birlikte, toplumsal içme suyu sistemlerinde yer alan biyofilm tabakasında bulunabilen *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *C. burnetii* gibi ADB'in özellikle solunum yolu enfeksiyonları oluşturma potansiyelleri yönünden dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır (Ashbolt, 2015a).

Legionella'nın SYA ile etkileşimi sonucunda insan hastalıklarına neden olma potansiyelinde bir artış olduğu bilinmektedir (Cirillo ve ark. 1994 ve Cirillo ve ark., 1999). Bunun yanında, LBAP olarak adlandırılan, 1'den 14'e kadar numaralandırılarak isimlendirilen ve kültürü yapılamayan gram negatif basil şeklindeki mikroorganizmaların insanlarda solunum yolu hastalıklarına neden olabileceği ve amip bulunan deneysel ortamlarda üretilebileceği ortaya konmuştur. Pnömonili bir hastanın balgam örneğinden amiple yapılan zenginleştirme kültüründe LBAP tespit edilmiştir. (Adeleke ve ark 1996 ve Marciano-Cabral ve Cabral 2003). LBAP'nin insan patojeni olarak rolü tam olarak anlaşılammış olsa da pnömoni hastalarının serumlarında LBAP'ne karşı antikor saptanması, bu organizmaların TKP'de rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Marrie ve ark., 2001).

Feazel ve ark. (2009), duş başlıklarında %28,1 oranında *Mycobacterium* spp. ve %1 oranında *Streptococcus* spp. tespit etmiştir. Bu alışma sonucunda duş yaparken kontamine şebeke suyuna maruz kalmanın, TKP'nin bulaş yollarından birisi olabileceği değerlendirilmiştir. Pagnier ve ark., (2008) ise 77 çevresel su örneğinden, bir kısmı solunum yolu hastalıklarına neden (*Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella* spp., *Legionella anisa*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. vb.) olan 89'u farklı türden oluşan toplam 244 bakteri suşu saptamıştır.

Avrupa'da TKP sıklığının yetişkinlerde 1,6-9/1000, beş yaş altı çocuklarda 36/1000 ve 74 yaş üzeri kişilerde 34,2/1000 olduğu görülmektedir. Suda bulunan patojenler nedeni ile meydana gelen ve yoğun bakım ünitelerinde tedaviyi gerektiren TKP oranının ise yaklaşık %8 olduğu ancak bu oranın, vakaların yaklaşık yarısında etken tanımlanamadığı için tahmin edilenin altında olduğu düşünülmektedir (Lamoth ve Greub, 2010 ve Woodhead, 2002).

TKP nedeni ile ayaktan tedavi gören hastalarda etken olarak *S. pneumoniae* %14'lk oran ile nc, *H. influenzae* %1 ile altıncı sırada yer almaktadır. Yatarak tedavi edilen ancak yoğun bakıma alınmayan hastalarda *S. pneumoniae* %25 ile birinci, *H. influenzae* %5 ile dördüncü sırada etken olurken; yoğun bakıma alınan hastalarda *S. pneumoniae* %17 ile birinci, *H. influenzae* ise %3 ile altıncı sırada izole edilmektedir. Ancak dikkat çeken en önemli konu, her üç hasta grubunun ortalama %40'ında herhangi bir etkenin saptanamamasıdır (Watkins ve Lemonovich 2011). *S. pneumoniae* ve *H. influenzae* dışında altta yatan sebeplere bağlı olarak *M. catarrhalis* ve *B. pertussis*'in de TKP'ye neden olabileceği belirtilmektedir (Mandell ve ark., 2007).

Türkiye'den bir çalışmada şenol ve Eriş (2000), pnömoni hastalarından alınan balgam ve bronş aspirasyon örneklerinden izole edilen *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* oranını sırasıyla %16, %12 ve %7 olarak bulmuştur.

Ulaşabildiğimiz literatür bilgilerine göre, tez çalışmasında amiple etkileşimi araştırılması planlanan solunum yolu patojenlerinden *S. pneumoniae* ile ilgili sadece

bir çalışma bulunmaktadır. Evastigneeva ve ark. (2009), *S. pneumoniae*'nin *A. polyphaga* varlığında amip içerisine girerek ürediğini göstermiştir. Bunun yanında tez çalışmasında kullanılan *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* ile gerçekleştirilmiş amip bakteri etkileşimine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Türkiye'de yapılan bir araştırmada ise Ankara'daki fiskiyeli havuzlardaki SYA'in varlığı araştırılmış ve *H. vermiciformis*, *Acanthamoeba* spp., *N. fowleri* ve *Vanella* spp. olmak üzere su örneklerinde kültür yöntemi ile %39,8 moleküler yöntemle %79,6 oranında çeşitli SYA saptanmıştır. Bununla birlikte aynı su örneklerinde solunum yolu patojenlerinden *S. pneumoniae* *Mycobacterium* spp., *H. influenzae*, *C. pneumoniae* ve *B. pertussis* varlığı da moleküler testlerle gösterilmiştir. Ancak amipler ile bakterilerin nasıl bir ilişki içerisinde olduğu anlaşılamamıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bu bulgular doğrultusunda, bu amiplerin bakterilerin yayılımında rolü olabileceği hipotezi kurulmuştur (Erci ve ark., 2013).

1.7 Tezin Amacı

Amip ve bakteri etkileşimine yönelik yapılan çalışmalarda, patojen bakterilerin başta *Acanthamoeba* spp. olmak üzere SYA içerisine girerek ve/veya amip dışında etkileşime girdiği görülmektedir. Bu etkileşim sonucunda bakteri suşları çevresel ortamda daha uzun canlılıklarını sürdürebilmekte, sayılarını arttırabilmekte, uzak mesafelere yayılabilmekte, virülan özellik kazanabilmekte, antibiyotik ve biyosidal ürünlere direnç geliştirebilmekte ve hatta amip hücrelerini bir antrenman alanı olarak kullanarak, insan vücudundaki fagositoz yoluyla oluşan savunma mekanizmalarına karşı hazırlanabilmektedir. Bunun yanında, *Acanthamoeba* spp. suşlarının da bazı bakterilerle etkileşime girdiğinde, canlılıklarında ve/veya patojenitelerinde artış ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle amip ve/veya bakteri avantajına gerçekleşebilecek amip-bakteri birlikteliğinin, halk sağlığı açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında, tüm dünyada çoğunlukla hastalardan izole edilen amip ve bakteri suşları kullanılarak, amip-bakteri etkileşiminin gösterilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda, çevresel ortamlarda SYA'nın varlığı, bunların patojen bakterilerle etkileşime girip girmediği ve bu durumun bakteri ve/veya amip lehine avantajlı durumlar ortaya çıkarıp çıkarmadığı araştırılmaktadır.

Türkiye'de farklı illerde yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde çevresel örneklerde, başta *Acanthamoeba* olmak üzere SYA'nın tespit oranının %13-40 arasında olduğu görülmektedir (Coşkun ve ark., 2013; Doğan ve ark., 2013 ve Özçelik ve ark., 2012). Tespit edilen bu yüksek oranlara rağmen, SYA'nın patojen bakteriler ile göstermiş olduğu etkileşime yönelik yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, yerel bakteri suşlarının çevresel canlılık ve yaygınlıklarında SYA'nın nasıl bir rol oynadığı bilinmemektedir. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de yerel suşlar kullanılarak SYA ile bakteri etkileşimine yönelik çalışmalar yapılması ve mevcut durumun bilimsel çalışmalarla ortaya çıkarılması gerekliliği doğmuştur.

Bunun yanında, *B. pertussis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis*'i içeren solunum yolu patojenlerinin SYA ile etkileşimine yönelik in vitro çalışmaların Türkiye ve dünya'da yapılmadığı ancak birkaç çalışmada tesadüfen bu patojenlerin SYA ile ilişkilendirildiği görülmektedir (Erci ve ark., 2013 ve Evastigneeva ve ark., 2009). Bu solunum yolu patojenleri ile SYA birlikteliğini işaret eden çalışmaların devamı niteliğinde araştırmaların yapılması ve SYA ile patojen bakteri etkileşim düzeyi ve şeklinin ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, Türkiye'de ilk defa, hastalardan izole edilen bakteri suşları kullanılarak, amip-bakteri etkileşimine yönelik in vitro araştırmalar yapmak; *A. hatchetti* ile literatürde gösterilmemiş veya çok az çalışılmış olan, *B. pertussis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* arasında nasıl bir etkileşim olduğunu ortaya çıkarmak amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda toplum kökenli solunum yolu enfeksiyon etkenleri olarak karşılaşılabileğimiz bu bakterilerin çevrede yaygın olarak bulunan *Acanthamoeba* türleri tarafından taşındığının ve/veya üretildiğinin gösterilmesi durumunda önemli bir epidemiyolojik veriye ulaşılmış olacaktır. Böylece çevresel ortamlardan, özellikle su kaynaklarından (şebeke, havuzlar, kaplıca vb.) amip varlığında canlı kalabilen, üreyebilen ve çevre koşullarına dayanabilen solunum yolu patojenlerinin yayılma potansiyeli ortaya konabilecektir. Belirlenen solunum yolu patojenlerinin çevresel ortamda amip ile bulunması durumunda bunun halk sağlığını olumsuz etkileyebileceği gösterilecektir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 *Acanthamoeba* spp. Kültürünün Yapılması

Aksenik kültür için *Acanthamoeba hatchetti* 2HH suşu kullanılmıştır. *A. hatchetti* 2HH suşu, bir korneal izolat olup 18 rDNA dizilimi T4 genotipine sahiptir ve GenBank giriş numarası AF260722 şeklindedir (Walochnik ve ark., 2000b). Bu suş, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zübeyde Akın Polat'tan temin edilmiştir.

A. hatchetti'nin aksenik kültürü, 10 mL proteose pepton yeast extract glukoz medium (PYG: Proteose peptone 20 g/L, yeast extract 5 g/L, glukoz 10 g/L) içeren T-25 (TPP, 90026, 25 cm² yüzey alanına sahip) hücre kültür şişeleri içinde oda sıcaklığında inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir (Fieseler ve ark., 2014; Greub ve Raoult, 2004 ve Schuster, 2002). Kültürlerin 3-5 gün inkübasyonu ardından, hem amip pasajlarında hem de deneylerde kullanılmak üzere “amip kullanım süspansiyonu” hazırlanmıştır.

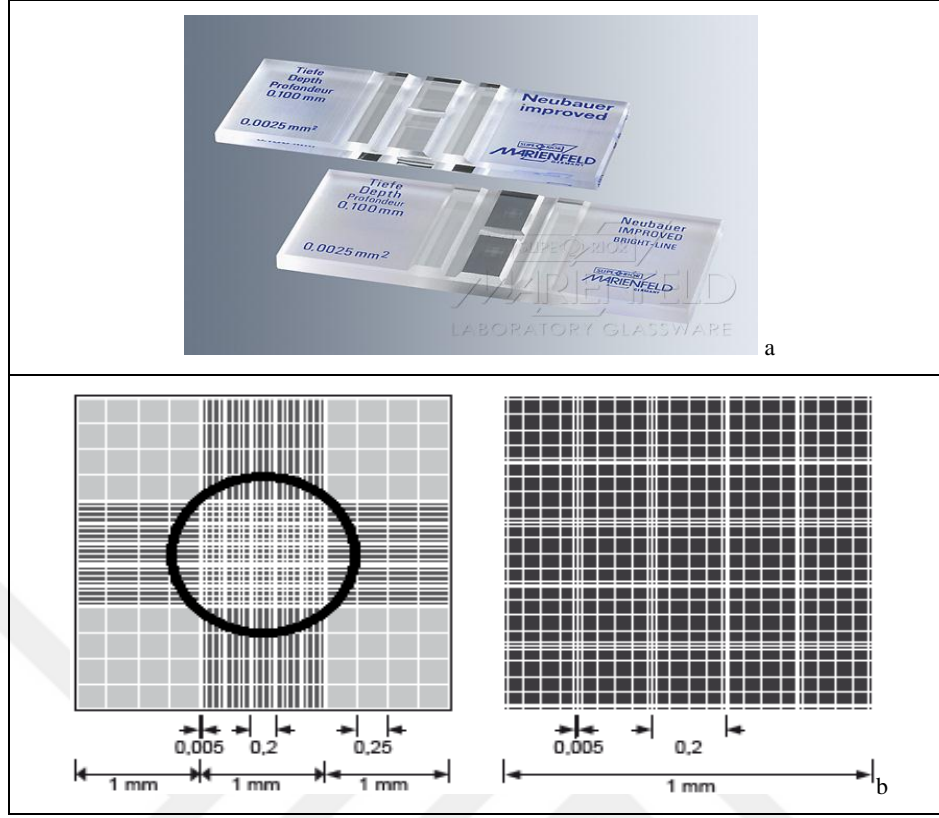
2.1.1 Amip Kullanım Süspansiyonu Hazırlanması

İnkübasyonun ardından, her bir T-25 hücre şişesindeki amip kültürü hücre kazıyıcı kullanılarak kazınmış ve kültürün tamamı pipet yardımı ile 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kültür, 300xg'de 5 dakika santrifüj (Herolab UniCen 15DR) edildikten sonra üst kısım atılmış ve çökelti Page's Amoeba Saline (PAS: 0,012 g/L NaCl, 0,004 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 0,004 g/L CaCl₂ x 6 H₂O, 0,142 g/L Na₂HPO₄, 0,136 g/L KH₂PO₄) ile süspansiyon edilmiştir. Santrifüj işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra üst kısım atılmış ve elde edilen amip çökeltisi, PYG (besleyici ortam koşulu) veya PAS (besleyici olmayan ortam koşulu) ile 2-5x10⁵ amip/mL içerecek şekilde homojenize edilerek “amip kullanım süspansiyonu” hazırlanmıştır (Douesnard-Malo ve Daigle, 2011 ve Lambrecht ve ark., 2013).

Yeni amip pasajlarının yapılması için süspansiyondan 500 µL alınarak, 10 mL taze PYG bulunan T-25 hücre şişesine eklenmiş ve Bölüm 2.1’de belirtilen koşullarda inkübe edilmiştir.

2.1.2 Amip Kullanım Süspansiyonunda Sayım ve Canlılık Kontrolü

Amip kullanım süspansiyonunda sayım ve canlılık kontrolü, Neubauer hücre sayma lamı (Marienfeld-Superior) ve trypan blue boyası (Sigma T-6146) kullanılarak üreticilerin önerileri doğrultusunda yapılmıştır (Bastidas, 2016; Frei M, 2016; Marienfeld-Superior Counting Chamber Manual 2010 ve Trypan Blue Exclusion Protocol, 2016). Özetle, amip kullanım süspansiyonundan 100 µL başka bir tüpe alınarak üzerine %0,4’lük trypan blue boyasından 100 µL eklenmiştir. Daha sonra bu tüpten 10 µL alınarak lam-lamel arasında preparat hazırlanmış ve 40x büyütme kullanılarak mikroskopta (Nikon, Eclipse E200) sayım yapılmıştır. Neubauer lamının merkez karesinde bulunan toplam amip sayısı 10 000 ile çarpılarak mL’deki amip sayısı hesaplanmıştır. Boyayı içerisine alarak mavi görünen amipler ölü olarak değerlendirilmiş ve tez çalışmalarında canlılık oranı %95’in üzerinde olan süspansiyon kullanılmıştır. Kullanılan Neubauer sayma lamına ait resimler Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Amip sayım ve canlılık kontrolü için kullanılan neubauer sayma lamı.
a: Neubauer sayma lamı, b: Sayım için kullanılan merkez kare (Marienfeld-Superior Counting Chamber manual, 2010).

2.2 Bakteri Suşları Kültürlerinin Yapılması

2.2.1 *B. pertussis* Kültürü

Kültür için Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Laboratuvarı'ndan temin edilen hasta suşu kullanılmıştır.

Kültür, bordet gengou agar (BGA) besiyeri kullanılarak 36 ± 1 °C'de aerobik koşullarda 3-4 gün inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir (Zee ve ark., 2015). Tez çalışmaları için “bakteri kullanım süspansiyonu” BGA'da üretilmiş taze kültür kullanılarak Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

2.2.2 *H. influenzae* Kültürü

Kültür için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen hasta suşu kullanılmıştır.

Kültür, çikolata agar (ÇA) besiyeri kullanılarak 36 ± 1 °C'de %5 CO₂'li ortamda 18-24 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir (Castillo ve ark., 2011). Tez çalışmaları için “bakteri kullanım süspansiyonu”, ÇA'da üretilmiş taze kültür kullanılarak, Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

2.2.3 *S. pneumoniae* Kültürü

S. pneumoniae kültürü için Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Laboratuvarı'ndan temin edilen hasta suşu kullanılmıştır.

Kültür, koyun kanlı agar (KKA) besiyeri kullanılarak 36 ± 1 °C'de %5 CO₂'li ortamda 18-24 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir (Ryan KJ., 2004a). Tez çalışmaları için “bakteri kullanım süspansiyonu”, KKA'da üretilmiş taze kültür kullanılarak, Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

2.2.4 *M. catarrhalis* Kültürü

M. catarrhalis kültürü için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen hasta suşu kullanılmıştır.

Kültür, Beyin-kalp infüzyon agar (BKİA) besiyeri kullanılarak 36 ± 1 °C'de %5 CO₂'li ortamda 18-24 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir (Tiller PM, 2014). Tez çalışmaları için “bakteri kullanım süspansiyonu”, BKİA'da üretilmiş taze kültür kullanılarak, Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

2.2.5 Birincil Bakteri Süspansiyonu ve Bakteri Kullanım Süspansiyonu Hazırlanması

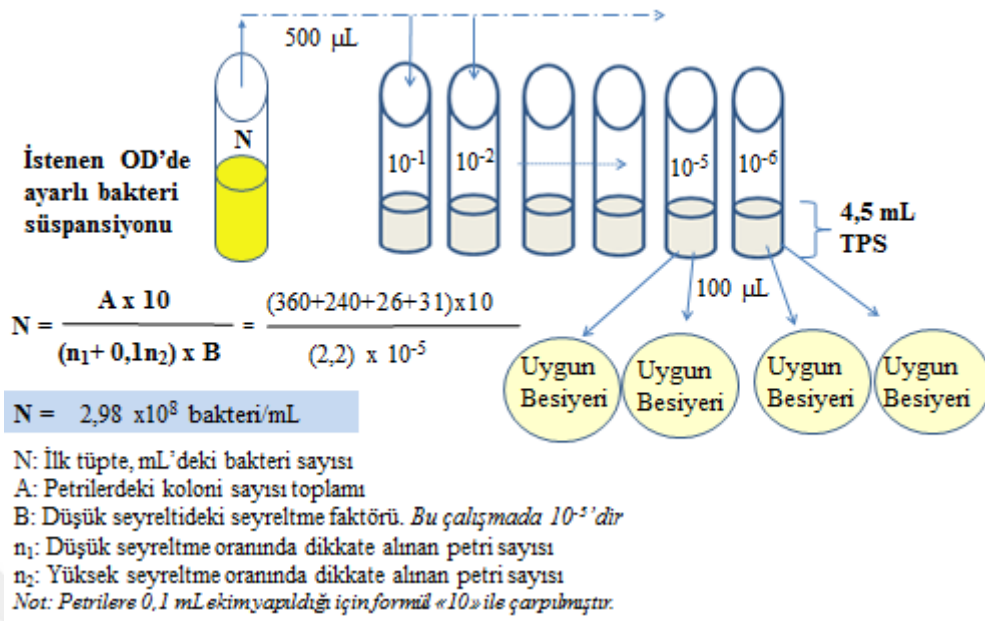
Birincil bakteri süspansiyonu (N), bakterilerin taze kültürü kullanılarak tuzlu peptonlu su (TPS: NaCl 0,85 g/L, pepton 1 g/L) içerisinde $1-5 \times 10^8$ bakteri/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Özetle, TPS içerisinde homojenize edilen taze bakteri kültürü 620 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede (PGI T-60 UV-VIS) *B. pertussis* için $0,150 \pm 10$ optik dansite (OD); *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* için ise $0,280 \pm 10$ OD bulanıklıkta olacak şekilde ayarlanmıştır.

“Bakteri kullanım süspansiyonu” ise bu ilk süspansiyonun çalışmaya yetecek miktarda PAS veya PYG içerisinde, 1:10 oranında seyreltilmesi ile hazırlanmış ve tez çalışmalarında kullanılmıştır.

2.2.6 Bakteri Süspansiyonlarının Sayım Kontrolü

Bakteri kullanım süspansiyonlarının istenen sayıda bakteriye sahip olup olmadığı, TS EN 1276/2010 standardında belirtilen şekilde yapılan sayım kontrolleri ile gösterilmiştir.

Bölüm 2.2.5'te belirtildiği şekilde OD'si ayarlanan her bir bakteri süspansiyonundan 500 µL alınarak 4,5 mL TPS içerisine aktarılması ile seyreltme serileri hazırlanmıştır. Seyreltme oranı 10^{-5} ve 10^{-6} olan tüplerden 100'er µL alınarak 90 mm çaplı petri kaplarındaki uygun besiyerlerine yayma plak metodu ile ekim yapılmış ve Bölüm 2.2'de anlatılan şekilde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından birincil tüpteki bakteri konsantrasyonu, ağırlıklı ortalama formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Sayım kontrolü için gerçekleştirilen çalışma ve hesaplama formülü Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bakteri kullanım süspansiyonu sayım kontrolü çalışma düzeneği. (TS EN 1276, 2010).

2.3 Hücre Dışı Bakteri-Amip Etkileşimi

Hücre dışı bakteri-amip etkileşiminin amip ve bakteri canlılığı üzerine etkisi farklı besin koşullarında hazırlanan direkt ko-kültürlerin farklı sıcaklıklarda inkübasyonu ile araştırılmıştır (Fieseler ve ark., 2014; Lambrecht ve ark., 2013; Huws ve ark., 2008).

Besleyici olmayan ortam koşulu için PAS, besleyici ortam koşulu için PYG kullanılarak bakteri-amip oranının 100:1 olduğu ko-kültürler hazırlanmış ve bunlar 6 °C, 25 °C ve 36 °C'de olmak üzere üç farklı sıcaklık koşulunda inkübe edilmiştir. Deney ve kontrol kuyucuklarından 1., 2., 3., 5. ve 7. günlerde alınan örneklerde amip ve bakteri sayımları yapılmıştır.

2.3.1 Direkt Ko-kültürlerin Hazırlanması

Direkt ko-kültürler 24 kuyucuklu düztabanlı plaklar (Corning, Costar, CLS 3524) kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir bakteri ve sıcaklık için ikişer adet olmak üzere bakteri başına altı, dört bakteri için ise toplamda 24 adet plak kullanılmıştır.

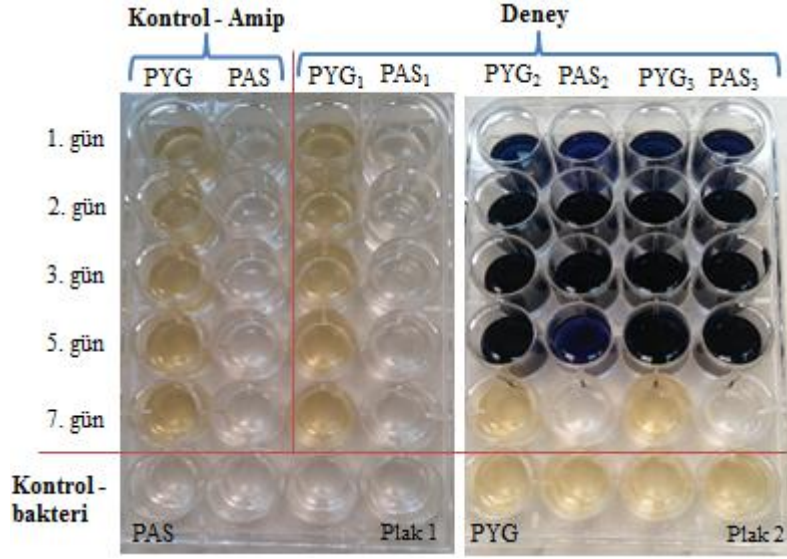
Kuyucuklara, düşük ve yüksek besin şartlarının kontrolü için sırasıyla PAS ve PYG içerisinde ayrı ayrı hazırlanmış amip kullanım süspansiyonundan ($2-5 \times 10^5$ amip/mL) 500 μ L eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında amiplerin çökmesi beklenmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan pipet yardımıyla üstte kalan sıvı kısım toplanmıştır.

Deneylerde zemininde amip bulunan kuyucukların üzerine, PAS ve PYG içerisinde hazırlanmış bakteri kullanım süspansiyonundan 1'er mL eklenmiştir. Kontrol amacıyla sadece amip ve sadece bakteri kültürlerini içeren kuyucuklar kullanılmıştır. Amip kontrolü için, zeminde amip bulunan kuyucuklar üzerine taze PAS ve PYG'den 1'er mL eklenmiştir. Bakteri kontrolü için ise PAS ve PYG içerisindeki bakteri kullanım süspansiyonundan boş kuyucuklara 1'er mL konulmuştur. Tüm çalışmalar üç paralel olacak şekilde yapılmıştır.

2.3.2 Amip ve Bakteri Sayımları

Bakteri sayımı için kuyucuklardan 100 μ L alınarak 900 μ L TPS içerisinde seyreltme serisi hazırlanmıştır. Her seyreltiden 100 μ L bakteriye uygun besiyerine, yayma plak metodu ile ekilmiş ve Bölüm 2.2'de belirtilen şekilde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Bakteri sayımı için örnek alındıktan sonra amip sayımı, Bölüm 2.1.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Hücre dışı amip-bakteri etkileşimi için yapılan direkt ko-kültürde gerçekleştirilen çalışma düzeneği Şekil 2.3'de verilmiştir.



Şekil 2.3. Hücre dışı etkileşim çalışmaları ko-kültür çalışma düzeneği.

PYG eklenen kuyucuklar sarı, PAS eklenenler şeffaf renkte görölmektedir. Mavi renkte görölen kuyucuklar bakteri sayımları yapıldıktan sonra amip canlılığını göstermek için %0,4 trypan blue eklenen kuyucuklardır.

2.4 Hücre İçi Bakteri-Amip Etkileşimi

Hücre içi bakteri-amip etkileşiminin bakteri canlılığı üzerine etkisi, farklı besin koşullarında hazırlanan direkt ko-kültürlerin farklı sıcaklıklarda inkübasyonu ile araştırılmıştır (Abd ve ark., 2009; Aky ve ark., 2010; Anacarso ve ark., 2012; Cirillo ve ark, 1997 ve Lambrecht ve ark., 2013).

PAS ve PYG kullanılarak bakteri:amip oranının 100:1 olduğu ko-kültürler hazırlanmış ve 6 °C, 25 °C ve 36 °C’de olmak üzere üç farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Amip ve bakteri sayımları, deney kuyucuklarından 0., 24. ve 48. saatlerde alınan örneklerle yapılmıştır.

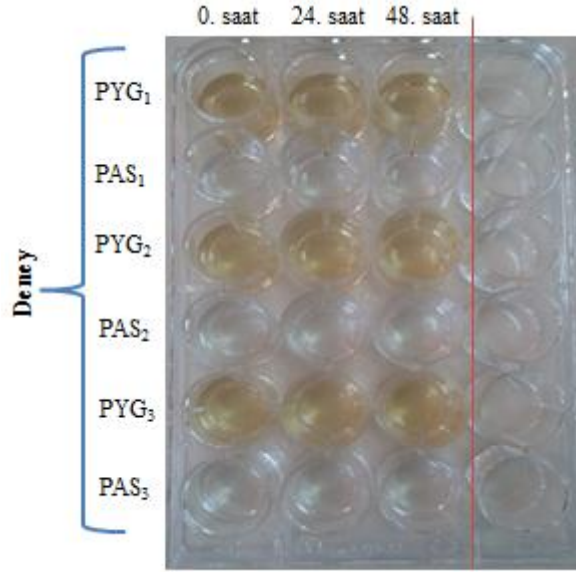
2.4.1 Direkt Ko-kültürlerin Hazırlanması

Direkt ko-kültürler 24 kuyucuklu düz tabanlı plaklar (Corning, Costar, CLS 3524) kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir sıcaklık için birer adet olmak üzere bakteri başına üç, dört bakteri için ise toplam 12 adet plak kullanılmıştır.

Kuyucuklara, düşük ve yüksek besin şartlarının kontrolü için sırasıyla PAS ve PYG içerisinde ayrı ayrı hazırlanmış amip kullanım süspansiyonundan 500 µL eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında amiplerin çökmesi beklenmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan pipet yardımıyla üstte kalan sıvı kısım toplanmıştır.

Zemininde amip bulunan kuyucukların üzerine, PAS ve PYG içerisinde bakteri kullanım süspansiyonundan 1'er mL eklenmiştir. Bakterinin amip ile etkileşime geçmesi için oda sıcaklığında iki saat inkübasyonun ardından sıvı kısım kuyucuklardan alınmıştır. Hücre dışında kalan bakterileri öldürmek için 1000 µg/mL gentamisin sülfat (GS: Calbiochem, 345814) içeren PAS ve PYG ilgili kuyucuklara 1'er mL konmuş, oda sıcaklığında bir saat inkübasyonun ardından üstte kalan sıvı kısım toplanmış, kuyucuklar üç kez PAS ile yıkanarak gentamisin sülfat tamamen uzaklaştırılmıştır.

Son aşamada 1'er mL PAS ve PYG ilgili kuyucuklara eklendikten sonra her bir plak 6 °C, 25 °C ve 36 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Çalışmanın gerçekleştirildiği 0., 24. ve 48. saatlerde kuyucuklardan örnekler alınarak bakteri sayımları yapılmıştır. Tüm çalışmalar üç paralel olacak şekilde planlanmıştır. Örnek olarak 6 °C'de *H. influenzae* için kurulmuş olan deney düzeneği Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Hücre içi etkileşim çalışmalarında ko-kültür çalışma düzeneği. PYG eklenen kuyucuklar sarı, PAS eklenenler şeffaf renkte görülmektedir.

2.4.2 Bakteri Sayımları

İlk olarak amipten dışarı çıkan bakterilerin saptanması ve sayımı için kuyucuklardaki sıvının tamamı başka bir plâğa aktarılmış ve Bölüm 2.3.2’de anlatıldığı şekilde bakteri sayımı yapılmıştır.

İkinci olarak amip içerisine girmiş bakterilerin canlılığını belirlemek amacıyla üst sıvısı alınan kuyucuklara, amiplerin parçalanması için 1 mL, %0,4 Triton X-100 (Sigma, Lot: 85H0419) içeren PYG eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyonun ardından Bölüm 2.3.2’de anlatıldığı şekilde bakteri sayımı yapılmıştır.

2.4.3 Gentamisin Sülfat ve Triton X-100 Etkinlik Kontrolü

Çalışmada kullanılan 1 000 µg/mL GS ve %0,4 Triton X-100 solüsyonlarının bakteri suşları ve amip üzerine etkisi, Dirks (2012)’ün belirttiği şekilde araştırılmıştır. Her bir suş için etkinlik kontrolü çalışmaları, üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Hücre içi etkileşim çalışmalarında, GS ile inkübasyonun ardından canlılığında en az 4 log düşüş gösteren ancak Triton X-100 ile inkübasyonun ardından canlılığında bir farklılık olmayan (<1 log) bakteri suşları kullanılmıştır. Bunun yanında *A. hatchetti* suşunun çalışmalarda kullanılmadan önce GS ile inkübasyonun ardından canlılığında bir farklılık olmadığı ve Triton X-100 ile inkübasyonun ardından canlılığında en az 4 log düşüş olduğu araştırılmıştır.

2.4.3.1 Gentamisin Sülfatın Bakteri Suşları Üzerine Etkisi

Birincil bakteri süspansiyonundan 100 µL, 1,8 mL'lik santrifüj tüpüne konduktan sonra üzerine 1 000 µg/mL GS içeren PYG'den 900 µL eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 10 000xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısım atılarak bakteri çökeltisi PYG ile tekrar süspansiyon edilmiş ve üç kez yıkanarak GS tamamen uzaklaştırılmıştır. Son olarak tüpteki bakteri sayısı, Bölüm 2.3.2'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Kontrol tüpleri, GS içermeyen PYG kullanılarak paralel olarak çalışılmıştır.

2.4.3.2 Triton X-100'ün Bakteri Suşları Üzerine Etkisi

Birincil bakteri süspansiyonundan 100 µL, 1,8 mL'lik santrifüj tüpüne konup üzerine %0,4 Triton X-100 içeren PYG'den 900 µL eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüpteki bakteri sayımı, Bölüm 2.3.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Kontrol tüpleri, Triton X-100 içermeyen PYG kullanılarak paralel olarak çalışılmıştır.

2.4.3.3 Gentamisin Sülfatın Amip Üzerine Etkisi

PYG içerisinde hazırlanan amip kullanım süspansiyonundan 1 mL, 1,8 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve 300xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısım atılmıştır. Amip çökeltisi üzerine 1 000 µg/mL GS içeren PYG eklendikten sonra 1

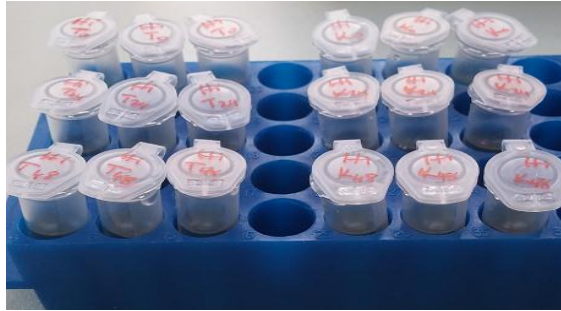
saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından amip sayım ve canlılık kontrolü Bölüm 2.1’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Kontrol tüpleri, GS içermeyen PYG kullanılarak paralel olarak çalışılmıştır.

2.4.3.4 Triton X-100’ün Amip Üzerine Etkisi

PYG içerisinde hazırlanan amip kullanım süspansiyonundan 1 mL, 1,8 mL’lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve 300xg’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısım atılmıştır. Amip çökeltisi üzerine %0,4 Triton X-100 içeren PYG eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından amip sayım ve canlılık kontrolü Bölüm 2.1’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Kontrol tüpleri, Triton X-100 içermeyen PYG kullanılarak paralel olarak çalışılmıştır.

2.5 Hücre Dışına Salınan Faktörlerin Canlılık Üzerine Etkisi

Hücre dışına salınan faktörlerin amip ve bakteri canlılığına etkisi 6 °C, 25 °C ve 36 °C’de olmak üzere üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiş, amip ve bakteri sayımları, 0., 24. ve 48. saatlerde alınan örneklerle yapılmıştır (Huws ve ark., 2008; Iqbal ve ark., 2014; Lambrecht ve ark., 2013 ve Tamang ve ark., 2011). Ancak çalışmamızda hücre kültür plakları yerine 1,8 mL’lik santrifüj tüpleri kullanılmıştır. Hücre dışına salınan faktörlerin etkisinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışma düzeneği Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Hücre dışına salınan faktörlerin canlılık üzerine etkisinin araştırılmasında gerçekleştirilen çalışma düzeneği.

2.5.1 Amipten Salınan Faktörlerin Bakteri Canlılığına Etkisi

Beş-yedi gün boyunca T-25 hücre kültür şişelerinde üretilen amipler, hücre kazıyıcı kullanılarak kazanmış ve kültürün tamamı 15 mL'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Bölüm 2.1'de anlatıldığı şekilde sayım ve canlılık kontrolünden sonra $2-5 \times 10^5$ amip/mL olacak şekilde ayarlanıp 300xg'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Amip süpernatanı, 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirilip tamamen hücrelerden arındırılarak 50 mL santrifüj tüpünde toplanmıştır.

Birinci bakteri süspansiyonundan 100 µL alınarak her bir sıcaklık için 18'er adet 1,8 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüplerin dokuz tanesi 900 µL amip süpernatanı, dokuz tanesi ise kontrol amaçlı PYG ile süspanse edilmiştir. Tüpler, 6 °C, 25 °C ve 36 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Çalışmanın 0., 24. ve 48. saatlerinde, deney ve kontrol tüplerinden örnekler alınarak bakteri sayımları, Bölüm 2.3.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.5.2 Bakterilerden Salınan Faktörlerin Amip Canlılığına Etkisi

Çalışmada sadece *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'nin sıvı kültürü yapılabildiği için bu iki bakteriden salınan faktörlerin amibe karşı etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla uygun katı besiyerinde üretilmiş bakteri suşu alınarak 5-6 mL Beyin-kalp infüzyon broth (BKİB) içeren tüpe ekim yapılmış ve tüp 18-24 saat %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Üreme olan sıvı kültür, BKİB kullanılarak 620 nm'de $0,280 \pm 10$ OD'ye ayarlanmıştır. Bu süspansiyon 10 000xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı kısım 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirilip tamamen hücrelerden arındırılarak 50 mL santrifüj tüpünde toplanmıştır.

Amip kullanım süspansiyonundan 1'er mL, 6 °C, 25 °C ve 36 °C sıcaklık için 18'er adet 1,8 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmış, tüpler 300xg'de 5 dakika süre ile

santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım atılmıştır. Tüplerin dokuz tanesi 1 000 µL bakteri süpernatanı, dokuz tanesi ise kontrol amaçlı BKİB ile süspanse edilmiştir. Çalışmanın 0., 24. ve 48. saatlerinde deney ve kontrol tüplerinden örnekler alınarak amip sayımları Bölüm 2.1.2’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

2.6 İstatistiksel değerlendirme

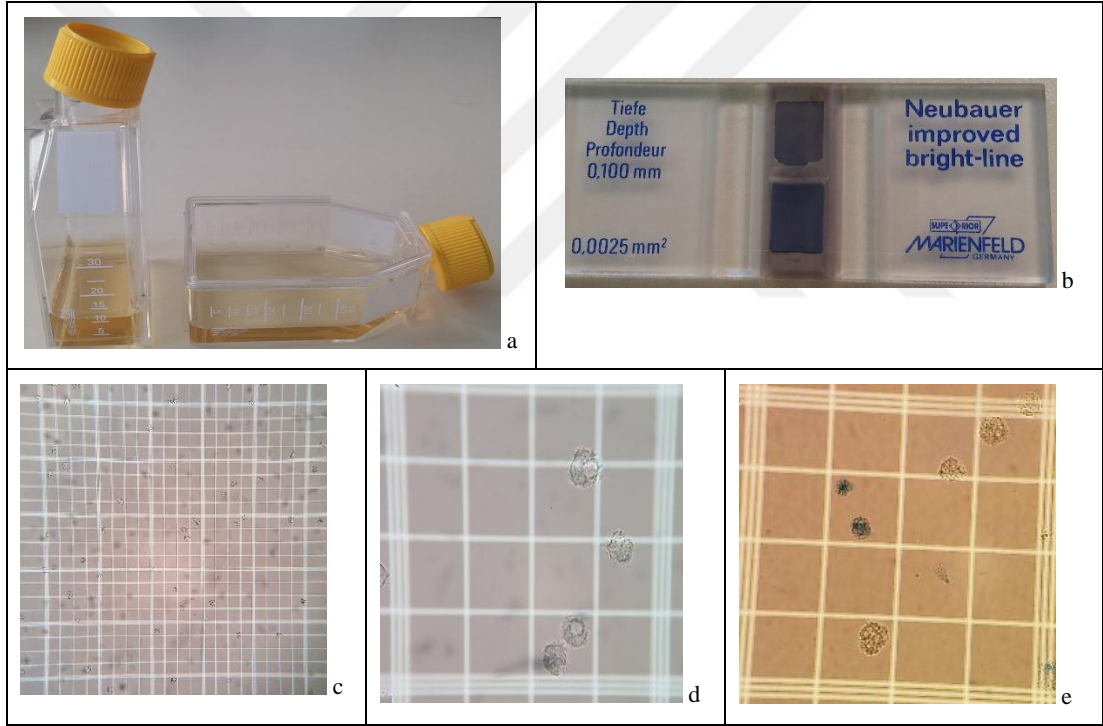
Yapılan deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney ve kontrol gruplarında elde edilen sonuçlar üzerinden, amip veya bakteri canlılıklarındaki değişiklikler gözlemsel olarak ve istatistiksel yönden değerlendirilmiştir. Gözlemsel değerlendirmede, >1 log’luk değişimin bakteri süşunun canlılığı üzerinde bir farklılığı, >0,5 log’luk değişimin ise amip süşunun canlılığı üzerinde bir farklılığı ifade ettiği şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan tekrarların ortalamaları kullanılarak, deney ve kontrol gruplarındaki amip veya bakteri canlılıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı Mann Whitney testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Amip Kültürü Sayım ve Canlılık Kontrolü

Amip kültürünün 3.-5. günleri arası gerçekleştirilen canlılık kontrollerinde, canlılık oranının %97-100 olduğu bulunmuş bu nedenle 3-5 günlük kültürden hazırlanan amip kullanım süspansiyonu, yeni amip kültürü hazırlanmasında ve deneylerde kullanılmıştır. Amip sayısının istenen düzeyde olduğu her çalışma öncesi mikroskopta kontrol edilmiş ve gerekli ise ayarlamalar süspansiyonun bulunduğu tüp içerisinde yapılmıştır.



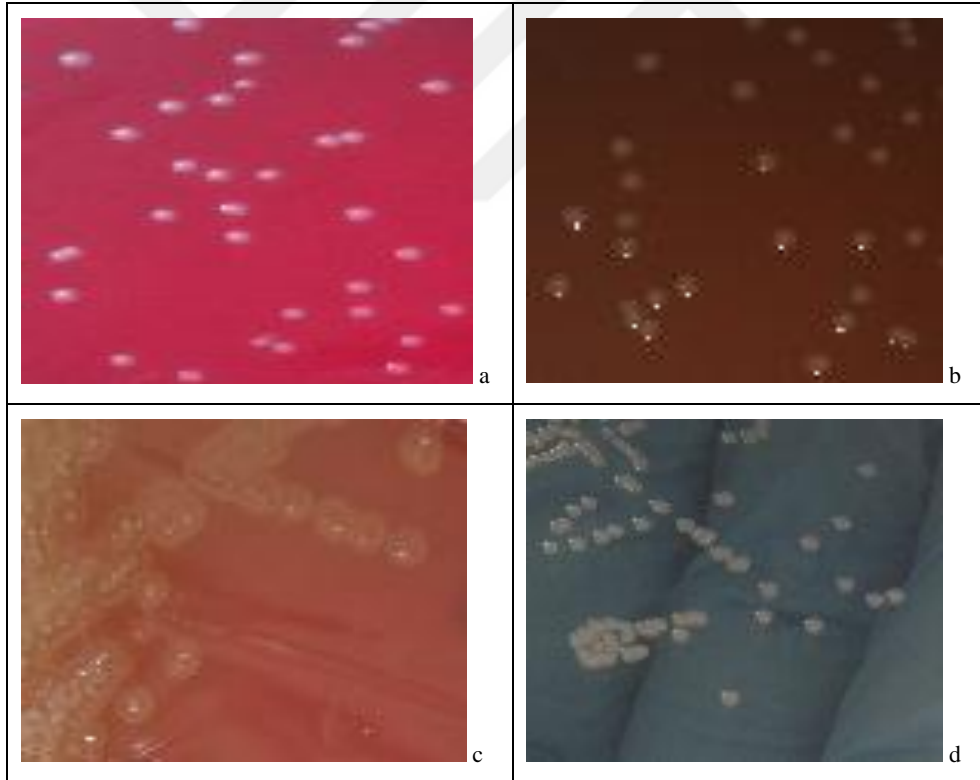
Şekil 3.1. Amip sayımı ve canlılık kontrolü çalışmalarındaki mikroskop görüntüleri.

a: T 25 hücre kültür şişelerinde amip kültürü, b: Trypan blue ile yapılan sayım-canlılık kontrolünde Neubauer sayma lamı, c: 10x10'luk büyütmede lamın merkez karesinin görüntüsü, d: Merkez karenin her bir karesinde amip görüntüsü, e: Merkez karenin bir karesinde trypan blue boyasını almış ölü amipler ve almamış canlı amip görüntüsü.

3.2 Bakteri Kùltürü ve Sayım Kontrolleri

3.2.1 Bakteri Suşlarının Koloni Görünümleri

B. pertussis suşunun BGA'da dört günlük inkübasyonundan sonra beyaz renkli, 2-3 mm çaplı koloniler gözlenmiştir. *H. influenzae* suşunun ÇA'da 18-24 saatlik inkübasyonundan sonra gri renkli, 2-3 mm çaplı koloniler gözlenmiştir. *S. pneumoniae* suşunun KKA'da 18-24 saatlik inkübasyonundan sonra 2-3 mm çaplı, alfa hemolitik, bazılarının ortası çökmüş krem renkli koloniler gözlenmiştir. *M. catarrhalis* suşunun BKİA'da 18-24 saatlik inkübasyonundan sonra 2-3 mm çaplı, beyaz-krem renkli koloniler gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının üretildiği besiyerlerindeki koloni görünüşleri Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Bakteri suşlarına ait koloni görünüşleri.

a: BGA'da *B. pertussis* kolonisi, b: ÇA'da *H. influenzae* kolonisi, c: KKA'da *S. pneumoniae* kolonisi, d: BKİA'da *M. catarrhalis* kolonisi

3.2.2 Bakteri Kullanım Süspansiyonlarının Sayım Kontrolü

Bakteri kullanım süspansiyonlarında istenen sayıda bakteri olduğu, Bölüm 2.2.6’da belirtilen şekilde yapılan sayım kontrolleri ile gösterilmiştir. Sayım kontrollerinde ilk süspansiyondaki *B. pertussis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* sayıları sırasıyla $4,8 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$ ve $2,1 \times 10^8$ kob/mL olarak tespit edilmiştir. Yapılan sayım kontrollerine ait sonuçlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Bakteri kullanım süspansiyonu sayım kontrolleri.

Bakteri adı (620nm OD)	İlk süspansiyonda bakteri sayısı (kob/mL)			
	1. çalışma	2. çalışma	3. çalışma	Ortalama
<i>B. pertussis</i> (0,150)	$3,9 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$
<i>M. catarrhalis</i> (0,280)	$1,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
<i>S. pneumoniae</i> (0,280)	$1,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
<i>H. influenzae</i> (0,280)	$2,9 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$

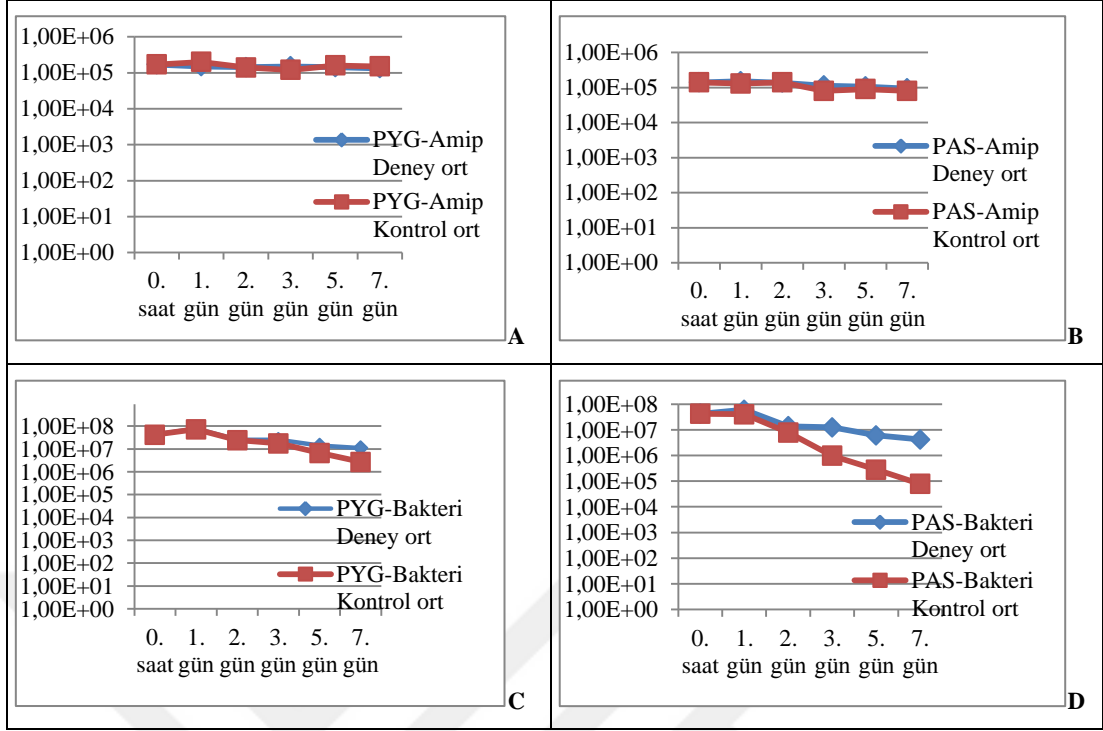
3.3 Hücre Dışı Amip-Bakteri Etkileşimi

Bakteri-amip direkt ko-kültür çalışmaları ile *A. hatchetti* ile *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*’nin 6 °C, 25 °C ve 36 °C’de yedi gün boyunca yüksek ve düşük besin koşullarında hücre dışı etkileşimin, birbirlerinin canlılıkları üzerinde yaptıkları etki araştırılmıştır.

3.3.1 *A. hatchetti* ile *B. pertussis*’in Hücre Dışı Etkileşimi

3.3.1.1 *A. hatchetti* ile *B. pertussis*’in 6 °C’de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *B. pertussis*’in 6 °C’de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.3’de grafik, Çizelge 3.2’de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.2. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,70E+05	1,70E+05	1,40E+05	1,40E+05	4,20E+07	4,20E+07	4,20E+07	4,20E+07
1. gün	1,50E+05	2,00E+05	1,50E+05	1,30E+05	7,74E+07	7,20E+07	6,00E+07	4,00E+07
2. gün	1,43E+05	1,40E+05	1,37E+05	1,40E+05	2,53E+07	2,42E+07	1,38E+07	7,80E+06
3. gün	1,50E+05	1,20E+05	1,13E+05	8,00E+04	2,53E+07	1,76E+07	1,25E+07	9,80E+05
5. gün	1,43E+05	1,60E+05	1,07E+05	9,00E+04	1,41E+07	6,70E+06	6,04E+06	2,80E+05
7. gün	1,33E+05	1,50E+05	9,33E+04	8,00E+04	1,11E+07	2,70E+06	4,17E+06	7,80E+04

Çizelge 3.3. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

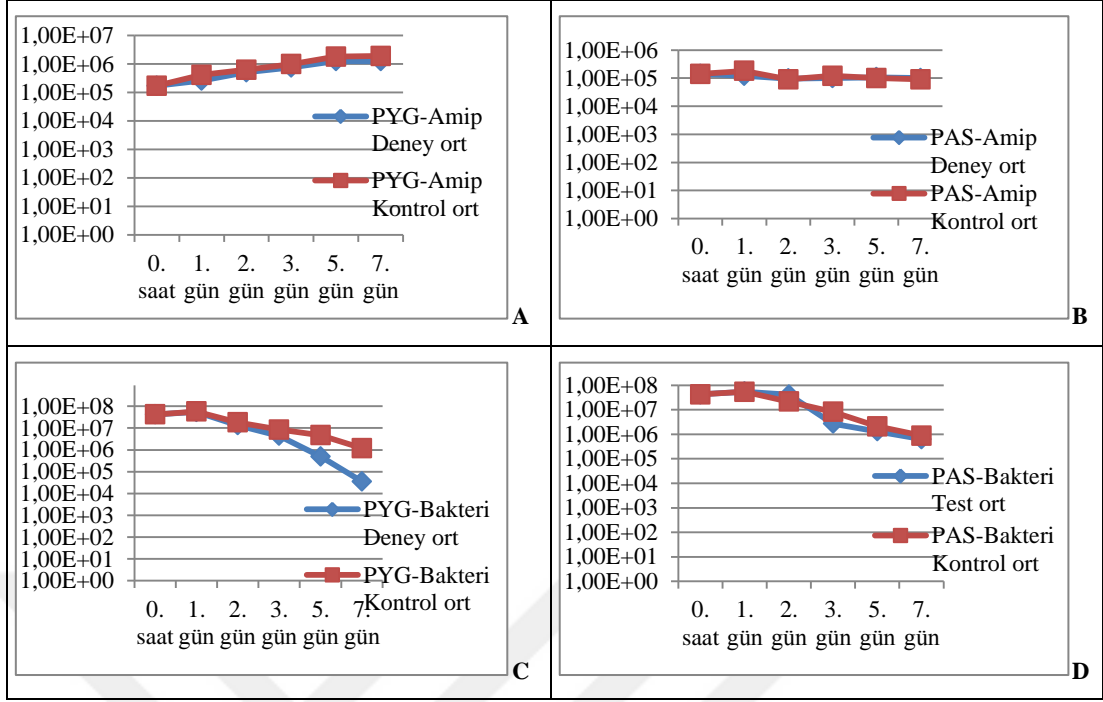
Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	1,48E+05 ± 1,22E+04	1,47E+05 (1,33E+05 - 1,70E+05)	0,571
	Kontrol	6	1,57E+05 ± 2,73E+04	1,55E+05 (1,20E+05 - 2,00E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	1,23E+05 ± 2,21E+04	1,25E+05 (9,33E+04 - 1,50E+05)	0,332
	Kontrol	6	1,10E+05 ± 2,97E+04	1,10E+05 (8,00E+04 - 1,40E+05)	
PYG-bakteri ort	Deney	6	3,25E+07 ± 2,45E+07	2,53E+07 (1,11E+07 - 7,74E+07)	0,470
	Kontrol	6	2,75E+07 ± 2,59E+07	2,09E+07 (2,70E+06 - 7,20E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	2,31E+07 ± 2,27E+07	1,31E+07 (4,17E+06 - 6,00E+07)	0,229
	Kontrol	6	1,52E+07 ± 2,02E+07	4,39E+06 (7,80E+04 - 4,20E+07)	

A. hatchetti'nin *B. pertussis* ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, kontrol çalışmaları ile kıyaslandığında amibin canlılığı yönünden önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla $p=0,571$ ve $p=0,332$).

B. pertussis'in *A. hatchetti* ile yüksek besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, kontroller ile kıyaslandığında, bakterinin canlılığı yönünde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ($p=0,470$). Ancak düşük besin koşullarında 3. gün, 5. gün ve 7. gün bakteri canlılığı üzerine amibin olumlu yönde etki yaptığı dikkati çekmektedir. Bakteri-amip deney kuyucuklarında 3. gün, 5. gün ve 7. günlerde bakteri sayısı sırasıyla $1,25 \times 10^7$ (7,1 log), $6,04 \times 10^6$ (6,8 log) ve $4,17 \times 10^6$ (6,62 log) bakteri/mL olarak bulunmuşken kontrol kuyucuklarında bu sayımlar sırasıyla $9,8 \times 10^5$ (6,0 log), $2,8 \times 10^5$ (5,4 log) ve $4,8 \times 10^4$ (4,7 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Ancak bu gözleme rağmen, düşük besin koşullarında da *A. hatchetti*'nin *B. pertussis*'in canlılığına olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,229$).

3.3.1.2 *A. hatchetti* ile *B. pertussis*'in 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *B. pertussis*'in 25 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'de grafik şeklinde, Çizelge 3.4'de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları,

Çizelge 3.4. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,70E+05	1,70E+05	1,40E+05	1,40E+05	4,20E+07	4,20E+07	4,20E+07	4,20E+07
1. gün	2,60E+05	4,10E+05	1,20E+05	1,80E+05	5,44E+07	5,70E+07	5,47E+07	5,40E+07
2. gün	5,10E+05	6,20E+05	9,67E+04	9,00E+04	1,35E+07	1,82E+07	4,12E+07	2,16E+07
3. gün	7,50E+05	9,80E+05	1,00E+05	1,20E+05	4,37E+06	8,50E+06	2,72E+06	8,20E+06
5. gün	1,26E+06	1,80E+06	1,07E+05	1,00E+05	5,00E+05	4,70E+06	1,31E+06	2,10E+06
7. gün	1,24E+06	1,90E+06	1,00E+05	9,00E+04	3,53E+04	1,20E+06	6,23E+05	8,70E+05

Çizelge 3.5. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

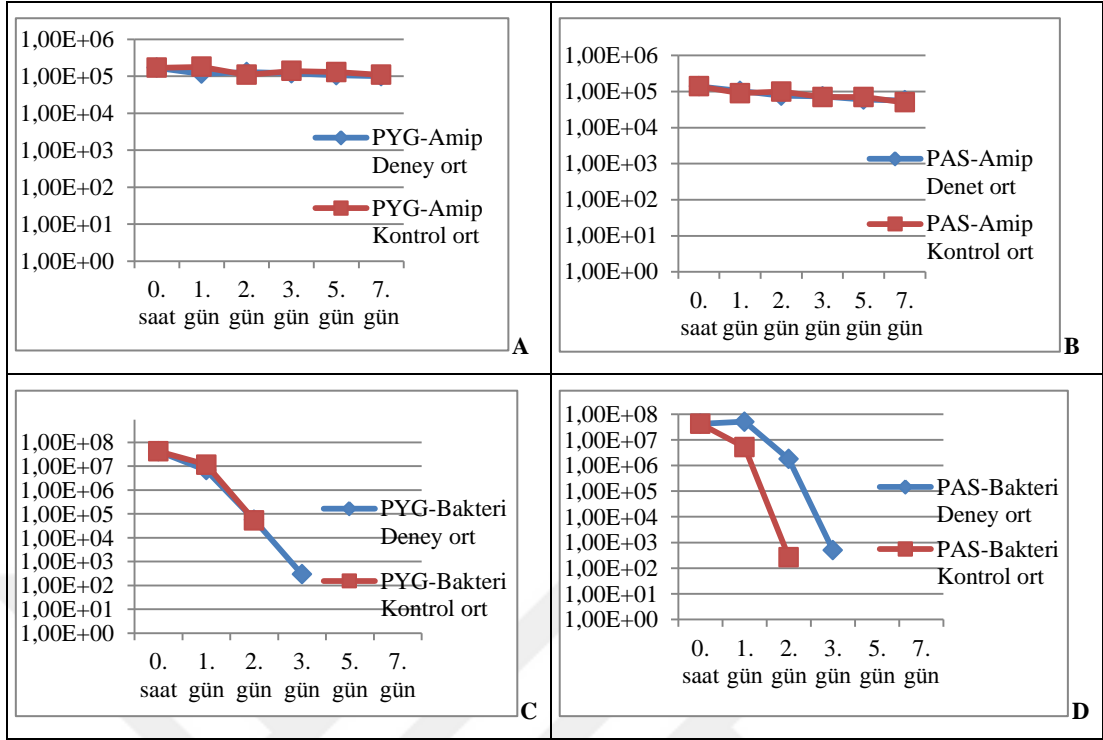
Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	6,98E+05 ± 4,72E+05	6,30E+05 (1,70E+05 - 1,26E+06)	0,589
	Kontrol	6	9,80E+05 ± 7,25E+05	8,00E+05 (1,70E+05 - 1,90E+06)	
PAS-Amip ort	Deney	6	1,11E+05 ± 1,67E+04	1,03E+05 (9,67E+04 - 9,67E+04)	1,000
	Kontrol	6	1,20E+05 ± 3,52E+04	1,10E+05 (9,00E+04 - 1,80E+05)	
PYG-Bakteri ort	Deney	6	1,91E+07 ± 2,34E+07	8,93E+06 (3,53E+04 - 5,44E+07)	0,485
	Kontrol	6	2,19E+07 ± 2,26E+07	1,34E+07 (1,20E+06 - 5,70E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	2,38E+07 ± 2,48E+07	2,20E+07 (6,23E+05 - 5,47E+07)	0,937
	Kontrol	6	2,15E+07 ± 2,22E+07	1,49E+07 (8,70E+05 - 5,40E+07)	

A. hatchetti'nin *B. pertussis* ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, kontrol çalışmaları ile kıyaslandığında amibin canlılığı yönünden önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla $p=0,589$ ve $p=1,000$).

B. pertussis'in *A. hatchetti* ile düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, bakterinin canlılığı yönünde önemli bir değişiklik göstermemiştir ($p=0,937$). Ancak yüksek besin koşullarında 5. ve 7. günlerde bakteri canlılığı üzerine amibin olumsuz yönde bir etki yaptığı gözlenmiştir. Bakteri-amip deney kuyucuklarında 5. ve 7. günlerde bakteri sayısı sırasıyla $5,0 \times 10^5$ (5,7 log) ve $3,53 \times 10^4$ (4,5 log) bakteri/mL olarak bulunmuşken kontrol kuyucuklarında bu sayı sırasıyla $4,7 \times 10^6$ (6,7 log) ve $1,2 \times 10^6$ (6,1 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Ancak amibin bu şartlarda da *B. pertussis*'in canlılığına etkisinde, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,485$).

3.3.1.3 *A. hatchetti* ile *B. pertussis*'in 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *B. pertussis*'in 36 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.5'de grafik şeklinde, Çizelge 3.6'de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.6. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,70E+05	1,70E+05	1,40E+05	1,40E+05	4,20E+07	4,20E+07	4,20E+07	4,20E+07
1. gün	1,17E+05	1,80E+05	1,03E+05	9,00E+04	6,73E+06	1,17E+07	5,07E+07	5,20E+06
2. gün	1,30E+05	1,10E+05	7,67E+04	1,00E+05	5,60E+04	5,40E+04	1,80E+06	2,70E+02
3. gün	1,20E+05	1,40E+05	7,33E+04	7,00E+04	2,97E+02	0,00E+00	5,03E+02	0,00E+00
5. gün	1,07E+05	1,30E+05	6,00E+04	7,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
7. gün	1,00E+05	1,10E+05	5,67E+04	5,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Çizelge 3.7. Hücre dışı amip-*B. pertussis* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	1,24E+05 ± 2,49E+04	1,18E+05 (1,00E+05 - 1,70E+05)	0,310
	Kontrol	6	1,40E+05 ± 2,97E+04	1,35E+05 (1,10E+05 - 1,80E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	8,50E+04 ± 3,16E+04	7,50E+04 (5,67E+04 - 1,40E+05)	0,937
	Kontrol	6	8,67E+04 ± 3,14E+04	8,00E+04 (5,00E+04 - 1,40E+05)	
PYG-bakteri ort	Deney	6	8,13E+06 ± 1,68E+07	2,81E+04 (0,00E+00 - 4,20E+07)	0,818
	Kontrol	6	8,96E+06 ± 1,68E+07	2,70E+04 (0,00E+00 - 4,20E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	1,57E+07 ± 2,39E+07	9,00E+05 (0,00E+00 - 5,07E+07)	0,485
	Kontrol	6	7,87E+06 ± 1,69E+07	1,35E+02 (0,00E+00 - 4,20E+07)	

A. hatchetti'nin *B. pertussis* ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, kontrol çalışmaları ile kıyaslandığında amibin canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla $p=0,310$ ve $p=0,937$).

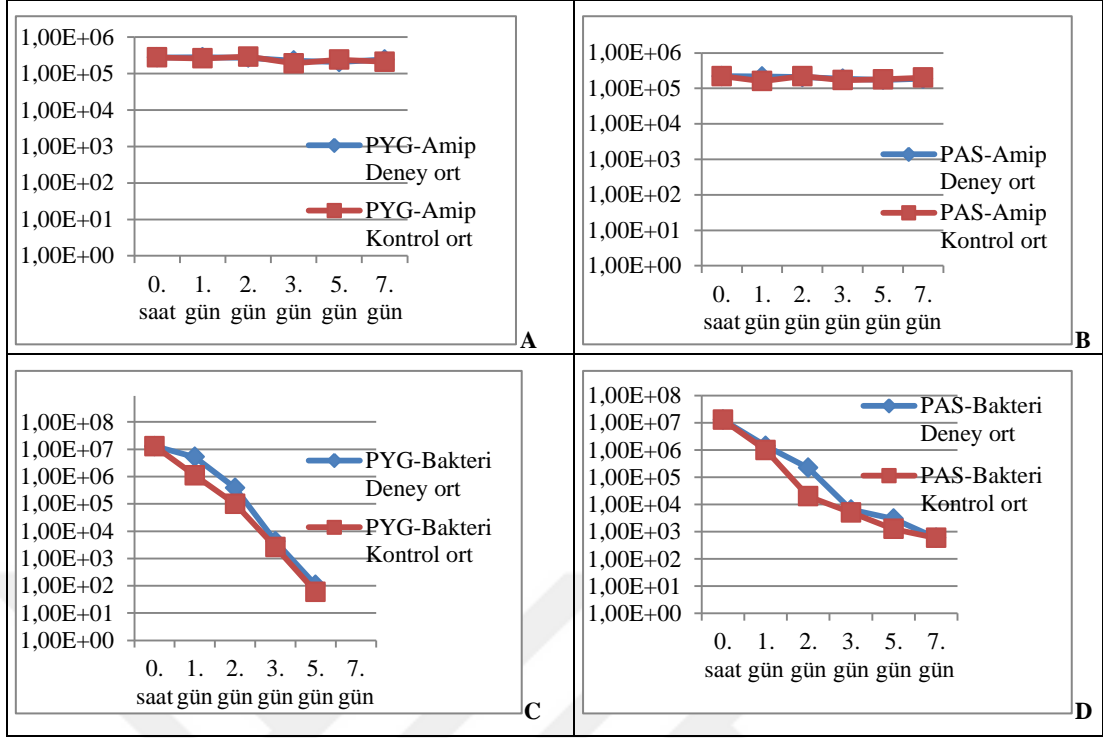
B. pertussis'in *A. hatchetti* ile yüksek besin koşullarında iki gün süresince birlikteliği, bakterinin canlılığı yönünde bir değişiklik göstermemiştir. Ancak 3. günde, deney kuyucuğunda bakteri sayısı $2,97 \times 10^2$ bakteri/mL bulunmasına rağmen kontrol kuyucuğunda her hangi bir üremeye rastlanmamış, 5. ve 7. günlerde ise hem deney hem de kontrol kuyucuklarında bir üreme gözlenmemiştir.

Düşük besin koşullarında ise 1., 2 ve 3. günlerde bakteri canlılığı üzerine amibin olumlu yönde bir etki yarattığı, 5. ve 7. günlerde ise deney ve kontrollerde herhangi bir üremenin olmadığı tespit edilmiştir. Bakteri-amip deney kuyucuklarında 1., 2. ve 3. günlerde bakteri sayısı sırasıyla $5,07 \times 10^7$ (7,7 log), $1,8 \times 10^6$ (6,0 log) ve $5,03 \times 10^2$ (2,7 log) bakteri/mL olarak bulunmuşken kontrol kuyucuklarında bu sayımlar sırasıyla $5,2 \times 10^6$ (6,7 log), $2,7 \times 10^2$ (2,4 log) ve 0 bakteri/mL olarak bulunmuştur. Ancak bu gözlemsel farklılıklara rağmen, *A. hatchetti*'nin yüksek ve düşük besin koşullarında *B. pertussis*'in canlılığına etkisinde de, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Sırasıyla $p=0,818$ ve $p=0,485$).

3.3.2 *A. hatchetti* ile *H. influenzae*'nin Hücre Dışı Etkileşimi

3.3.2.1 *A. hatchetti* ile *H. influenzae*'nin 6 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *H. influenzae*'nin 6 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.6'de grafik şeklinde, Çizelge 3.8'de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.9'de gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.8. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	2,75E+05	2,75E+05	2,20E+05	2,20E+05	1,30E+07	1,30E+07	1,30E+07	1,30E+07
1. gün	2,80E+05	2,60E+05	2,17E+05	1,60E+05	5,23E+06	1,10E+06	1,43E+06	1,00E+06
2. gün	2,70E+05	2,90E+05	2,07E+05	2,20E+05	3,87E+05	1,00E+05	2,23E+05	2,00E+04
3. gün	2,27E+05	1,90E+05	1,87E+05	1,70E+05	4,23E+03	2,60E+03	6,53E+03	5,10E+03
5. gün	2,07E+05	2,40E+05	1,73E+05	1,80E+05	1,07E+02	6,00E+01	3,00E+03	1,26E+03
7. gün	2,43E+05	2,10E+05	1,87E+05	2,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	5,90E+02	5,90E+02

Çizelge 3.9. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

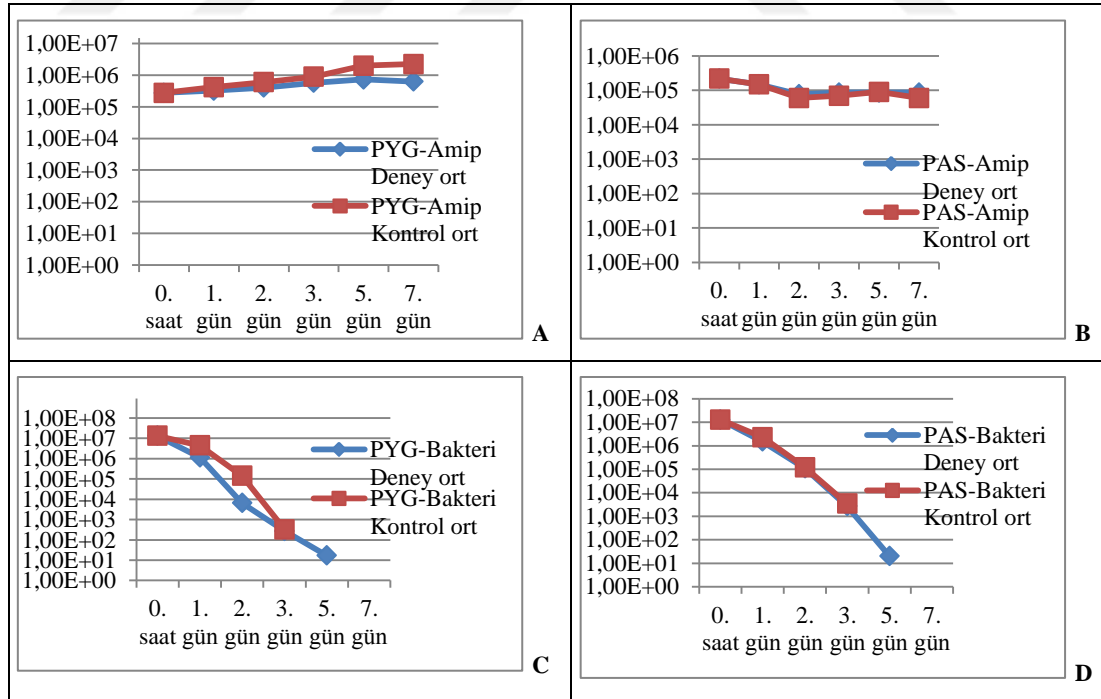
Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	2,50E+05 ± 2,96E+04	2,57E+05 (2,07E+05 - 2,80E+05)	0,818
	Kontrol	6	2,44E+05 ± 3,85E+04	2,50E+05 (1,90E+05 - 2,90E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	1,98E+05 ± 1,88E+04	1,97E+05 (1,73E+05 - 2,20E+05)	0,699
	Kontrol	6	1,92E+05 ± 2,56E+04	1,90E+05 (1,60E+05 - 2,20E+05)	
PYG-Bakteri ort	Deney	6	3,10E+06 ± 5,27E+06	1,95E+05 (0,00E+00 - 1,30E+07)	0,818
	Kontrol	6	2,37E+06 ± 5,23E+06	5,13E+04 (0,00E+00 - 1,30E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	2,44E+06 ± 5,20E+06	1,15E+05 (5,90E+02 - 1,30E+07)	0,818
	Kontrol	6	2,34E+06 ± 5,24E+06	1,26E+04 (5,90E+02 - 1,30E+07)	

H. influenzae'nin yüksek ve düşük besin koşullarında *A. hatchetti* ile yedi gün süresince birlikteliği, amibin canlılığı yönünden önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla $p= 0,818$ ve $p= 0,699$).

H. influenzae'nin *A. hatchetti* ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, bakterinin canlılığı yönünde önemli bir değişiklik göstermemiştir (Sırasıyla $p= 0,818$ ve $p= 0,818$). Yüksek besin koşullarında 5. güne, düşük besin koşullarında ise 7. güne kadar bakteri sayılarının doğrusal bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir.

3.3.2.2 *A. hatchetti* ile *H. influenzae*'nin 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *H. influenzae*'nin 25 °C'de direkt ko-kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlar Şekil 3.7'de grafik şeklinde, Çizelge 3.10'da da tablo şeklinde verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.10. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	2,75E+05	2,75E+05	2,20E+05	2,20E+05	1,30E+07	1,30E+07	1,30E+07	1,30E+07
1. gün	3,23E+05	4,20E+05	1,50E+05	1,50E+05	1,13E+06	4,40E+06	1,50E+06	2,30E+06
2. gün	4,07E+05	6,00E+05	7,67E+04	6,00E+04	6,40E+03	1,40E+04	1,10E+05	1,20E+05
3. gün	5,73E+05	9,00E+05	8,67E+04	7,00E+04	2,70E+02	3,20E+02	2,67E+03	3,40E+03
5. gün	7,33E+05	2,00E+06	8,67E+04	9,00E+04	1,67E+01	0,00E+00	2,00E+01	0,00E+00
7. gün	6,30E+05	2,25E+06	8,67E+04	6,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Çizelge 3.11. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	4,90E+05 ± 1,83E+05	4,90E+05 (2,75E+05 - 7,33E+05)	0,240
	Kontrol	6	1,07E+06 ± 8,44E+05	7,50E+05 (2,75E+05 - 2,25E+06)	
PAS-Amip ort	Deney	6	1,18E+05 ± 5,67E+04	8,67E+04 (7,67E+04 - 2,20E+05)	0,589
	Kontrol	6	1,08E+05 ± 6,43E+04	8,00E+04 (6,00E+04 - 2,20E+05)	
PYG-Bakteri ort	Deney	6	2,36E+06 ± 5,23E+06	3,34E+03 (0,00E+00 - 1,30E+07)	0,937
	Kontrol	6	2,90E+06 ± 5,25E+06	7,16E+03 (0,00E+00 - 1,30E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	2,44E+06 ± 5,21E+06	5,63E+04 (0,00E+00 - 1,30E+07)	0,937
	Kontrol	6	2,57E+06 ± 5,19E+06	6,17E+04 (0,00E+00 - 1,30E+07)	

H. influenzae'nin düşük besin koşullarında *A. hatchetti* ile birlikteliği, kontrol çalışmaları ile kıyaslandığında amibin canlılığı yönünden bir değişikliğe neden olmamıştır (p= 0,589).

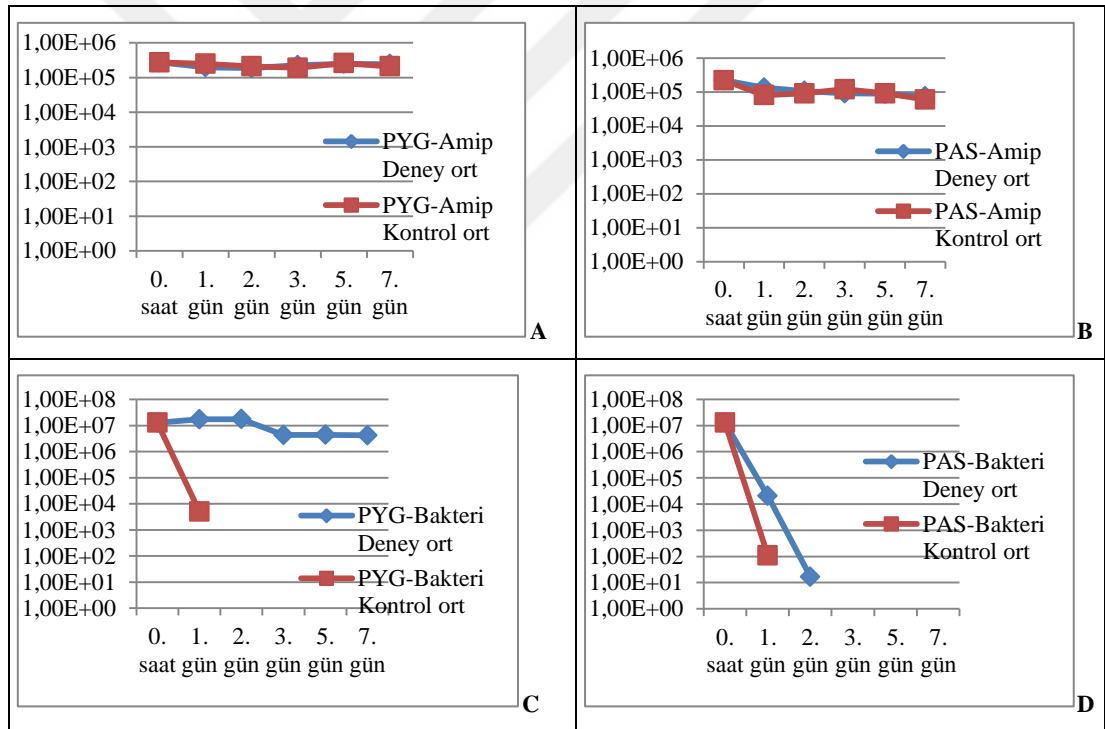
Yüksek besin koşullarında yedi gün süresince *A. hatchetti*'nin *H. influenzae* ile birlikteliğinin 7. gününde amibin canlılığı üzerinde olumsuz bir etki gözlenmiştir. Deney kuyucuğunda 7. gündeki amip sayısı $6,3 \times 10^5$ amip/mL (5,8 log) bulunmuşken kontrol kuyucuğunda $2,25 \times 10^6$ amip/mL (6,4 log) bulunmuştur. Ancak bu gözleme rağmen, *H. influenzae*'nin *A. hatchetti*'nin canlılığına olumsuz etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,240).

H. influenzae'nin *A. hatchetti* ile yüksek ve düşük besin koşullarında birlikteliğinde ise bakterinin 5. günde olumlu yönde etkilendiği ancak 7. günde hiçbir üreme olmadığı gösterilmiştir. Bakteri-amip deney kuyucuklarında 5. gün yapılan bakteri sayımlarında, yüksek ve düşük besin şartlarında sırasıyla $1,67 \times 10^1$ (1,2 log)

ve $2,0 \times 10^1$ ($1,3 \log$) bakteri/mL olarak bulunmuşken kontrol kuyucuklarında herhangi bir üreme tespit edilmemiştir. Bu gözleme rağmen yüksek ve düşük besin koşullarında *A. hatchetti*'nin *H. influenzae* canlılığı üzerindeki olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Sırasıyla $p=0,937$ ve $p=0,937$).

3.3.2.3 *A. hatchetti* ile *H. influenzae*'nin 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *H. influenzae*'nin 36 °C'de direkt ko-kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.8'de grafik şeklinde, Çizelge 3.12'de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.13'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.12. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	2,75E+05	2,75E+05	2,20E+05	2,20E+05	1,30E+07	1,30E+07	1,30E+07	1,30E+07
1. gün	1,97E+05	2,50E+05	1,33E+05	8,00E+04	1,75E+07	5,00E+03	2,07E+04	1,10E+02
2. gün	1,87E+05	2,10E+05	1,07E+05	9,00E+04	1,77E+07	0,00E+00	1,67E+01	0,00E+00
3. gün	2,27E+05	1,90E+05	9,00E+04	1,20E+05	4,40E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5. gün	2,50E+05	2,60E+05	8,83E+04	9,00E+04	4,43E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
7. gün	2,43E+05	2,10E+05	7,33E+04	6,00E+04	4,27E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Çizelge 3.13. Hücre dışı amip-*H. influenzae* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	2,30E+05 ± 3,35E+04	2,35E+05 (1,87E+05 - 2,75E+05)	0,818
	Kontrol	6	2,33E+05 ± 3,37E+04	2,30E+05 (1,90E+05 - 2,75E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	1,19E+05 ± 5,37E+04	9,83E+04 (7,33E+04 - 2,20E+05)	0,699
	Kontrol	6	1,10E+05 ± 5,73E+04	9,00E+04 (6,00E+04 - 2,20E+05)	
PYG-Bakteri ort	Deney	6	1,02E+07 ± 6,63E+06	8,72E+06 (4,27E+06 - 1,77E+07)	0,015
	Kontrol	6	2,17E+06 ± 5,31E+06	0,00E+00 (0,00E+00 - 1,30E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	2,17E+06 ± 5,31E+06	8,34E+00 (0,00E+00 - 1,30E+07)	0,699
	Kontrol	6	2,17E+06 ± 5,31E+06	0,00E+00 (0,00E+00 - 1,30E+07)	

A. hatchetti'nin *H. influenzae* ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün boyunca birlikteliği, amibin canlılığı yönünden bir değişikliğe neden olmamıştır (Sırasıyla p= 0,818 ve p= 0,699).

H. influenzae'nın *A. hatchetti* ile yüksek besin koşullarında yedi gün birlikteliğinde, bakterinin canlılığına amibin olumlu yönde etkisi olduğunu gözlenmiştir. Birinci gün deney çalışmasında bakteri sayısı $1,75 \times 10^7$ bakteri/mL (7,2 log) iken kontrol çalışmasında $5,0 \times 10^3$ bakteri/mL (3,7 log) bulunmuştur. Daha sonraki sürelerde ise kontrol çalışmalarında herhangi bir üreme olmazken deney çalışmalarında 2., 3., 5. ve 7. günlerde sırası ile $1,77 \times 10^7$ (7,2 log), $4,4 \times 10^6$ (6,6 log), $4,43 \times 10^6$ (6,6 log) ve $4,27 \times 10^6$ (6,6 log) bakteri/mL düzeyinde canlılık tespit edilmiştir. Gözlemsel olarak tespit edilen *A. hatchetti*'nin yüksek besin koşullarında *H. influenzae* canlılığına olumlu etkisi, istatistiksel olarak da anlamlı düzeyde tespit edilmiştir (p= 0,015).

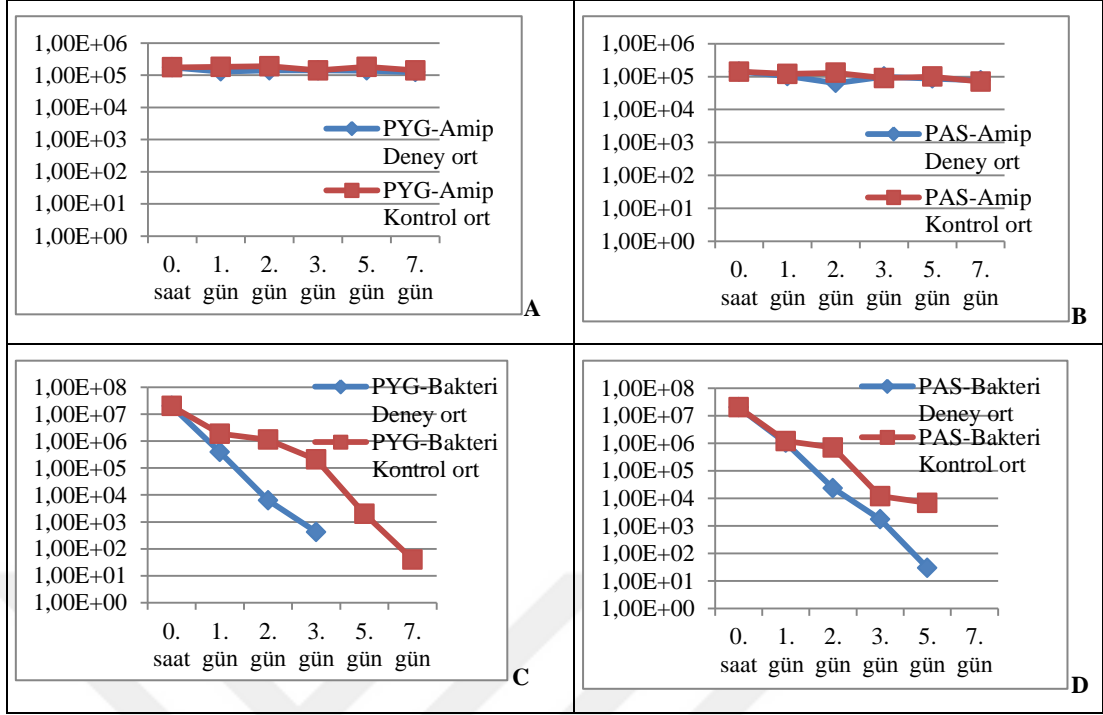
Düşük besin koşullarında yedi gün boyunca *H. influenzae*'nin *A. hatchetti* ile birlikteliği incelendiğinde amibin, bakterinin canlılığına 3. güne kadar olumlu yönde etkisi olduğu gözlenmiştir. Deney kuyucuğundaki 1. gün bakteri sayısı $2,07 \times 10^4$ bakteri/mL (4,3 log) iken kontrol kuyucuğunda $1,1 \times 10^2$ bakteri/mL (2,0 log) bulunmuştur. İkinci günde deney kuyucuğundaki bakteri sayısı $1,67 \times 10^1$ bakteri/mL (1,2 log) iken kontrol kuyucuğunda herhangi bir üremeye rastlanmamıştır. Diğer günlerde deney ve kontrol çalışmalarında herhangi bir üreme tespit edilmemiştir. Bu gözleme rağmen *A. hatchetti*'nin düşük besin koşullarında *H. influenzae* canlılığına olumlu etkisi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,699$).

3.3.3 *A. hatchetti* ile *M. catarrhalis*'in Hücre Dışı Etkileşimi

3.3.3.1 *A. hatchetti* ile *M. catarrhalis*'in 6 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *M. catarrhalis*'in 6 °C'de direkt ko-kültürü deneme çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.9'da grafik şeklinde, Çizelge 3.14'de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.15'de gösterilmiştir.

A. hatchetti'nin *M. catarrhalis* ile yüksek ve düşük besin koşullarındaki yedi gün süresince birlikteliği, amibin canlılığı yönünden önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla $p=0,699$ ve $p=0,818$).



Şekil 3.9. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları,

Çizelge 3.14. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,75E+05	1,75E+05	1,40E+05	1,40E+05	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07
1. gün	1,30E+05	1,80E+05	1,03E+05	1,20E+05	3,90E+05	1,88E+06	1,03E+06	1,20E+06
2. gün	1,40E+05	1,90E+05	6,33E+04	1,30E+05	6,33E+03	1,13E+06	2,33E+04	7,00E+05
3. gün	1,40E+05	1,40E+05	1,00E+05	9,00E+04	4,23E+02	2,07E+05	1,19E+03	1,20E+04
5. gün	1,38E+05	1,80E+05	8,67E+04	1,00E+05	0,00E+00	2,00E+03	3,00E+01	6,80E+03
7. gün	1,23E+05	1,40E+05	7,67E+04	7,00E+04	0,00E+00	4,00E+01	0,00E+00	0,00E+00

Çizelge 3.15. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

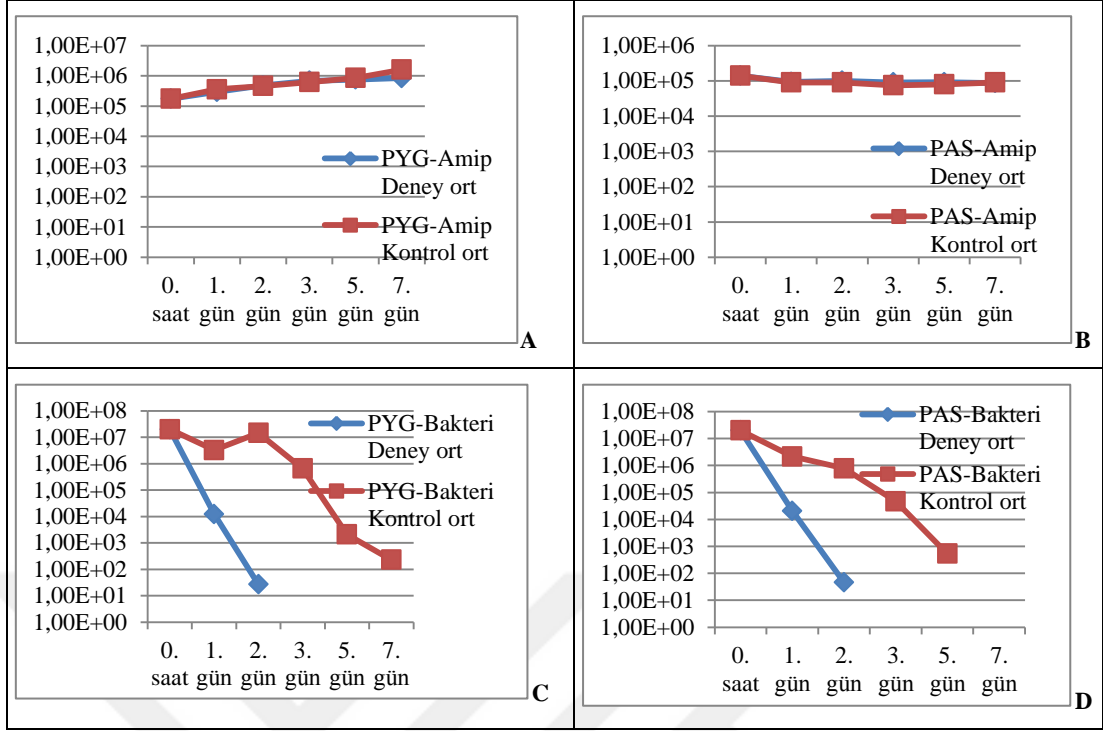
Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	1,28E+05 ± 4,22E+04	1,33E+05 (6,67E+04 - 1,75E+05)	0,699
	Kontrol	6	1,19E+05 ± 3,75E+04	1,20E+05 (7,00E+04 - 1,75E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	8,17E+04 ± 3,52E+04	8,42E+04 (4,00E+04 - 1,40E+05)	0,818
	Kontrol	6	7,83E+04 ± 3,54E+04	7,50E+04 (4,00E+04 - 1,40E+05)	
PYG- bakteri ort	Deney	6	3,36E+06 ± 8,15E+06	5,68E+02 (0,00E+00 - 2,00E+07)	0,937
	Kontrol	6	3,33E+06 ± 8,16E+06	1,50E+01 (0,00E+00 - 2,00E+07)	
PAS- Bakteri ort	Deney	6	3,33E+06 ± 8,16E+06	5,00E+00 (0,00E+00 - 2,00E+07)	0,699
	Kontrol	6	3,33E+06 ± 8,16E+06	0,00E+00 (0,00E+00 - 2,00E+07)	

Yüksek besin koşullarında ve yedi gün boyunca *M. catarrhalis*'in *A. hatchetti* ile birlikteliği incelendiğinde, amibin bakterinin canlılığı üzerinde olumsuz yönde etkisi olduğu gözlenmiştir. Deney çalışmalarındaki 1., 2. ve 3. günlerde bakteri sayısı sırasıyla $3,9 \times 10^5$ bakteri/mL (5,6 log), $6,33 \times 10^3$ bakteri/mL (3,8 log) ve $4,23 \times 10^2$ bakteri/mL (2,6 log) bulunmuşken kontrol çalışmalarında $1,88 \times 10^6$ bakteri/mL (6,3 log), $1,13 \times 10^6$ bakteri/mL (6,1 log) ve $2,07 \times 10^5$ bakteri/mL (5,3 log) bulunmuştur. Daha sonraki 5. ve 7. günlerdeki deney kuyucuklarında herhangi bir üreme olmazken kontrol kuyucuklarında bakteri sayısı sırasıyla $2,0 \times 10^3$ ve $4,0 \times 10^1$ bakteri/mL olarak tespit edilmiştir. Yüksek besin koşullarında *A. hatchetti*'nin *M. catarrhalis* üzerinde gözlemlenen bu olumsuz etkisi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,937$).

M. catarrhalis'in *A. hatchetti* ile düşük besin koşullarında yedi gün birlikteliği incelendiğinde, amibin bakterinin canlılığı üzerinde olumsuz yönde etkisi olduğu gözlenmiştir. Deney kuyucuklarındaki 2., 3. ve 5. günlerdeki bakteri sayısı sırasıyla $2,33 \times 10^4$ bakteri/mL (4,4 log), $1,76 \times 10^3$ bakteri/mL (3,2 log) ve $3,0 \times 10^1$ bakteri/mL (1,5 log) bulunmuşken kontrol kuyucuklarında $7,0 \times 10^5$ bakteri/mL (5,8 log), $1,2 \times 10^4$ bakteri/mL (4,1 log) ve $6,08 \times 10^3$ bakteri/mL (3,8 log) bulunmuştur. Düşük besin koşullarında *A. hatchetti*'nin *M. catarrhalis* üzerinde gözlemlenen bu olumsuz etkisi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,699$).

3.3.3.2 *A. hatchetti* ile *M. catarrhalis*'in 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *M. catarrhalis*'in 25 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.10'da grafik şeklinde, Çizelge 3.16'de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.17'de gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakterî canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakterî canlılık sonuçları,

Çizelge 3.16. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG-Amip Deney ort	PYG-Amip Kontrol ort	PAS-Amip Deney ort	PAS-Amip Kontrol ort	PYG-Bakteri Deney ort	PYG-Bakteri Kontrol ort	PAS-Bakteri Deney ort	PAS-Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,75E+05	1,75E+05	1,40E+05	1,40E+05	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07
1. gün	2,93E+05	3,60E+05	9,33E+04	9,00E+04	1,23E+04	3,27E+06	2,06E+04	2,17E+06
2. gün	4,80E+05	4,60E+05	1,00E+05	9,00E+04	2,67E+01	1,46E+07	4,67E+01	7,80E+05
3. gün	6,80E+05	6,20E+05	9,00E+04	7,50E+04	0,00E+00	6,60E+05	0,00E+00	4,70E+04
5. gün	7,57E+05	8,50E+05	9,17E+04	8,00E+04	0,00E+00	2,10E+03	0,00E+00	5,40E+02
7. gün	8,43E+05	1,60E+06	8,67E+04	9,00E+04	0,00E+00	2,30E+02	0,00E+00	0,00E+00

Çizelge 3.17. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	5,38E+05 ± 2,67E+05	5,80E+05 (1,75E+05 - 8,43E+05)	0,818
	Kontrol	6	6,78E+05 ± 5,07E+05	5,40E+05 (1,75E+05 - 1,60E+06)	
PAS-Amip ort	Deney	6	1,00E+05 ± 2,00E+04	9,25E+04 (8,67E+04 - 1,40E+05)	0,240
	Kontrol	6	9,42E+04 ± 2,33E+04	9,00E+04 (7,50E+04 - 1,40E+05)	
PYG-bakteri ort	Deney	6	3,34E+06 ± 8,16E+06	1,33E+01 (0,00E+00 - 2,00E+07)	0,093
	Kontrol	6	6,42E+06 ± 8,68E+06	1,97E+06 (2,30E+02 - 2,00E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	3,34E+06 ± 8,16E+06	2,33E+01 (0,00E+00 - 2,00E+07)	0,240
	Kontrol	6	3,83E+06 ± 7,96E+06	4,14E+05 (0,00E+00 - 2,00E+07)	

M. catarrhalis'in yüksek ve düşük besin koşullarında *A. hatchetti* ile yedi gün birlikteliği, amibin canlılığı yönünde bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla $p=0,818$ ve $p=0,240$).

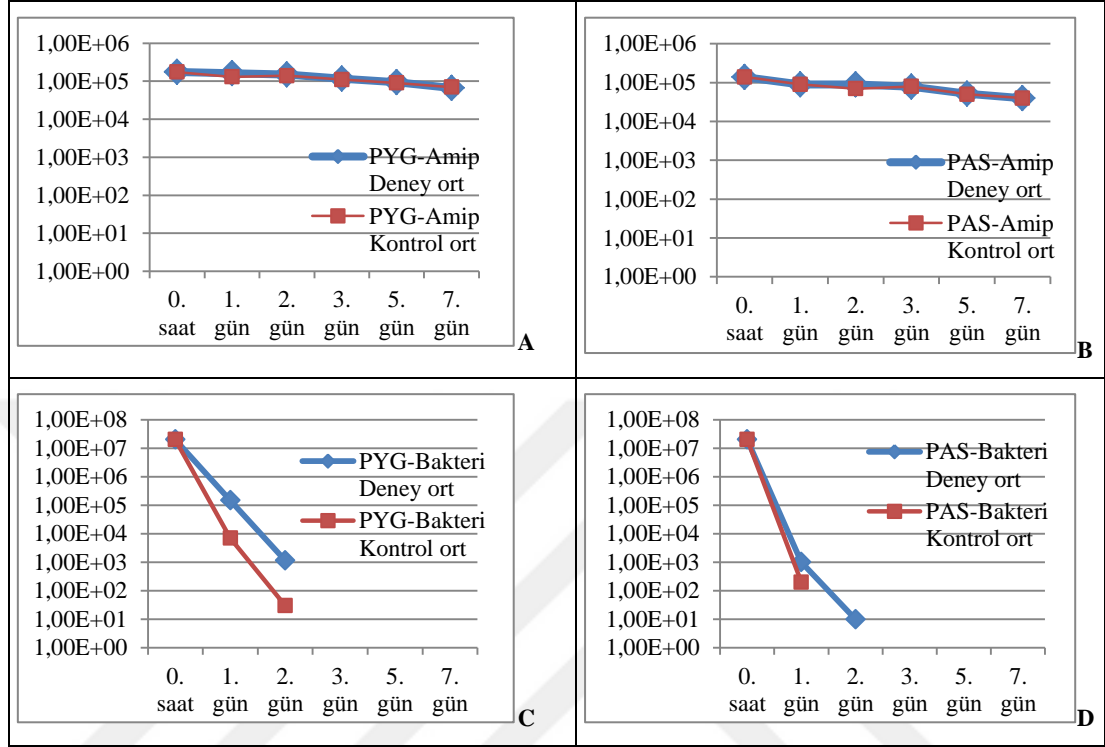
Yüksek besin koşullarında yedi gün süresince *M. catarrhalis*'in *A. hatchetti* ile birlikteliği incelendiğinde, amibin bakterinin canlılığı üzerinde olumsuz yönde etkisi olduğu gözlenmiştir. Deney kuyucuklarındaki 1. ve 2. Günlerdeki bakteri sayısı sırasıyla $1,23 \times 10^4$ bakteri/mL (4,1 log) ve $2,67 \times 10^1$ bakteri/mL (1,4 log) bulunmuşken kontrol çalışmalarında $3,27 \times 10^6$ bakteri/mL (6,5 log) ve $1,46 \times 10^7$ bakteri/mL (7,2 log) bulunmuştur. Daha sonraki 3., 5. ve 7. günlerde deney kuyucuklarında bakteri tespit edilememişken, kontrol kuyucuklarında sırasıyla $6,6 \times 10^5$, $2,1 \times 10^3$ ve $2,3 \times 10^2$ bakteri/mL düzeyinde canlılık tespit edilmiştir. *A. hatchetti*'nin yüksek besin koşullarında *M. catarrhalis* üzerine gözlenen olumsuz etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,093$).

M. catarrhalis'in *A. hatchetti* ile düşük besin koşullarında yedi gün birlikteliği incelendiğinde de amibin, bakterinin canlılığı üzerinde olumsuz yönde etkisi olduğu gözlenmiştir. Deney kuyucuklarındaki 1. ve 2. günlerdeki bakteri sayısı sırasıyla $2,06 \times 10^4$ bakteri/mL (4,3 log) ve $4,67 \times 10^1$ bakteri/mL (1,7 log) bulunmuşken kontrol kuyucuklarında $2,17 \times 10^6$ bakteri/mL (6,3 log) ve $7,8 \times 10^5$ bakteri/mL (5,9 log) bulunmuştur. Daha sonraki 3. ve 5. Günlerde deney kuyucuklarında herhangi bir üreme olmazken kontrol kuyucuklarında sırasıyla $4,7 \times 10^4$ ve $5,4 \times 10^2$ bakteri/mL düzeyinde canlılık tespit edilmiştir. *A. hatchetti*'nin düşük besin koşullarında *M. catarrhalis* üzerine gözlenen olumsuz etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,240$).

3.3.3.3 *A. hatchetti* ile *M. catarrhalis*'in 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *M. catarrhalis*'in 36 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.11'de grafik şeklinde, Çizelge 3.18'de de tablo şeklinde

verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.19'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri.

A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakterî canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakterî canlılık sonuçları.

Çizelge 3.18. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,75E+05	1,75E+05	1,40E+05	1,40E+05	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	2,00E+07
1. gün	1,63E+05	1,30E+05	9,00E+04	9,00E+04	1,48E+05	7,00E+03	1,00E+03	2,00E+02
2. gün	1,50E+05	1,40E+05	9,00E+04	7,00E+04	1,14E+03	3,00E+01	1,00E+01	0,00E+00
3. gün	1,17E+05	1,10E+05	7,83E+04	8,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5. gün	9,50E+04	9,00E+04	5,17E+04	5,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
7. gün	6,67E+04	7,00E+04	4,00E+04	4,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Çizelge 3.19. Hücre dışı amip-*M. catarrhalis* etkileşiminde 36 °C’lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	1,28E+05 ± 4,22E+04	1,33E+05 (6,67E+04 - 1,75E+05)	0,699
	Kontrol	6	1,19E+05 ± 3,75E+04	1,20E+05 (7,00E+04 - 1,75E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	8,17E+04 ± 3,52E+04	8,42E+04 (4,00E+04 - 1,40E+05)	0,818
	Kontrol	6	7,83E+04 ± 3,54E+04	7,50E+04 (4,00E+04 - 1,40E+05)	
PYG-bakteri ort	Deney	6	3,36E+06 ± 8,15E+06	5,68E+02 (0,00E+00 - 2,00E+07)	0,937
	Kontrol	6	3,33E+06 ± 8,16E+06	1,50E+01 (0,00E+00 - 2,00E+07)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	3,33E+06 ± 8,16E+06	5,00E+00 (0,00E+00 - 2,00E+07)	0,699
	Kontrol	6	3,33E+06 ± 8,16E+06	0,00E+00 (0,00E+00 - 2,00E+07)	

A. hatchetti'nin *M. catarrhalis* ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, amibin canlılığı yönünden önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla p= 0,699 ve p= 0,818).

M. catarrhalis'in *A. hatchetti* ile yüksek besin koşullarında iki gün boyunca birlikteliği, amibin bakteri canlılığına olumlu yönde etki ettiğini göstermiştir. Deney kuyucuklarında 1. ve 2. günlerde bakteri sayıları sırasıyla $1,48 \times 10^5$ (5,2 log) ve $1,14 \times 10^3$ bakteri/mL (3,1 log) olarak bulunmuştur. Kontrol kuyucuklarında ise bu sayı sırasıyla $7,0 \times 10^3$ (3,8 log) ve $3,0 \times 10^1$ bakteri/mL (1,5 log) olarak bulunmuştur. Diğer günlerdeki deney ve kontrol kuyucuklarında herhangi bir üreme tespit edilmemiştir. *A. hatchetti*'nin yüksek besin koşullarında iki gün süresince *M. catarrhalis* üzerine gösterdiği olumlu etki, istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p= 0,937).

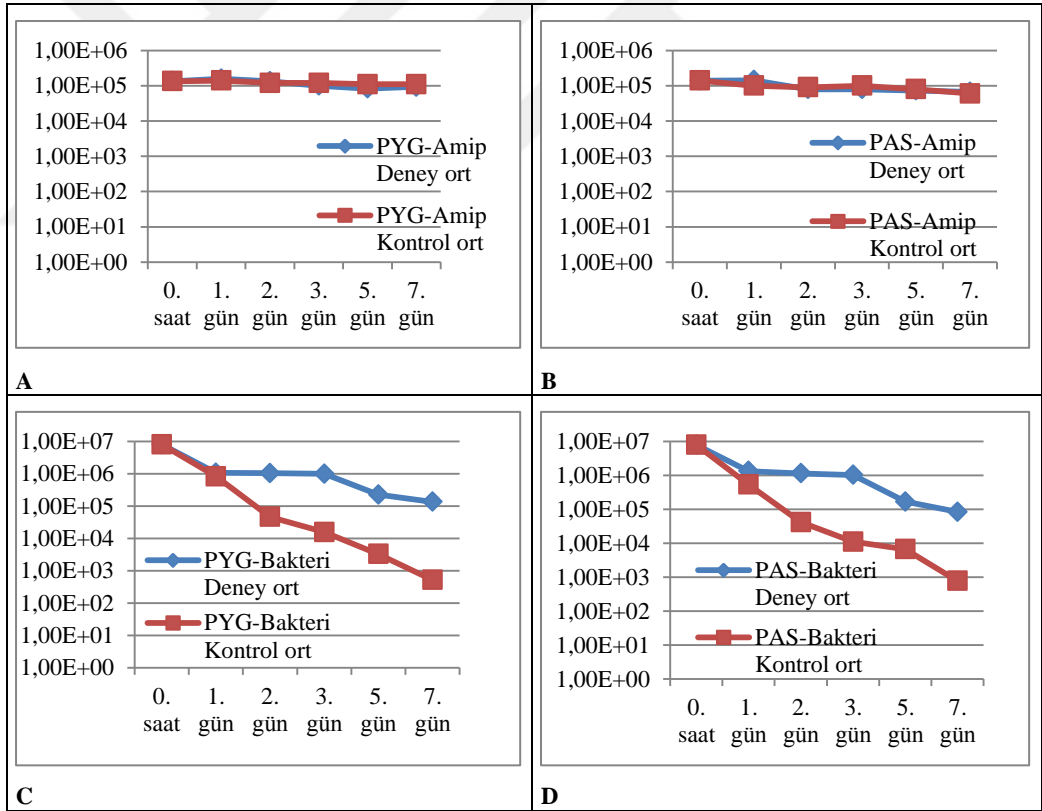
M. catarrhalis'in *A. hatchetti* ile düşük besin koşullarında iki gün boyunca birlikteliğinde bakterinin canlılığı yönünde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (p= 0,699).

3.3.4 A. hatchetti ile S. pneumoniae'nın Hücre Dışı Etkileşimi

3.3.4.1 A. hatchetti ile S. pneumoniae'nın 6 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile S. pneumoniae'nin 6 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.12'de grafik şeklinde, Çizelge 3.20'de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.21'de gösterilmiştir.

A. hatchetti'nin S. pneumoniae ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, amibin canlılığı yönünden önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla p= 0,589 ve p= 0,818).



Şekil 3.12. Hücre dışı amip-S. pneumoniae etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.20. Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,35E+05	1,35E+05	1,40E+05	1,40E+05	8,00E+06	8,00E+06	8,00E+06	8,00E+06
1. gün	1,57E+05	1,40E+05	1,43E+05	1,00E+05	1,05E+06	8,20E+05	1,34E+06	5,40E+05
2. gün	1,33E+05	1,20E+05	8,00E+04	9,00E+04	1,03E+06	4,60E+04	1,16E+06	4,20E+04
3. gün	1,00E+05	1,20E+05	8,00E+04	1,00E+05	9,87E+05	1,57E+04	1,04E+06	1,11E+04
5. gün	8,33E+04	1,10E+05	7,33E+04	8,00E+04	2,25E+05	3,30E+03	1,68E+05	6,70E+03
7. gün	9,33E+04	1,10E+05	6,67E+04	6,00E+04	1,35E+05	5,20E+02	8,40E+04	7,80E+01

Çizelge 3.21. Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 6 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken	n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6 1,17E+05 ± 2,88E+04	1,17E+05 (8,33E+04 - 8,33E+04)	0,589
	Kontrol	6 1,23E+05 ± 1,25E+04	1,20E+05 (1,10E+05 - 1,40E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6 9,72E+04 ± 3,48E+04	8,00E+04 (6,67E+04 - 1,43E+05)	0,818
	Kontrol	6 9,50E+04 ± 2,66E+04	9,50E+04 (6,00E+04 - 1,40E+05)	
PYG-Bakteri ort	Deney	6 1,91E+06 ± 3,01E+06	1,01E+06 (1,35E+05 - 8,00E+06)	0,093
	Kontrol	6 1,48E+06 ± 3,21E+06	3,09E+04 (5,20E+02 - 8,00E+06)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6 1,97E+06 ± 3,00E+06	1,10E+06 (8,40E+04 - 8,00E+06)	0,093
	Kontrol	6 1,43E+06 ± 3,22E+06	2,66E+04 (7,80E+02 - 8,00E+06)	

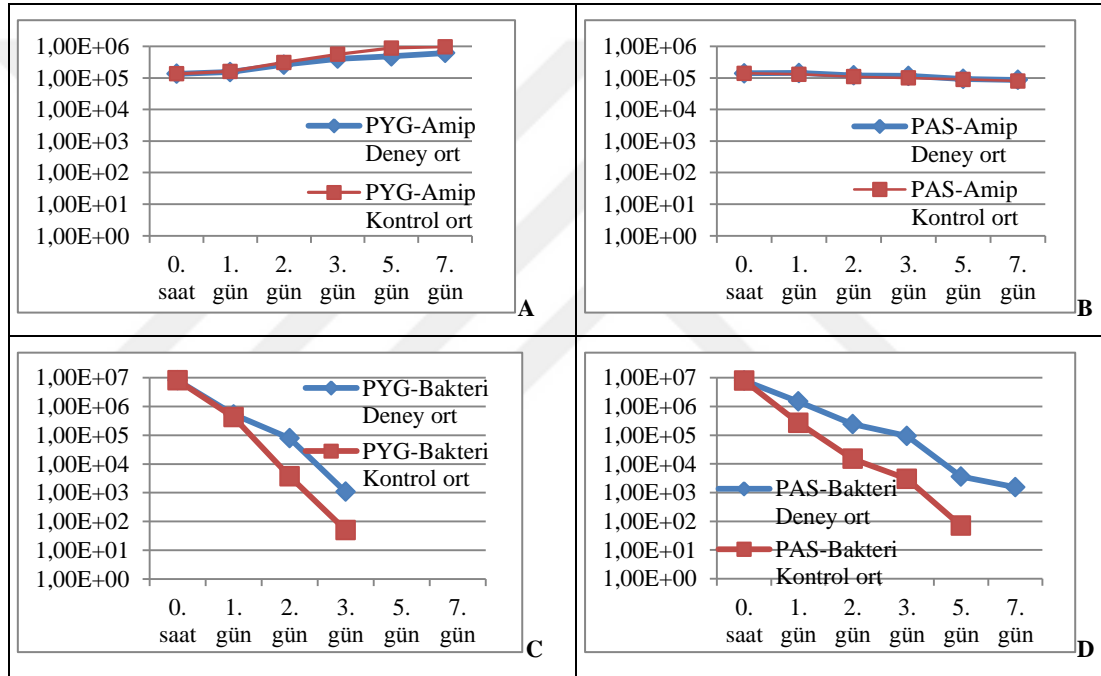
S. pneumoniae'nin *A. hatchetti* ile yüksek besin koşullarında yedi gün boyunca birlikteliğinde amibin, bakterinin canlılığı yönünde olumlu yönde etkisi olduğu gösterilmiştir. Deney kuyucuklarında 2., 3., 5. ve 7. günlerde bakteri sayıları sırasıyla $1,03 \times 10^6$ (6,0 log), $9,87 \times 10^5$ (6,0 log), $2,25 \times 10^5$ (5,4 log) ve $1,35 \times 10^5$ (5,1 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Kontrol kuyucuklarında bu sayılar sırasıyla $4,6 \times 10^4$ (4,7 log), $1,57 \times 10^4$ (4,2 log), $3,3 \times 10^3$ (3,5 log) ve $5,2 \times 10^2$ (2,7 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. *A. hatchetti*'nin yüksek besin koşullarında *S. pneumoniae* üzerine gösterdiği olumlu etki, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,093$).

Düşük besin koşullarında yedi gün boyunca *S. pneumoniae*'nin *A. hatchetti* ile birlikteliğinde, bakterinin canlılığı üzerinde amibin olumlu yönde etkisi olduğu gösterilmiştir. Deney kuyucuklarında 2., 3., 5. ve 7. günlerde bakteri sayıları sırasıyla $1,16 \times 10^6$ (6,1 log), $1,04 \times 10^6$ (6,0 log), $1,68 \times 10^5$ (5,2 log) ve $8,4 \times 10^4$ (4,9 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Kontrol kuyucuklarında bu sayılar sırasıyla $4,2 \times 10^4$ (4,6 log), $1,11 \times 10^4$ (4 log), $6,7 \times 10^3$ (3,8 log) ve $7,8 \times 10^2$ (2,9 log) bakteri/mL olarak

bulunmuştur. *A. hatchetti*'nin düşük besin koşullarında *S. pneumoniae* üzerine gösterdiği olumlu etki, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,093$).

3.3.4.2 *A. hatchetti* ile *S. pneumoniae*'nin 25 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *S. pneumoniae*'nin 25 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'de grafik şeklinde, Çizelge 3.22'de de tablo şeklinde verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.23'de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.22 Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,35E+05	1,35E+05	1,40E+05	1,40E+05	8,00E+06	8,00E+06	8,00E+06	8,00E+06
1. gün	1,53E+05	1,60E+05	1,43E+05	1,30E+05	5,20E+05	4,20E+05	1,48E+06	2,70E+05
2. gün	2,63E+05	3,10E+05	1,20E+05	1,10E+05	7,83E+04	3,70E+03	2,42E+05	1,50E+04
3. gün	4,07E+05	5,60E+05	1,17E+05	1,00E+05	1,07E+03	5,00E+01	9,33E+04	3,00E+03
5. gün	4,80E+05	8,80E+05	9,33E+04	9,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	3,61E+03	7,00E+01
7. gün	6,17E+05	9,70E+05	8,67E+04	8,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	1,54E+03	0,00E+00

Çizelge 3.23. Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 25 °C'lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	3,43E+05 ± 1,91E+05	3,35E+05 (1,35E+05 - 6,17E+05)	0,485
	Kontrol	6	5,03E+05 ± 3,62E+05	4,35E+05 (1,35E+05 - 9,70E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	1,17E+05 ± 2,33E+04	1,18E+05 (8,67E+04 - 1,43E+05)	0,485
	Kontrol	6	1,08E+05 ± 2,32E+04	1,05E+05 (8,00E+04 - 1,40E+05)	
PYG-bakteri ort	Deney	6	1,43E+06 ± 3,22E+06	3,97E+04 (0,00E+00 - 8,00E+06)	0,818
	Kontrol	6	1,40E+06 ± 3,24E+06	1,88E+03 (0,00E+00 - 8,00E+06)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	1,64E+06 ± 3,17E+06	1,68E+05 (1,54E+03 - 8,00E+06)	0,394
	Kontrol	6	1,38E+06 ± 3,24E+06	9,00E+03 (0,00E+00 - 8,00E+06)	

A. hatchetti'nin *S. pneumoniae* ile yüksek ve düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, amibin canlılığı yönünde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Sırasıyla p= 0,485 ve p= 0,485).

Yüksek besin koşullarında üç gün boyunca *S. pneumoniae*'nin *A. hatchetti* ile birlikteliği amibin, bakteri canlılığı yönünde olumlu yönde etkisi olduğunu göstermiştir. Deney kuyucuklarında 2. ve 3. günlerde bakteri sayısı sırasıyla $7,83 \times 10^4$ (4,9 log) ve $1,07 \times 10^3$ (3,0 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Kontrol kuyucuklarında bu sayılar sırasıyla $3,7 \times 10^3$ (3,6 log) ve $5,0 \times 10^1$ (1,7 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Sonraki günlerde test ve kontrol kuyucuklarında herhangi bir üreme tespit edilmemiştir. Ancak bu gözleme rağmen yüksek besin koşullarında *A. hatchetti*'nin *S. pneumoniae* üzerindeki olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,818).

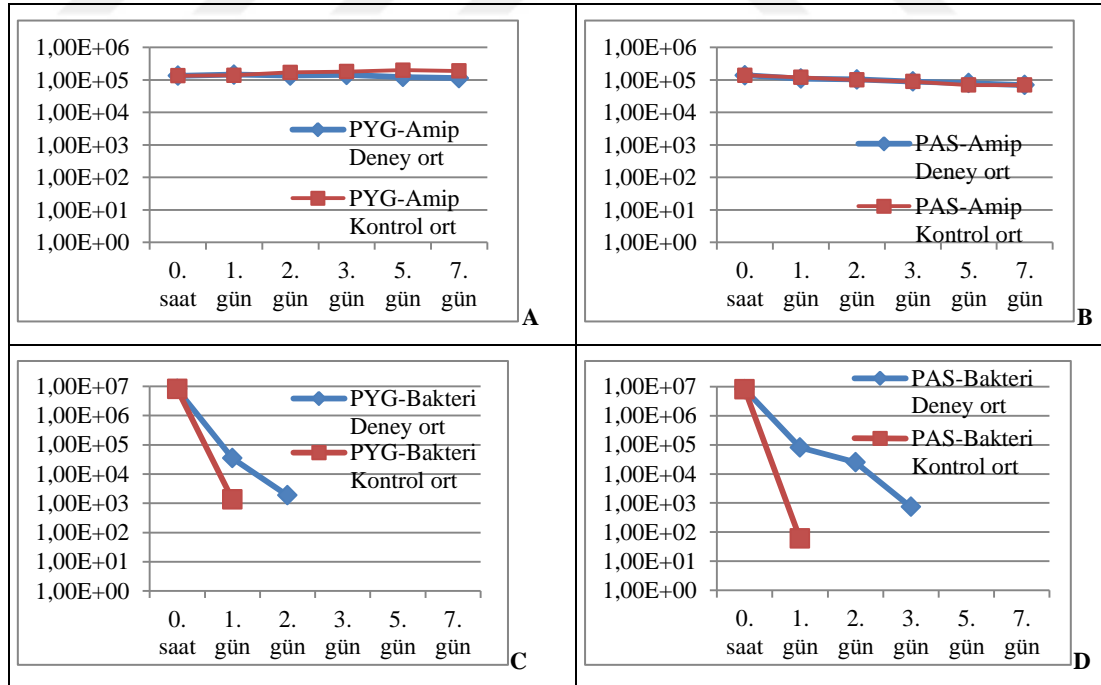
S. pneumoniae'nin *A. hatchetti* ile düşük besin koşullarında yedi gün boyunca birlikteliği amibin, bakterinin canlılığı yönünde olumlu yönde etkisi olduğunu göstermiştir. Deney kuyucuklarında 2., 3. ve 5. günlerde bakteri sayısı sırasıyla $2,42 \times 10^5$ (5,4 log), $9,33 \times 10^4$ (5,0 log) ve $3,61 \times 10^3$ (3,6 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Kontrol kuyucuklarında bu sayılar sırasıyla $1,5 \times 10^4$ (4,2 log), $3,0 \times 10^3$ (3,5 log) ve $7,0 \times 10^1$ (1,8 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Deney kuyucuğundan yapılan 7. gün bakteri sayısı ise $1,54 \times 10^3$ bakteri/mL iken kontrol kuyucuğunda üreme saptanmamıştır. Ancak bu gözleme rağmen düşük besin koşullarında *A.*

hatchetti'nin *S. pneumoniae* üzerindeki olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,394$).

3.3.4.3 A. *hatchetti* ile *S. pneumoniae*'nin 36 °C'de Hücre Dışı Etkileşimi

A. hatchetti ile *S. pneumoniae*'nin 36 °C'de direkt ko-kültür çalışmalarında elde edilen sonuçlar Şekil 3.14'de grafik şeklinde, Çizelge 3.24'de de tablo şeklinde verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.25'de gösterilmiştir.

A. hatchetti'nin *S. pneumoniae* ile düşük besin koşullarında yedi gün süresince birlikteliği, amibin canlılığı yönünde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır ($p=0,937$). Ancak yüksek besin koşullarında gözlemsel olarak bir farklılık olmamasına rağmen *A. hatchetti*'nin canlılığına istatistiksel olarak olumsuz yönde etki ettiği bulunmuştur ($p=0,041$).



Şekil 3.14. Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 36 °C'lik inkübasyonun sonuç grafikleri. A: Yüksek besin şartlarında amip canlılık sonuçları, B: Düşük besin şartlarında amip canlılık sonuçları, C: Yüksek besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları, D: Düşük besin şartlarında bakteri canlılık sonuçları.

Çizelge 3.24. Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 36 °C’lik inkübasyonun sonuç tablosu.

	PYG- Amip Deney ort	PYG- Amip Kontrol ort	PAS- Amip Deney ort	PAS- Amip Kontrol ort	PYG- Bakteri Deney ort	PYG- Bakteri Kontrol ort	PAS- Bakteri Deney ort	PAS- Bakteri Kontrol ort
0. saat	1,35E+05	1,35E+05	1,40E+05	1,40E+05	8,00E+06	8,00E+06	8,00E+06	8,00E+06
1. gün	1,47E+05	1,40E+05	1,10E+05	1,20E+05	3,44E+04	1,33E+03	8,00E+04	6,00E+01
2. gün	1,37E+05	1,70E+05	1,03E+05	1,00E+05	1,87E+03	0,00E+00	2,50E+04	0,00E+00
3. gün	1,43E+05	1,80E+05	9,00E+04	9,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	7,37E+02	0,00E+00
5. gün	1,23E+05	2,00E+05	8,00E+04	7,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
7. gün	1,13E+05	1,90E+05	7,00E+04	7,00E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Çizelge 3.25. Hücre dışı amip-*S. pneumoniae* etkileşiminde 36 °C’lik inkübasyonun istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
PYG-Amip ort	Deney	6	1,33E+05 ± 1,26E+04	1,36E+05 (1,13E+05 - 1,47E+05)	0,041
	Kontrol	6	1,69E+05 ± 2,65E+04	1,75E+05 (1,35E+05 - 2,00E+05)	
PAS-Amip ort	Deney	6	9,89E+04 ± 2,49E+04	9,67E+04 (7,00E+04 - 1,40E+05)	0,937
	Kontrol	6	9,83E+04 ± 2,79E+04	9,50E+04 (7,00E+04 - 1,40E+05)	
PYG-Bakteri ort	Deney	6	1,34E+06 ± 3,26E+06	9,33E+02 (0,00E+00 - 8,00E+06)	0,589
	Kontrol	6	1,33E+06 ± 3,27E+06	0,00E+00 (0,00E+00 - 8,00E+06)	
PAS-Bakteri ort	Deney	6	1,35E+06 ± 3,26E+06	1,29E+04 (0,00E+00 - 8,00E+06)	0,310
	Kontrol	6	1,33E+06 ± 3,27E+06	0,00E+00 (0,00E+00 - 8,00E+06)	

S. pneumoniae'nin *A. hatchetti* ile yüksek besin koşullarında iki gün süresince birlikteliği amibin, bakterinin canlılığına olumlu yönde etkisi olduğunu göstermiştir. Deney kuyucuklarının 1. gününde bakteri sayısı $3,44 \times 10^4$ (4,5 log) bakteri/mL olarak bulunmuşken kontrol kuyucuğunda bu sayı $1,33 \times 10^3$ (3,1 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Deney kuyucuklarının 2. gününde bakteri sayısı $1,87 \times 10^3$ (3,3 log) bakteri/mL olmasına rağmen kontrol çalışmasında üreme tespit edilmemiştir. Yüksek besin koşullarında *A. hatchetti*'nin, *S. pneumoniae*'nin canlılığına ilk iki günde gösterdiği olumlu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,589). Sonraki günlerdeki test ve kontrol çalışmalarında ise herhangi bir üreme tespit edilmemiştir.

Düşük besin koşullarında üç gün süresince *S. pneumoniae*'nin *A. hatchetti* ile birlikteliği amibin, bakteri canlılığına olumlu yönde etkisi olduğunu göstermiştir. Deney kuyucuklarının 1. gün bakteri sayısı $8,0 \times 10^4$ (4,9 log) bakteri/mL olarak bulunmuşken kontrol kuyucuğunda bu sayı $6,0 \times 10^1$ (1,8 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Bununla birlikte deney kuyucuklarının 2. ve 3. günlerine ait bakteri

sayıları sırasıyla $2,5 \times 10^4$ ve $7,37 \times 10^2$ bakteri/mL olmasına rağmen kontrol çalışmalarında üreme tespit edilmemiştir. Ancak düşük besin koşullarında *A. hatchetti*'nin, *S. pneumoniae*'nin canlılığına ilk üç günde gösterdiği olumlu etki, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0,310$). Sonraki günlerdeki test ve kontrol çalışmalarında ise herhangi bir üreme tespit edilmemiştir.

3.4 Hücre İçi Amip-Bakteri Etkileşimi

3.4.1 Gentamisin Sülfat ve Triton X-100 Solüsyonları Etkinlik Kontrolü

Hücre içi etkileşimin araştırılması amacıyla yapılan testlerde *A. hatchetti*'yi öldürmeden bakterileri ortadan kaldırmak için 1 000 µg/mL GS ve bakterileri öldürmeden *A. hatchetti*'yi parçalamak için %0,4 Triton X-100 solüsyonları kullanılmıştır. Bu nedenle hücre içi etkileşimin araştırılmasına yönelik çalışmalara başlamadan önce bu iki süspansiyonun, kullanılan suşlar üzerine etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlarda *B. pertussis*, *H. influenzae* ve *S. pneumoniae*'nin GS ile inkübasyonun ardından üremesinde sırasıyla 5,66 log, 6,30 log ve $>4,77$ log'luk düşüş olduğu ancak %0,4 Triton X-100 ile inkübasyonun ardından her üç bakteri suşunun üremesinde bir değişiklik olmadığı (<1 log) saptanmıştır. Bunun yanında *M. catarrhalis*'in hem GS hem de %0,4 Triton X-100 ile inkübasyonun ardından üremesinde $>6,20$ log düşüş olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle *B. pertussis*, *H. influenzae* ve *S. pneumoniae* suşları hücre içi etkileşim çalışmalarında kullanılmış ancak *M. catarrhalis* suşu kullanılamamıştır.

Kullanılan *A. hatchetti*'nin ise GS ile inkübasyonun ardından canlılığında bir farklılık olmadığı ancak Triton X-100 ile inkübasyonun ardından canlı hücre sayısında 4 log düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.26. Kullanılan GS ve %0,4 Triton X-100'ün amip ve bakteri suşları üzerine etkisi.

Kullanılan suşlar	PYG + GS	PYG + Triton X-100	PYG (Kontrol)	Değerlendirme
<i>B. pertussis</i>	1. 64 2. 86 3. 72 Ort: 74 Ort log: 1,87	1. 7,8 x 10E6 2. 9,6 x 10E6 3. 8,4 x 10E6 Ort: 8,6 x 10E6 Ort log: 6,93	1. 3,7 x 10E7 2. 3,6 x 10E7 3. 2,9 x 10E7 Ort: 3,4 x 10E7 Ort log: 7,53	- GS, suş üzerinde etkili (5,66 log düşüş) - Triton X-100 suş üzerine etkili değil
<i>H. influenzae</i>	1. 20 2. 32 3. 34 Ort: 29 Ort log: 1,46	1. 5,2x 10E6 2. 4,3x 10E6 3. 5,1x 10E6 Ort: 4,9x 10E6 Ort log: 6,69	1. 6,2 x 10E7 2. 5,6 x 10E7 3. 5,3 x 10E7 Ort: 5,7 x 10E7 Ort log: 7,76	- GS, suş üzerinde etkili (6,30 log düşüş) - Triton X-100, suş üzerine etkili değil
<i>S. pneumoniae</i>	1. <10 2. <10 3. <10 Ort: <10 Ort log: <1,00	1. 1,2 x 10E5 2. 1,7 x 10E5 3. 1,8 x 10E5 Ort: 1,56 x 10E5 Ort log: 5,19	1. 5,7 x 10E5 2. 6,1 x 10E5 3. 6,0 x 10E5 Ort: 5,9 x 10E5 Ort log: 5,77	- GS, suş üzerinde etkili (>4,77 log düşüş) - Triton X-100, suş üzerine etkili değil
<i>M. catarrhalis</i>	1. <10 2. <10 3. <10 Ort: <10 Ort log: <1,00	1. <10 2. <10 3. <10 Ort: <10 Ort log: <1,00	1. 1,4 x 10E7 2. 1,5 x 10E7 3. 1,8 x 10E7 Ort: 1,6 x 10E7 Ort log: 7,20	- GS ve Triton X-100, suş üzerinde etkili (>6,20 log düşüş)
<i>A. hatchetti</i> trofozoitleri	1. 3,4 x 10E5 2. 2,9 x 10E5 3. 3,3 x 10E5 Ort: 3,2 x 10E5 Ort log: 5,51	1. 0 2. 0 3. 0 Ort: 0 Ort log: 0	1. 3,8 x 10E5 2. 2,8 x 10E5 3. 4,2 x 10E5 Ort: 3,6 x 10E5 Ort log: 5,56	- GS trofozoitler üzerine etkili değil - Triton X-100 trofozoitler üzerine etkili (>5,56 log)

3.4.2 Amip-Bakteri Hücre İçi Etkileşim Sonuçları

Hücre içi amip-bakteri etkileşimi amacıyla yapılan direkt ko-kültür çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.27'de gösterilmiştir. Çalışmada *B. pertussis*, *H. influenzae* ve *S. pneumoniae*'nın *A. hatchetti* ile düşük ve yüksek besin koşullarında, çalışmanın gerçekleştirildiği sıcaklıkların hiçbirinde hücre içi etkileşime girmediği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.27. Amip-bakteri hücre içi etkileşimi direkt ko-kültür çalışma sonuç tabloları.

		6°C'lik ink.			25°C'lik ink.		36°C'lik ink.	
		0. s	24. s	48. s	24. s	48. s	24. s	48. s
Amip- <i>S. pneumoniae</i>								
Eklene amip sayısı: $2,8 \times 10^5$								
Eklene bakteri sayısı: $2,6 \times 10^7$								
PYG ortalama	Önceki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0
	Sonraki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0
PAS ortalama	Önceki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0
	Sonraki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0

		6°C'lik ink.			25°C'lik ink.		36°C'lik ink.	
		0. s	24. s	48. s	24. s	48. s	24. s	48. s
Amip- <i>H. influenzae</i>								
Eklene amip sayısı: $1,8 \times 10^5$								
Eklene bakteri sayısı: $3,6 \times 10^7$								
PYG ortalama	Önceki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0
	Sonraki bakteri sayısı	17	0	0	0	0	0	0
PAS ortalama	Önceki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0
	Sonraki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0

		6°C'lik ink.			25°C'lik ink.		36°C'lik ink.	
		0. s	24. s	48. s	24. s	48. s	24. s	48. s
Amip- <i>B. pertussis</i>								
Eklene amip sayısı: $2,0 \times 10^5$								
Eklene bakteri sayısı: $5,2 \times 10^7$								
PYG ortalama	Önceki bakteri sayısı	196	0	0	0	0	0	0
	Sonraki bakteri sayısı	0	0	0	0	0	0	0
PAS ortalama	Önceki bakteri sayısı	233	0	0	0	0	0	0
	Sonraki bakteri sayısı	70	0	0	0	0	0	0

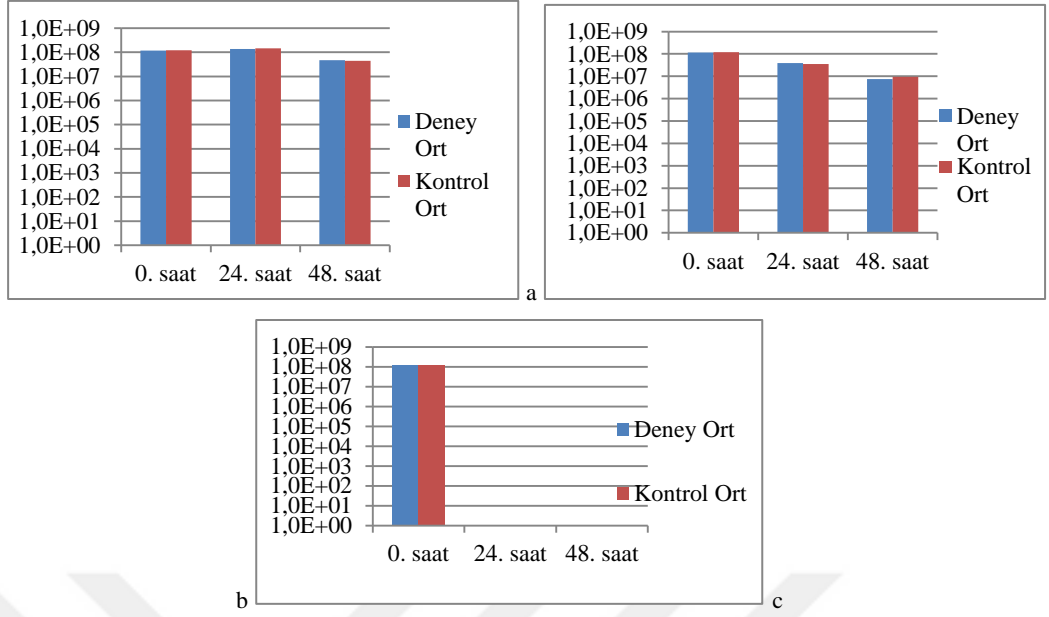
3.5 Hücre Dışına Salınan Faktörlerin Etkisi

3.5.1 Amipten Salınan Faktörlerin Bakteriler Üzerine Etkisi

Hücre dışına salınan faktörlerin etkisinin araştırılmasında öncelikle *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* suşları üzerine etkisi araştırılmıştır.

3.5.1.1 *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *B. pertussis* Üzerine Etkisi

A. hatchetti'den salınan faktörlerin *B. pertussis* üzerine etkisine ait çalışma sonuçları Şekil 3.15 ve Çizelge 3.28'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.29'de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *B. pertussis* üzerine etkisi sonuç grafikleri. a: 6 °C'de inkübasyon sonuç grafiği, b: 25 °C'de inkübasyon sonuç grafiği c: 36 °C'de inkübasyon sonuç grafiği.

Çizelge 3.28. *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *B. pertussis* üzerine etkisi sonuç tablosu. Tabloda üç tekrarlı gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması verilmiştir.

Süre	6 °C'de inkübasyon.		25 °C'de inkübasyon.		36 °C'de inkübasyon.	
	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort
0. saat	1,2E+08	1,2E+08	1,2E+08	1,2E+08	1,2E+08	1,2E+08
24. saat	1,4E+08	1,5E+08	4,0E+07	3,5E+07	0,0E+00	0,0E+00
48. saat	4,7E+07	4,4E+07	7,5E+06	9,4E+06	0,0E+00	0,0E+00

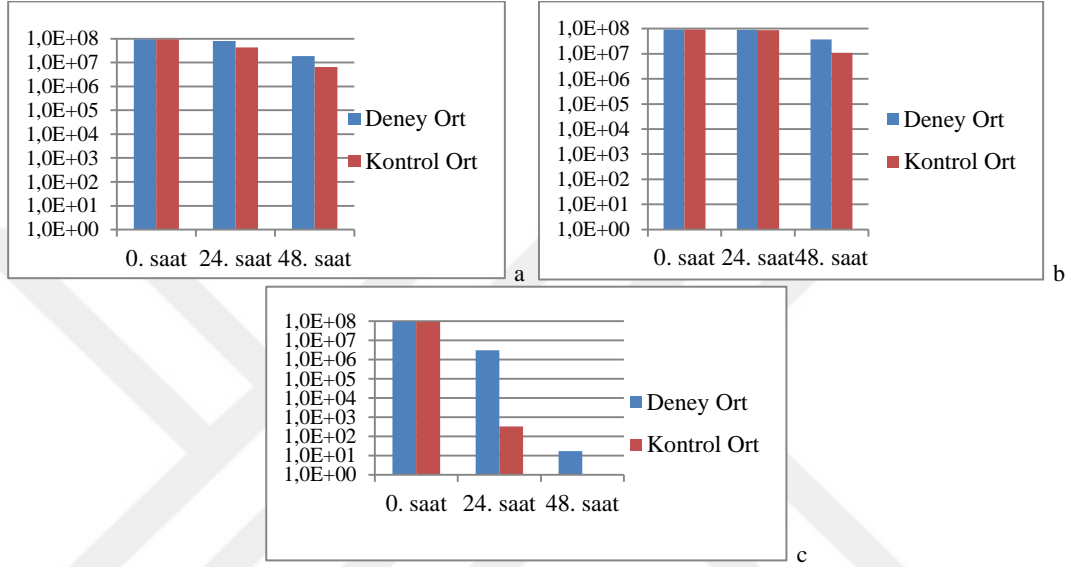
Çizelge 3.29. *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *B. pertussis* üzerine etkisi istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
6°C'de inkübasyon	Deney	3	1,00E+08 ± 4,73E+07	1,17E+08 (4,70E+07 - 4,70E+07)	1,000
	Kontrol	3	1,03E+08 ± 5,26E+07	1,20E+08 (4,43E+07 - 1,46E+08)	
25°C'de inkübasyon	Deney	3	5,46E+07 ± 5,61E+07	3,96E+07 (7,47E+06 - 1,17E+08)	1,000
	Kontrol	3	5,48E+07 ± 5,76E+07	3,55E+07 (9,37E+06 - 1,20E+08)	
36°C'de inkübasyon	Deney	3	3,89E+07 ± 6,74E+07	0,00E+00 (0,00E+00 - 1,17E+08)	1,000
	Kontrol	3	3,99E+07 ± 6,91E+07	0,00E+00 (0,00E+00 - 1,20E+08)	

A. hatchetti'den salınan faktörlerin *B. pertussis* canlılığı üzerine, 6 °C, 25 °C ve 36 °C'deki 48 saatlik inkübasyon koşullarında bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (p= 1,000).

3.5.1.2 A. hatchetti'den salınan faktörlerin H. influenzae Üzerine Etkisi

Amipten salınan faktörlerin H. influenzae üzerine etkisine ait çalışma sonuçları Şekil 3.16 ve Çizelge 3.30'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.31'de gösterilmiştir.



Şekil 3.16. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin H. influenzae üzerine etkisi sonuç grafikleri. a: 6 °C'de inkübasyon sonuç grafiği, b: 25 °C'de inkübasyon sonuç grafiği c: 36 °C'de inkübasyon sonuç grafiği.

Çizelge 3.30. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin H. influenzae üzerine etkisi sonuç tablosu. Tabloda üç tekrarlı gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması verilmiştir.

Süre	6 °C'de inkübasyon.		25 °C'de inkübasyon.		36 °C'de inkübasyon.	
	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort
0. saat	9,2E+07	9,4E+07	9,2E+07	9,4E+07	9,2E+07	9,4E+07
24. saat	8,0E+07	4,3E+07	9,1E+07	8,8E+07	3,1E+06	3,3E+02
48. saat	1,9E+07	6,5E+06	3,7E+07	1,1E+07	1,7E+01	0,0E+00

Çizelge 3.31. A. hatchetti'den salınan faktörlerin H. influenzae üzerine etkisi istatistik verileri.

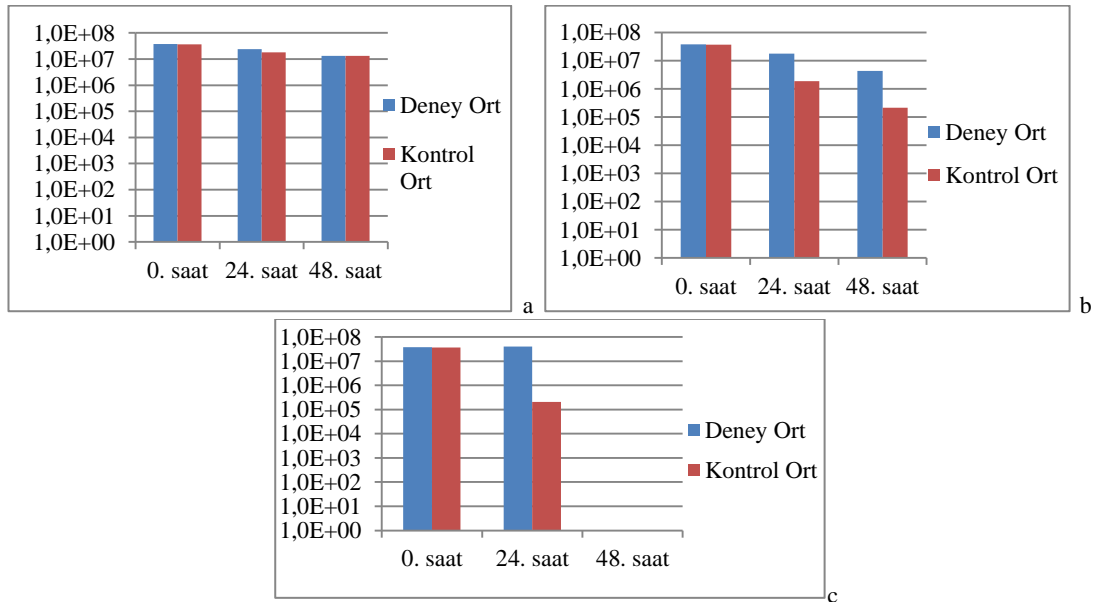
Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
6°C'de inkübasyon	Deney	3	6,36E+07 ± 3,94E+07	7,97E+07 (1,87E+07 - 9,23E+07)	1,000
	Kontrol	3	4,78E+07 ± 4,38E+07	4,33E+07 (6,50E+06 - 9,37E+07)	
25°C'de inkübasyon	Deney	3	7,34E+07 ± 3,13E+07	9,07E+07 (3,73E+07 - 9,23E+07)	1,000
	Kontrol	3	6,41E+07 ± 4,61E+07	8,77E+07 (1,10E+07 - 9,37E+07)	
36°C'de inkübasyon	Deney	3	3,18E+07 ± 5,24E+07	3,07E+06 (1,70E+01 - 9,23E+07)	1,000
	Kontrol	3	3,12E+07 ± 5,41E+07	3,27E+02 (0,00E+00 - 9,37E+07)	

A. hatchetti'den salınan faktörlerin *H. influenzae* canlılığı üzerine 6 °C ve 25 °C'de 48 saat boyunca bir etki yapmadığı tespit edilmiştir (Sırasıyla p= 1,000 ve p= 1,000).

Amipten salınan faktörlerin 36 °C'de bakteri canlılığı üzerinde ise olumlu yönde etkisi olduğu gösterilmiştir. Deney tüplerinin 24. ve 48. saatlerinde *H. influenzae* sayısı sırasıyla $3,1 \times 10^6$ (6,5 log) bakteri/mL ve $1,7 \times 10^2$ bakteri/mL iken kontrol tüpünde 24. saatte $3,3 \times 10^2$ (2,5 log) bakteri/mL tespit edilmiştir. Kontrol tüpünün 48. saatinde ise bir üremeye rastlanmamıştır. Ancak bu gözlemsel sonuçlara rağmen *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *H. influenzae* canlılığına üzerine olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 1,000).

3.5.1.3 *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *M. catarrhalis* Üzerine Etkisi

M. catarrhalis'in canlılığı üzerine amipten salınan faktörlerin etkisine ait çalışma sonuçları Şekil 3.17 ve Çizelge 3.32'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.33'de gösterilmiştir.



Şekil 3.17. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin *M. catarrhalis* üzerine etkisi sonuç grafikleri. a: 6°C'de inkübasyon sonuç grafiği, b: 25°C'de inkübasyon sonuç grafiği c: 36°C'de inkübasyon sonuç grafiği

Çizelge 3.32. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin *M. catarrhalis* üzerine etkisi sonuç tablosu. Tabloda üç tekrarlı gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması verilmiştir.

Süre	6 °C'de inkübasyon.		25 °C'de inkübasyon.		36 °C'de inkübasyon.	
	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort
0. saat	3,8E+07	3,7E+07	3,8E+07	3,7E+07	3,8E+07	3,7E+07
24. saat	2,4E+07	1,8E+07	1,8E+07	1,9E+06	4,0E+07	2,0E+05
48. saat	1,3E+07	1,3E+07	4,4E+06	2,1E+05	0,0E+00	0,0E+00

Çizelge 3.33. *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *M. catarrhalis* üzerine etkisi istatistik verileri.

Değişken		n	Ort±sd	Median (Min-Max)	P değeri
6 °C'de inkübasyon	Deney	3	2,49E+07 ± 1,23E+07	2,40E+07 (1,31E+07 - 3,77E+07)	1,000
	Kontrol	3	2,26E+07 ± 1,22E+07	1,79E+07 (1,34E+07 - 3,65E+07)	
25 °C'de inkübasyon	Deney	3	1,99E+07 ± 1,68E+07	1,76E+07 (4,37E+06 - 3,77E+07)	0,400
	Kontrol	3	1,29E+07 ± 2,05E+07	1,87E+06 (2,14E+05 - 3,65E+07)	
36 °C'de inkübasyon	Deney	3	2,60E+07 ± 2,26E+07	3,77E+07 (0,00E+00 - 4,03E+07)	0,400
	Kontrol	3	1,22E+07 ± 2,10E+07	2,04E+05 (0,00E+00 - 3,65E+07)	

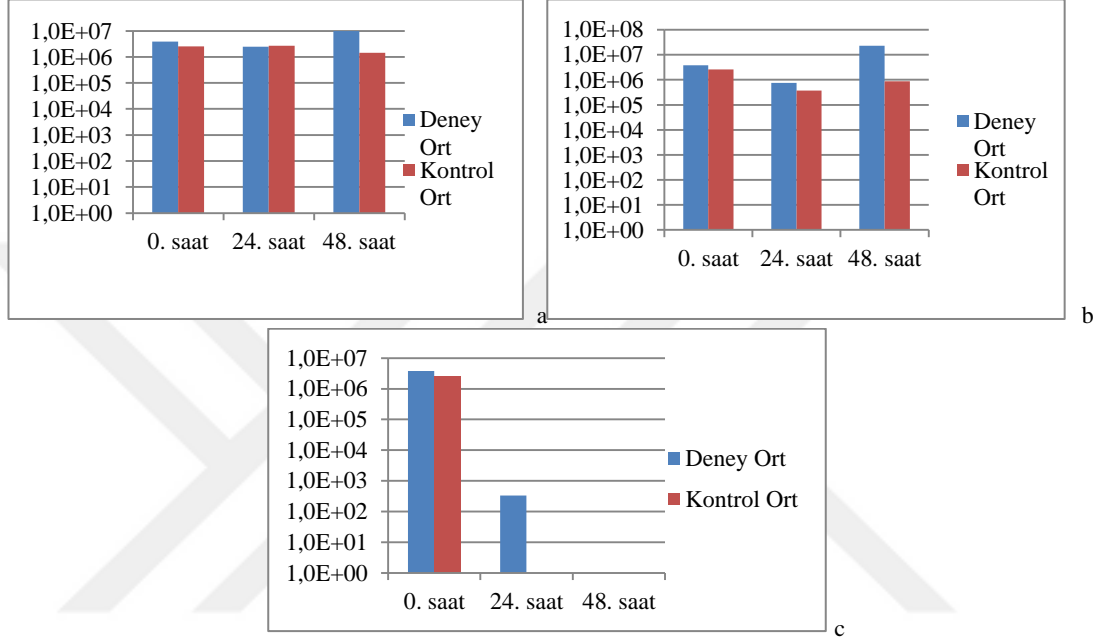
A. hatchetti'den salınan faktörlerin *M. catarrhalis* canlılığı üzerine 6 °C'de 48 saat boyunca etki etmediği tespit edilmiştir (p= 1,000).

Amipten salınan faktörlerin 25 °C'lik inkübasyonda zaman içerisinde *M. catarrhalis* canlılığı üzerine olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. Deney tüplerinde 24. ve 48. Saatlerde bakteri sayısı sırasıyla $1,8 \times 10^7$ (7,3 log), $1,9 \times 10^6$ (6,3 log) bakteri/mL bulunmuşken kontrol tüplerinde $4,4 \times 10^6$ (6,6 log) $2,1 \times 10^5$ (5,3 log) bakteri/mL olarak bulunmuştur. Ancak bu gözleme rağmen *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin 25 °C'lik inkübasyonda *M. catarrhalis* canlılığı üzerine olumlu etkisi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,400).

Bunun yanında, 36 °C'lik inkübasyonda amipten salınan faktörlerin *M. catarrhalis* canlılığı üzerine 24. saatte olumlu etki gösterdiği bulunmuştur. Deney tüplerinde 24. saatte bakteri sayısı $4,0 \times 10^7$ (7,6 log) bakteri/mL iken kontrol tüpünde $2,0 \times 10^5$ (5,3 log) bakteri/mL tespit edilmiştir. 48 saatte yapılan canlılık kontrolünde ise deney ve kontrol tüplerinde üreme olmamıştır. Ancak bu gözleme rağmen *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin 36 °C'lik inkübasyonda *M. catarrhalis* canlılığı üzerine olumlu etkisi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,400).

3.5.1.4 A. hatchetti'den salınan faktörlerin S. pneumoniae Üzerine Etkisi

Amipten salınan faktörlerin S. pneumoniae üzerine etkisine ait çalışma sonuçları Şekil 3.18 ve Çizelge 3.34'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.35'de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin S. pneumoniae üzerine etkisi sonuç grafikleri. a: 6 °C'de inkübasyon sonuç grafiği, b: 25 °C'de inkübasyon sonuç grafiği c: 36 °C'de inkübasyon sonuç grafiği

Çizelge 3.34. Amipten hücre dışına salınan faktörlerin S. pneumoniae üzerine etkisi sonuç tablosu. Tabloda üç tekrarlı gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması verilmiştir.

Süre	6 °C'de inkübasyon.		25 °C'de inkübasyon.		36 °C'de inkübasyon.	
	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort
0. saat	3,8E+06	2,6E+06	3,8E+06	2,6E+06	3,8E+06	2,6E+06
24. saat	2,5E+06	2,7E+06	7,4E+05	3,7E+05	3,3E+02	0,0E+00
48. saat	1,0E+07	1,4E+06	2,3E+07	8,7E+05	0,0E+00	0,0E+00

Çizelge 3.35. A. hatchetti'den salınan faktörlerin S. pneumoniae üzerine etkisi istatistik verileri.

Değişken	n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
6°C'de inkübasyon	Deney	3 5,42E+06 ± 4,00E+06	3,84E+06 (2,45E+06 - 9,97E+06)	0,400
	Kontrol	3 2,24E+06 ± 7,01E+05	2,57E+06 (1,43E+06 - 2,71E+06)	
25°C'de inkübasyon	Deney	3 9,08E+06 ± 1,19E+07	3,84E+06 (7,43E+05 - 2,27E+07)	0,400
	Kontrol	3 2,27E+07 ± 1,15E+06	8,70E+05 (3,67E+05 - 2,57E+06)	
36°C'de inkübasyon	Deney	3 1,28E+06 ± 2,22E+06	3,33E+02 (0,00E+00 - 3,84E+06)	0,700
	Kontrol	3 8,56E+05 ± 1,48E+06	0,00E+00 (0,00E+00 - 2,57E+06)	

A. hatchetti'den salınan faktörlerin *S. pneumoniae* canlılığı üzerine 6 °C'de 48 saat boyunca bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (p= 0,400).

Bununla birlikte, 25 °C'de 48. saatteki inkübasyonda, deney tüpünde bakteri sayısı $2,7 \times 10^7$ (7,4 log) bakteri/mL iken kontrol tüpünde $8,7 \times 10^5$ (5,9 log) bakteri/mL tespit edilmiş ve amipten salınan faktörlerin bakteri canlılığına olumlu etkisi gözlenmiştir. Bu olumlu gözleme rağmen istatistiksel yönden anlamlı bir etki bulunmamıştır (p= 0,400).

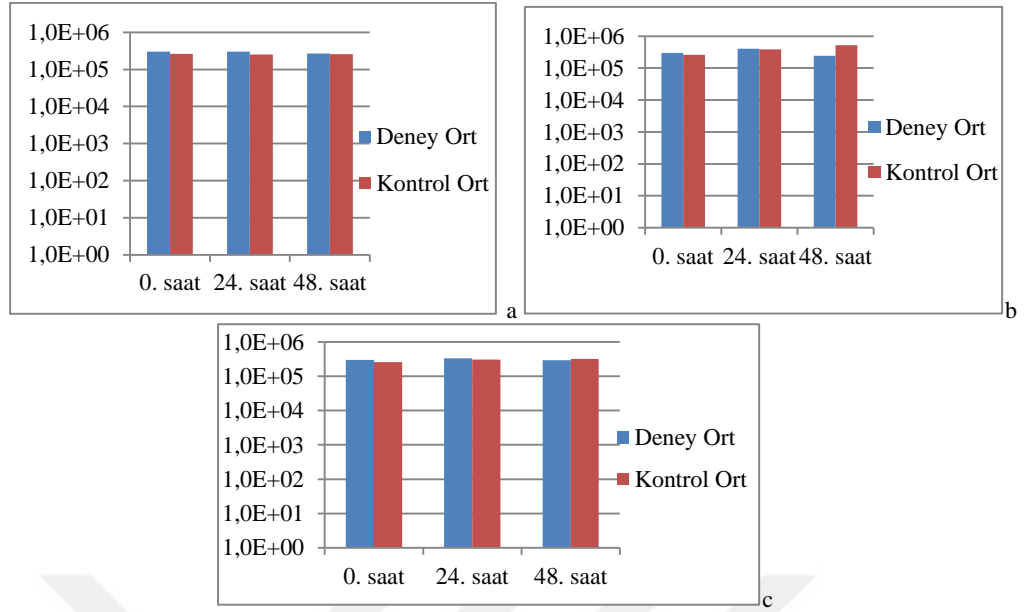
Deney tüplerinin 36 °C'lik inkübasyonunda ise 24. saatteki bakteri sayısı $3,3 \times 10^2$ bakteri/mL iken kontrol tüpünde bir üremeye rastlanmamış, amipten salınan faktörlerin bakteri canlılığına olumlu etkisi gözlenmiştir. Bu olumlu gözleme rağmen istatistiksel yönden anlamlı bir etki bulunmamıştır (p= 0,700).

3.5.2 Bakterilerden Salınan Faktörlerin Amip Üzerine Etkisi

Bakteriden salınan faktörlerin amip canlılığı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla, sıvı kültürleri yapılabilen *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'nin hücre dışına salınan faktörlerinin amibe karşı etkisi araştırılmıştır.

3.5.2.1 *M. catarrhalis*'den salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi

M. catarrhalis'den salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisine ait çalışma sonuçları Şekil 3.19 ve Çizelge 3.36'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.37'de gösterilmiştir.



Şekil 3.19. *M. catarrhalis*'den salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi sonuç grafikleri.
a: 6 °C'de inkübasyon sonuç grafiği, b: 25 °C'de inkübasyon sonuç grafiği c: 36 °C'de inkübasyon sonuç grafiği.

Çizelge 3.36. *M. catarrhalis*'den salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi sonuç tablosu. Tabloda üç tekrarlı gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması verilmiştir.

Süre	6°C'de inkübasyon		25°C'de inkübasyon		36°C'de inkübasyon.	
	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort
0. saat	3,0E+05	2,6E+05	3,0E+05	2,6E+05	3,0E+05	2,6E+05
24. saat	3,0E+05	2,5E+05	4,0E+05	3,8E+05	3,3E+05	3,1E+05
48. saat	2,7E+05	2,6E+05	2,4E+05	5,2E+05	3,0E+05	3,2E+05

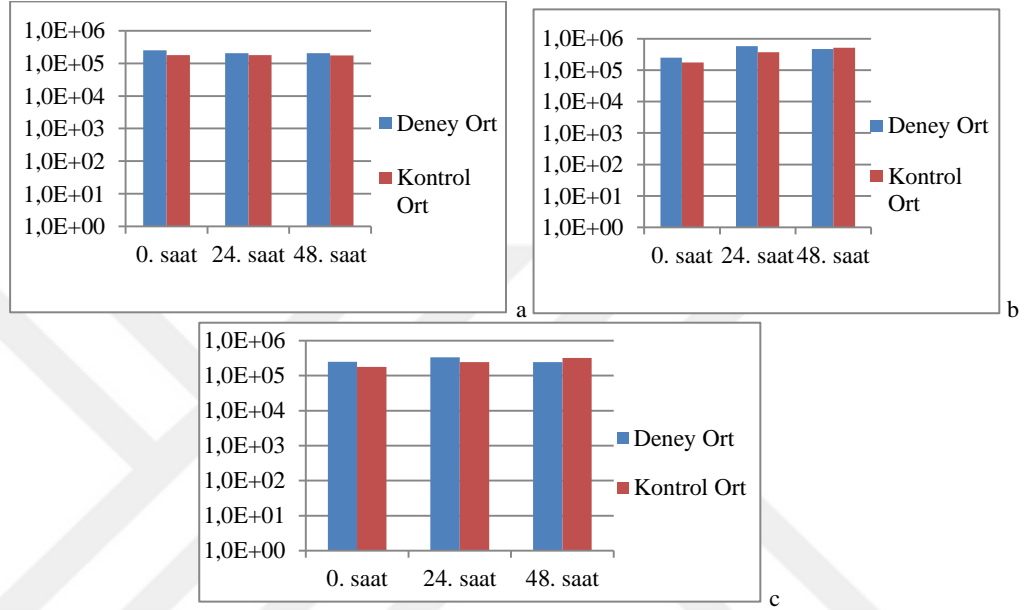
Çizelge 3.37. *M. catarrhalis*'den salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi istatistik verileri.

Değişken		n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri
6°C'de inkübasyon	Deney	3	2,90E+05 ± 2,03E+04	3,00E+05 (2,67E+05 - 3,03E+05)	0,100
	Kontrol	3	2,57E+05 ± 3,33E+03	2,57E+05 (2,53E+05 - 2,60E+05)	
25°C'de inkübasyon	Deney	3	3,16E+05 ± 8,11E+04	3,00E+05 (2,43E+05 - 4,03E+05)	0,700
	Kontrol	3	3,87E+05 ± 1,28E+05	3,83E+05 (2,60E+05 - 5,17E+05)	
36°C'de inkübasyon	Deney	3	3,10E+05 ± 2,03E+04	3,00E+05 (2,97E+05 - 3,33E+05)	1,000
	Kontrol	3	2,98E+05 ± 3,34E+04	3,10E+05 (2,60E+05 - 3,23E+05)	

M. catarrhalis'den salınan faktörlerin 6 °C, 25 °C ve 36 °C'deki inkübasyon koşullarında 48 saat süresince *A. hatchetti* canlılığı üzerine önemli bir etkisi tespit edilmemiştir (Sırasıyla p= 0,100, p= 0,700 ve p= 1,000).

3.5.2.2 *S. pneumoniae*'dan salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi

S. pneumoniae'dan salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisine ait çalışma sonuçları Şekil 3.20 ve Çizelge 3.38'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler ise Çizelge 3.39'de gösterilmiştir.



Şekil 3.20. *S. pneumoniae*'dan salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi sonuç grafikleri. a: 6 °C'de inkübasyon sonuç grafiği, b: 25 °C'de inkübasyon sonuç grafiği c: 36 °C'de inkübasyon sonuç grafiği.

Çizelge 3.38. *S. pneumoniae*'dan salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi sonuç tablosu. Tabloda üç tekrarlı gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalaması verilmiştir.

Süre	6°C'de inkübasyon		25°C'de inkübasyon		36°C'de inkübasyon.	
	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort	Deney Ort	Kontrol Ort
0. saat	2,5E+05	1,8E+05	2,5E+05	1,8E+05	2,5E+05	1,8E+05
24. saat	2,0E+05	1,8E+05	5,8E+05	3,7E+05	3,3E+05	2,4E+05
48. saat	2,0E+05	1,7E+05	4,6E+05	5,1E+05	2,5E+05	3,2E+05

Çizelge 3.39. *S. pneumoniae*'dan salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi istatistik verileri.

Değişken	n	Ortalama ± sd	Median (Min-Max)	P değeri	
6°C'de inkübasyon	Deney	3	2,19E+05 ± 2,69E+04	2,03E+05 (2,03E+05 - 2,50E+05)	0,100
	Kontrol	3	1,76E+05 ± 1,92E+03	1,77E+05 (1,73E+05 - 1,77E+05)	
25°C'de inkübasyon	Deney	3	4,30E+05 ± 1,66E+05	4,63E+05 (2,50E+05 - 5,77E+05)	0,700
	Kontrol	3	3,52E+05 ± 1,69E+05	3,67E+05 (1,77E+05 - 5,13E+05)	
36°C'de inkübasyon	Deney	3	2,77E+05 ± 4,91E+04	2,50E+05 (2,47E+05 - 3,33E+05)	0,400
	Kontrol	3	2,47E+05 ± 7,17E+04	2,43E+05 (1,77E+05 - 3,20E+05)	

S. pneumoniae'dan salınan faktörlerin 6 °C, 25 °C ve 36 °C'deki inkübasyon koşullarında 48 saat süresince *A. hatchetti* canlılığı üzerine önemli bir etkisi tespit edilmemiştir (Sırasıyla p= 0,100, p= 0,700 ve p= 0,400).



4. TARTIŞMA

Acanthamoeba spp., *N. fowleri*, *B. mandrillaris* ve *Sappinia* spp. tüm dünya’da bulunan, doğada toprak ve suda yaşayan ve bu nedenle temastan kaçınılması pek mümkün olmayan, insan ve hayvanlarda enfeksiyona neden olabilen fırsatçı patojen SYA’dır. Bunlar içerisinde çevrede en yaygın ve sık bulunanı ise *Acanthamoeba* spp.’dir. Sebep oldukları enfeksiyon sayıları incelendiğinde *Acanthamoeba* ensefaliti vakalarının 1960-2000 yılları arasında yaklaşık 200, *Acanthamoeba* keratiti vakalarının ise 1980-2000 yılları arasında 3000’den fazla olduğu görülmektedir. İnsanlarda enfeksiyona en sık neden olan suşların da *A. polyphaga* (T4), *A. castellanii* (T4), *A. culbertsoni* (T10), *A. hatchetti* (T11) ve *A. healyi* (T12) olduğu saptanmıştır (Schuster ve Visvesvara 2004).

Acanthamoeba türleri doğada bakterilerle beslenirken, diğer yandan da ADB olarak adlandırılan ve özellikle patojen olan bazı bakteriler ise amip içerisinde veya dışında amiple etkileşime girerek canlılıklarını sürdürebilmekte ve bu etkileşimden amip ve/veya bakteriler pek çok fayda sağlayabilmektedir (Guimaraes ve ark., 2016).

SYA ile etkileşime giren bakteri suşları olumsuz çevresel koşullarda daha uzun yaşayabilmekte, sayılarını arttırabilmekte, uzak mesafelere yayılabilmekte, virülan özellik kazanabilmekte, antibiyotik ve biyosidal ürünlere direnç geliştirebilmektedir. Bununla birlikte bakteriler amip hücrelerini bir “antrenman alanı” veya “Truva atı” olarak kullanarak insan vücudunda fagositoz yoluyla oluşan savunma mekanizmalarına direnebilmekte veya savunma sisteminden kaçarak özellikle solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilme kabiliyetini arttırabilmektedir (Denoncourt ve ark., 2014). Bunun yanında, bazı SYA de bakterilerle etkileşim neticesinde canlılık sürelerinde ve patojenitelerinde artış gösterebilmektedir (Khan ve Siddiqui 2014 ve Singer 2010).

Çevresel ortamlardaki yaygınlığı yanında SYA’in, insanlar tarafından oluşturulan su sistemleri içerisinde de (şebeke suyu, soğutma kuleleri, klima

sistemleri vb.) özellikle mikrobiyal biyofilm tabakası içerisinde bulunduğu ve buradaki mikroorganizmalarla beslendiği bilinmektedir (Molmeret ve ark., 2005 ve Trabelsi ve ark., 2012). Biyofilm tabakası içerisinde bulunabilen ve TKP nedenleri arasında yer alan bakteriler (*Legionella*, *Chlamydia*, Tüberküloz dışı mikobakteriler vb.) ile başta hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında yer alan diğer farklı ADB (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* vb.), *Acanthamoeba* ve diğer SYA ile etkileşime geçebilmektedir. Bu durumun, halk sağlığının korunmasına yönelik gerçekleştirilen sağlıklı su temini ile ilgili önlemlerin ve uygulamaların (dezenfeksiyon vb.) etkinliğini azalttığı düşünülmektedir (Ashbolt, 2015b).

Suda bulunabilen özellikle patojen bakterilerin, su ve benzeri ortamlarda doğal olarak bulunan SYA ile birlikteliklerinin canlılık süreleri, üremeleri ve taşınmalarında önemli roller üstlendiği ortaya konulmuştur. Bu bilgiler ışığında, sularda SYA varlığı halk sağlığı açısından üç yönden dikkatle değerlendirilmelidir: i) SYA çeşitli patojen ADB ile enfekte olabilmekte, ii) SYA patojen ADB için su sistemlerinde taşıyıcı konak olarak rol alarak bunların enfeksiyon oluşturmalarını etkin bir şekilde kolaylaştırabilmekte ve iii) Bazı fırsatçı patojen SYA insanlarda klinik veya subklinik enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Hoffmann ve Michel, 2001 ve Thomas ve Ashbolt, 2011).

Filippo ve ark. (2015) İtalya'da farklı su çeşitlerinden oluşan toplam 160 su örneğinin 46'sında (%28,7) SYA kültürünü pozitif olarak bulmuştur. Yapılan moleküler tiplendirmede ise 46 örneğin 18'inin *Acanthamoeba* (13 T4 ve 5 T15) olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Bulgaristan'da yapılan bir çalışmada çevresel su ve toprak örneklerinin %61,1'inde SYA (*Acanthamoeba* spp. ve *Hartmannella* spp.) bulunmuştur (Tsvetkova ve ark., 2004). İspanya'da yapılan başka bir çalışmada ise çevresel ve şebeke sistemlerinin yer aldığı farklı su çeşitleride, kültür ve moleküler yöntemler birlikte değerlendirildiğinde %99,1'inde *Acanthamoeba* T4 ve bir tanesinde *B. mandrillaris* ilk kez tespit edilmiştir (Magnet ve ark., 2013).

Güney Afrika'da yapılan çalışmada hastane çeşmelerinden toplanan örneklerin %88,7'sinde SYA (*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* spp. ve *Hartmannella* spp.

morfolojilerine göre tanımlanmıştır) olduğu tespit edilmiştir (Muchesa ve ark., 2015). Gine Bissau’da yapılan çalışmada da kuyu sularının %68,2’sinde SYA olduğu bunların da farklı oranlarda *Acanthamoeba* (T3 ve T4), *N. fowleri* ve *B. mandrillaris* olduğu bulunmuştur (Baquero ve ark. 2014). İran’da yapılan çalışmada da havuz ve durgun suların %40,8’inde *Acanthamoeba* bulunduğu ve bunların yaklaşık %89,5’unun T4 genotipinde olduğu gösterilmiştir (Aghajani ve ark., 2016).

Türkiye’de yapılan benzer çalışmalarda Coşkun ve ark., (2013), Sivas’ta yaptıkları çalışmada, 150 çeşme suyunun 33’ünde (%22) SYA tespit etmiştir. Saptanan SYA’in biri *A. polyphaga* (T4), sekizi *A. castellanii* (T4) ve 24’ü *H. vermiformis* olarak tanımlanmıştır. Kayseri’de yapılan bir çalışmada ise kuyu sularında %19,23 oranında *Acanthamoeba* (T4) pozitifliği bulunduğu gösterilmiştir (Kuk ve ark., 2013). Yapılan en güncel çalışmaların birinde de Çamur ve ark. (2016), Türkiye’deki kaplıca sularında SYA (*Naegleria* spp. ve *Acanthamoeba* spp.) oranını %34,1 olarak bulmuştur. Yazarlar bu durumun, koruyucu önlemlerin uygulanması ve halk sağlığının korunması açısından dikkate alınması gerektiğini belirtmiş ve konu ile ilgili tavsiyelerde bulunmuştur.

Türkiye’de farklı illerde yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde çevresel örneklerde (su vb.), başta *Acanthamoba* olmak üzere SYA’in tespit oranının %13-40 arasında olduğu görülmektedir (Coşkun ve ark., 2013; Doğan ve ark., 2013 ve Özçelik ve ark., 2012). Bu yüksek oranlara rağmen, SYA’in patojen bakteriler ile göstermiş olduğu etkileşime yönelik yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanında dünyada da *B. pertussis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* gibi solunum yolu patojenlerinin SYA ile etkileşimine yönelik çalışmaların yapılmadığı ancak birkaç çalışmada tesadüfen bu patojenlerin SYA ile ilişkilendirildiği görülmektedir (Erci ve ark., 2013 ve Evastigneeva ve ark., 2009).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada amipler ile bakterilerin nasıl bir ilişki içerisinde olduğu anlaşılammış olsa da Erci ve ark. (2013), su örneklerinde kültür yöntemi ile % 39,8 moleküler yöntemlerle %79,6 oranında SYA (*H. vermiformis*, *Acanthamoeba* spp., *N. fowleri* ve *Vanella* spp.) tespit edilmiştir. Bunun yanında

kültürden izole edilen SYA'dan %23,1 oranında solunum yolu patojenleri (*S. pneumoniae* *Mycobacterium* spp., *C. pneumoniae* ve *B. pertussis*), sudan yapılan moleküler yöntemle %32,7 oranında ise solunum yolu patojenlerini (*S. pneumoniae* *Mycobacterium* spp., *H. influenzae*, *C. pneumoniae* ve *B. pertussis*) tespit etmesi dikkat çekici olmuştur.

İki farklı hücre popülasyonu arasındaki etkileşimin incelenmesinde ko-kültür sistemleri kullanılmaktadır. Bunlardan ilki, bakterinin amiple aynı ortamı paylaşması sonucunda, amibin canlılığının ve/veya bakterinin hücre içi ya da hücre dışındaki canlılığının kontrol edildiği ko-kültür çalışmalarıdır. Bir diğeri, amipten salınan faktörlerin bakteri canlılığı üzerine veya bakteriden salınan faktörlerin amip canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı ve hücre popülasyonlarının temas etmediği çalışmalarıdır (Gores ve ark., 2014). Çalışmamızda amip-bakteri popülasyonlarının temas ettiği ve temas etmediği çalışma ortamları kullanılarak, seçilen bakteri suşları ile amip suşu arasındaki etkileşim araştırılmıştır.

Amip-bakteri etkileşiminde *Acanthamoeba*'nın canlılık süresi ve üremesinin bakteri türü ve yoğunluğundan etkilendiğine dair bulgulara ulaşılmıştır. Gram negatif bakterilerin (*P. aeruginosa*, *E coli*, *Serratia marcescens* ve *S. maltophilia* vb.) düşük yoğunlukta olması *Acanthamoeba*'nın üremesini desteklerken, örneğin *P. aeruginosa*:amip oranının 100:1 olduğu bir ortamda *Acanthamoeba*'nın üremesinin baskılandığı tespit edilmiştir (Wang ve Ahearn, 1997). Çalışmamızda yapılan deneylerde amip:bakteri oranı, diğer bakteriler ile yapılan amip-bakteri etkileşim çalışmalarında kullanılan 1:100 oranı esas alınarak belirlenmiştir (Akyu ve ark., 2010; Huws ve ark., 2008; Lambrecht ve ark., 2013 ve Tezcan-Merdol ve ark., 2004).

Ortam sıcaklığının da amip-bakteri etkileşiminde önemli olduğunu ortaya konulmuştur. Anand ve ark. (1983), 37 °C'de *Legionella*'nın *Acanthamoeba* suşunu parçaladığını ancak 20 °C'de tersine *Acanthamoeba*'nın bakteriyi sindirdiği tespit etmiştir. Ohno ve ark. (2008), *L. pneumophila*'nın 25 °C üstü sıcaklıklarda *A. castellanii* içerisinde yaşadığını ve çoğaldığını ancak 20 °C altı sıcaklıklarda amip

tarafından sindirildiğini gözlemlemiştir. *Parachlamydia acanthamoeba* suşu ise 32-37 °C aralığında *A. polyphaga*'yı parçalarken, 25-30 °C aralığında endosimbiyont olarak bulunmaktadır (Greub ve ark., 2003). Çalışmamızda bu farklılıklar dikkate alınarak ve benzer çalışmalarda olduğu gibi deneyler, 6 °C, 25 °C ve 36 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (Akyü ve ark., 2010 ve Lambrecht ve ark., 2013).

Acanthamoeba'nın bakterilerle beslenebilme yeteneği bakterinin virölans özelliklerine ve ortamdaki besin koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir (Khan 2006). Çalışmamızda kullanılan amip suşu aynı kalırken, yüksek ve düşük besin koşulları oluşturularak enfeksiyon etkeni olan ve hastalardan izole edilen bakteriler ile amip arasındaki etkileşim araştırılmıştır.

Bu çalışmada ilk olarak, bakteri-amip direkt ko-kültür yöntemi kullanılarak yapılan hücre dışı etkileşim deneyleri sonucunda, *A. hatchetti* ile *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'nin 6 °C, 25 °C ve 36 °C'de yedi gün boyunca yüksek ve düşük besin koşullarında birbirlerinin canlılıkları üzerinde yaptıkları etki incelenmiştir.

Hücre dışı direkt ko-kültür deneylerinde *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'nin 6 °C'de *A. hatchetti* canlılığına bir etki yapmadığı gözlenmiştir. *A. hatchetti*'nin ise yüksek ve düşük besin koşullarında *H. influenzae*'ya, yüksek besin koşulunda ise *B. pertussis* canlılığına bir etki yapmadığı tespit edilmiştir. Diğer yandan düşük besin koşulunda *B. pertussis* ile düşük ve yüksek besin koşullarında *S. pneumoniae* canlılığı üzerinde olumlu, *M. catarrhalis* canlılığı üzerinde ise olumsuz yönde etki gösterdiği gözlenmiş ancak bu gözlemler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bakteri-amip hücre dışı etkileşimine yönelik 25 °C'deki çalışmamızda *B. pertussis*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'nin *A. hatchetti* canlılığına etki göstermediği bulunmuştur. Bununla birlikte, *H. influenzae*, *A. hatchetti*'nin canlılığına düşük besin koşullarında etki göstermemişken yüksek besin koşullarında

7. günde olumsuz bir etki göstermiş ancak bu etki, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Hücre dışı etkileşim çalışmamızda, 25 °C'deki bulgularımıza göre *A. hatchetti*'nin, *H. influenzae*'nin canlılığına yüksek ve düşük besin koşullarında 5. günde, *S. pneumoniae* canlılığına ise yedi gün boyunca olumlu etki yaptığı gösterilmiştir. Amibin *B. pertussis*'e yüksek besin koşullarında 5. ve 7. günlerde olumsuz etki yaptığı bulunmuşken *M. catarrhalis*'in canlılığında ise yedi gün boyunca yüksek ve düşük besin koşullarında olumsuz bir etki yaptığı gözlenmiştir. Ancak bu gözlemlere rağmen istatistiksel yönden anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ($p > 0,05$).

Hücre dışı etkileşim çalışmamızın 36 °C'deki sonuçlarına bakıldığında *B. pertussis*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*'in *A. hatchetti* canlılığına etki etmediği tespit edilmiştir. Ancak *S. pneumoniae*'nin sadece yüksek besin koşullarında amip canlılığına olumsuz yönde etki ettiği bulunmuştur ($p = 0,041$). Elde edilen sonuçların yakınlığı göz önüne alındığında, bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı bulunması örneklem sayısının az olmasına bağlanmış ve önemli bir bulgu olarak kabul edilmemiştir.

A. hatchetti'nin 36 °C'de bakterilere yönelik hücre dışı gösterdiği etki incelendiğinde ise *B. pertussis*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'nin canlılığını daha uzun sürdürmesine yönelik olumlu bir etki gözlenmiş olsa da bu etki anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte *H. influenzae* canlılığına, yüksek besin koşullarında önemli düzeyde ve olumlu etki gösterdiği gözlenmiştir ($p = 0,015$). Bu şekilde amip bulunan besleyici bir ortamda *H. influenzae*'nin sayısı azalsa bile canlılığını daha uzun süre koruduğu ortaya konulmuştur.

Hücre içi amip-bakteri etkileşimi deneylerimizde, 6 °C, 25 °C ve 36 °C'de gerek yüksek gerek düşük besin koşullarında, *B. pertussis*, *H. influenzae* ve *S. pneumoniae*'nin *A. hatchetti* ile hücre içi etkileşim göstermediği saptanmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde yapılan araştırmalarda farklı SYA ve bakteri türleri arasındaki hücre dışı ve hücre içi etkileşimin, amip ve/veya bakteri canlılıkları üzerine etki yaptığı gösterilmiştir. Ulaşabildiğimiz literatür bilgilerine göre, bu tez çalışmasında kullanılan bakteri suşlarının amip ile olan hücre dışı ve hücre içi etkileşimine yönelik bir araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu dört bakteri suşu ile amip etkileşimi üzerinden karşılaştırmalı bir tartışma yapılamamış, benzer yöntemsel yaklaşımla amip-bakteri etkileşimine yönelik gerçekleştirilen diğer çalışmalar değerlendirilmiştir.

A. polyphaga'nın farklı bakterisi (*Streptomyces californicus*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas fluorescens*) ve mantar türleri (*Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus versicolor* ve *Penicillium spinulosum*) ile 25 °C'de ve 28 gün boyunca etkileşimi araştırılmış ve amibin bakteri ve mantar türlerinin üremeleri üzerine genellikle olumlu bir etkisinin olduğu ancak *S. californicus*, *B. cereus* ve *S. chartarum* varlığının amip üremesini baskıladığı tespit edilmiştir (Yli-Pirila ve ark., 2006).

A. castellanii ve *A. culbertsoni* ile *A. baumannii* arasındaki etkileşimin araştırıldığı bir çalışmada 27 °C'de 72 saat boyunca düşük besin koşullarında (PAS) her iki amibin, bakteri canlılığı ve üremesini arttırdığı; bakterinin ise *A. castellanii* canlılığı üzerinde bir etki yapmadığı ancak *A. culbertsoni* canlılığını azalttığı bulunmuştur (Cateau ve ark., 2011).

Douesnard-Malo ve Daigle (2011) 30 °C'de gerçekleştirdikleri çalışmada, *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*)'nin kontrol deneyinde 10 güne kadar canlılığını korurken, *A. castellanii* varlığında hücre dışı olarak en az 21 güne kadar yaşadığını, bununla birlikte bakterinin amibin canlılığı üzerinde bir etki yapmadığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, *S. Typhi*'nin amiple hücre içi etkileşime girmedığı tespit edilmiştir.

Lambrecht ve ark. (2013) 7 °C, 25 °C ve 37 °C'de yüksek ve düşük besin koşullarında yaptıkları çalışmada *Y. enterocolitica* suşlarının *A. castellanii* ile hücre dışı ve hücre içi etkileşimini araştırmıştır. Çalışmada hücre dışı etkileşimle amibin

bakteri canlılığını yüksek besin koşullarında 25 °C’de ve düşük besin koşullarında 37 °C’de 14 güne kadar arttırdığı gözlenmiştir. Hücre içi etkileşime yönelik çalışma sonuçları incelendiğinde ise düşük besin koşullarında, her üç sıcaklıkta da bakterinin amip içerisinde canlılığını koruyamadığı ancak, yüksek besin koşullarında 7 °C ve 25 °C’de dört güne kadar amip içerisindeki bakteri sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

B. cereus, *Enterococcus faecalis*, Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve metisilin duyarlı *S. aureus* (MDSA)’un *A. polyphaga* ile hücre dışı etkileşimi araştırılmış ve *L. monocytogenes* ve *S. aureus*’un 37 °C’de 72 saatte canlılığı anlamlı derecede artarken diğer suşların canlılıkları azalmıştır. Bunun yanında hiçbir bakteri suşu amip canlılığına anlamlı derecede etki etmemiştir. *L. monocytogenes* ve *S. aureus* kullanılarak yapılan hücre içi etkileşim çalışmasında ise *S. aureus* hücre içi etkileşim sonucunda canlılığını 24 saatte arttırmış ancak *L. monocytogenes*’in canlılığı kaybolmuştur (Huws ve ark., 2008).

V. cholerae O139 ile *A. castellanii* arasındaki etkileşimin araştırıldığı bir çalışmada ise hücre dışı etkileşimde 30 °C’de bakterinin amip canlılığına 16 gün boyunca bir etkisi olmamış ancak amip varlığı bakteri canlılığı ve üremesi üzerine anlamlı düzeyde olumlu etki yapmıştır. Hücre içi etkileşimde ise bakterinin amip trofozoit yada kisti içerisinde 16 güne kadar canlılığını koruduğu gözlenmiştir (Abd ve ark., 2005).

L. monocytogenes ve *A. castellanii* arasındaki hücre dışı etkileşim deneylerinde, bakterinin aktif olarak amibi öldürmediği fakat amip varlığında yüksek bakteri sayısının en az 96 saat süresince korunduğu anlaşılmıştır. Aynı çalışmanın hücre içi etkileşim deneylerinde ise *L. monocytogenes*’in amip içerisinde 72 saat canlılığını koruduğu ancak çoğalmadığı ortaya konulmuştur (Zhou ve ark., 2007).

Alsam ve ark. (2006), invaziv (K1) ve non-invaziv (K12) *E. coli* suşlarının *A. castellanii* ile olan etkileşimini araştırmıştır. *E. coli* K1, amip ile hücre içi etkileşime

grip 30 °C’de 24 saat canlılığını koruduğu halde, *E. coli* K12 etkileşime girmemiştir. Bu özelliğin, *E. coli* K1’in sahip olduğu dış membran proteini A (OmpA) ve lipopolisakkarit (LPS) yapısından kaynakladığı öne sürülmüştür. Buna benzer diğer bir çalışmada, *E. coli* K1 ve K5 suşlarının amip içerisine girdiği ve 30 °C’de 48 saat canlılığını koruduğu bunun yanında *E. coli* K12’nin etkileşime girmediği ve canlılığını koruyamadığı gösterilmiştir (Matin ve Junk, 2011). Ayrıca K1 suşunun amibin hem trofozoit hem de kist formlarında benzer oranda canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Junk ve ark. (2007) ise *E. coli* K1’in virülansında etkili olan kapsül yapısının amip ile hücre içi etkileşimde önemli olduğunu ve bakterinin canlılığını amip kisti içerisinde de sürdürdüğünü bildirmiştir.

C. jejuni ile *A. castellanii* arasındaki etkileşiminde ise, bakterinin amip içerisine girdiği ancak 25 °C ve 37 °C’de 24 saat içerisinde canlılığını kaybettiği gösterilmiştir. Hücre dışı etkileşim ve amipten salınan faktörlerin bakteri canlılığı üzerine etkisinin 37 °C’de 24 saat içerisinde önemli düzeyde ve olumlu yönde olduğu ve bu etkinin de 96 saat boyunca sürdüğü tespit edilmiştir (Bui ve ark., 2012).

Gram negatif (*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *A. hydrophila* ve *Y. enterocolitica*) ve gram pozitif (*L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. faecalis*) bakteriler ile *A. polyphaga* arasındaki hücre içi etkileşim araştırıldığında; 30 °C’de 72 saat inkübasyon sonucunda bakteri suşlarının amip canlılığına etki etmedikleri gösterilmiştir. Gram pozitif bakterilerden *E. faecalis* ve *S. aureus*’un amip içerisinde 30 °C’de 24 saatte çoğaldığı ve 72 saate kadar canlılığını aynı oranda koruduğu görülmüştür. Gram negatif bakterilerden ise *A. hydrophila* ve *Y. enterocolitica*’nın amip içerisinde 30 °C’de ilk 24 saatte çoğaldığı, sonrasında ise canlılığını kaybettiği tespit edilmiştir (Anacarso ve ark., 2012).

Patojen *Salmonella* suşlarının özellikle *A. rhysodes* başta olmak üzere farklı *Acanthamoeba* spp. suşları ile 37 °C’de 2 saatte hücre içi etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte inkübasyonun 16 saate uzatılmasının, amipte morfolojik değişiklikler ve amip kaybı ile ilişkili olarak ciddi oranda bakteri kaybı ile sonuçlandığı ortaya konulmuştur (Tezcan-Merdol ve ark., 2004).

Hücre içi amip etkileşimi çalışmalarımızda yukarıda örnekleri verilen çalışmalara benzer şekilde klasik gentamisin koruma yöntemi (GKY) tercih edilmiş ve Bölüm 2.4'de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Ancak yukarıda belirtilen bulgulara ulaşılan çalışmaların bazılarında GKY uygulanırken amip-bakteri etkileşimi için gereken inkübasyon öncesi, amip bakteri temasını arttırmak amacıyla plakların düşük hızlarda santrifüj edildiği bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda ise plaklar santrifüj edilmeden inkübasyona bırakılmıştır (Abd ve ark., 2009; Alsam ve ark., 2006; Anacarso ve ark., 2012; Cirillio ve ark., 1997; Junk ve ark., 2007 ve Marin ve Jung, 2011). Hücre içi etkileşim çalışmalarında tercih edilen ve hücre kültür plaklarının kullanıldığı GKY'nin dezavantajlarından bazıları; amibin kültür plağında tek tabaka şeklini alarak analize hazır hale gelmesinin zaman alması, yıkama aşamasında amip sayısında kayıplar olabilmesi ve etkili bir bakteri iç kalite kontrol basamağının yapılamamasıdır. Bu dezavantajları ortadan kaldıracak ve kültür plakları yerine santrifüj tüplerinin kullanıldığı değiştirilmiş bir GKY kullanımının daha etkin sonuçlar ortaya çıkarabileceği öne sürülmüştür (Dirks ve Quinlan 2014). Çalışmamızda elde ettiğimiz hücre içi etkileşimin saptanmaması sonucuna, plakların santrifüj edilmemesinin veya plak yerine tüp kullanılmamasının etki edip etmediği ileride yapılacak çalışmalarda göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu çalışmada ayrıca, *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* canlılığı üzerine etkisi ile *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'dan salınan faktörlerin *A. hatchetti* canlılığına etkisi 6 °C, 25 °C ve 36 °C'de 48 saat süresince gerçekleştirilen inkübasyonlar ile araştırılmıştır.

A. hatchetti'den salınan faktörlerin *B. pertussis*'in canlılığı üzerinde her üç sıcaklıkta da bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Amip salgılarının *H. influenzae* canlılığı üzerinde 36 °C'de, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* canlılığı üzerinde de 25 °C ve 36 °C'de olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'dan salınan faktörlerin *A. hatchetti* canlılığı üzerinde ise herhangi bir etki yapmadığı saptanmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde yapılan araştırmalarda farklı SYA ve bakteri türlerinden hücre dışına salınan faktörlerin amip ve/veya bakteri canlılıkları üzerine etkisi gösterilmiştir. Ulaşabildiğimiz literatür bilgilerine göre, çalışmamızda kullanılan bakteri suşları ile SYA arasında salınan faktörlerin etkisine yönelik bir araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu dört bakteri suşu ile amip etkileşimi üzerinden karşılaştırmalı bir tartışma yapılamamış, benzer yöntemsel yaklaşımla salınan faktörlerin etkisinin araştırıldığı çalışmalar gözden geçirilmiştir.

A. castellanii'den salınan faktörlerin, 7 °C, 25 °C ve 37 °C'de, *Y. enterocolitica*'nın canlılık ve üremesi üzerine bir etki yapmadığı, ancak *Y. enterocolitica*'dan salınan faktörlerin amip canlılığı üzerinde 7 °C'de 3. günde, 25 °C'de 2. günde ve 37 °C'de 3. saatte olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir (Lambrecht ve ark., 2013).

Douesnard-Malo ve Daigle (2011) 30 °C'de gerçekleştirdikleri çalışmada, amipten salınan faktörlerin 14 güne kadar bakteri canlılığını önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada, *Acanthamoeba* salgılarının *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri üzerine 37 °C'de, *E. coli*, *S. aureus*, *C. sakazakii* üremeleri üzerine ise 24 °C'de 4-5 gün süresince arttırıcı etki yaptığı gözlenmiştir (Fieseler ve ark., 2014).

Amip ve bakteriden salınan faktörlerin antimikrobiyal özellik taşıyabileceğinin gösterilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada ise Iqbal ve ark. (2014) *Acinetobacter* sp., *A. hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter* sp., *E. coli* K1, *K. pneumoniae*, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, vankomisin dirençli *E. faecalis* (VRE) ve *E. coli* K1 RS218 (O18:K1:H7) bakteri suşları ile *A. castellanii* suşunu kullanmıştır. *Enterobacter* sp. ve *E. coli* K1 suşlarından salınan faktörlerin amip canlılığını 30 °C'de 48 saat içerisinde anlamlı düzeyde düşürdüğü, *Acanthamoeba*'dan salınan bazı bileşiklerin ise MRSA'ya %100, VRE'ye ise %8 oranında öldürücü etkisi olduğu saptanmıştır.

A. castellanii ve *A. culbertsoni*'den salınan faktörlerin 27 °C'de 48 saat sonunda *A. baumannii* sayısını arttırarak, bakteri canlılığına olumlu etki yaptığı bulunmuştur. (Cateau ve ark., 2011). *A. baumannii* ve *A. castellanii* etkileşimine yönelik diğer bir çalışmada ise, *A. baumannii*'den salınan faktörlerin 37 °C'de ve 24 saatte amip canlılığına toksik etki gösterdiği bulunmuştur (Tamang ve ark., 2011).

A. polyphaga'dan salınan faktörlerin 37 °C'de 48 saat sonunda *L. monocytogenes* ve *S. aureus* canlılığına yaptığı etkinin araştırıldığı çalışmada da, amipten salınan faktörlerin *L. monocytogenes* canlılığını aynı oranda devam ettirdiğini, *S. aureus*'un ise sayısında azalma meydana geldiğini göstermiştir (Huws ve ark., 2008).

Dünya genelinde ve Türkiye'de farklı su çeşitlerinde (kuyu, şebeke, kaplıca, yüzey suyu vb.) başta *Acanthamoeba* olmak üzere fırsatçı patojen SYA'in bulunduğu, yukarıda verilen çalışmalarla açıkça ortaya çıkarılmıştır (Coşkun ve ark., 2013; Çamur ve ark. 2016; Filippo ve ark., 2015; Kuk ve ark., 2013; Magnet ve ark., 2013; Muchesa ve ark., 2015; Tsvetkova ve ark., 2004). Solunum yolu patojenlerinin de farklı su çeşitlerinde bulunduğu ve bu durumun halk sağlığı riski oluşturduğu gösterilmiştir (Feazel ve ark., 2009; Lamoth ve Greub, 2010; Pagnier ve ark., 2008 ve Woodhead, 2002).

Hastane su sistemlerinde SYA ve ilişkili bakterilerin araştırıldığı çalışmaların birinde, örneklerin %7,5'inde SYA ve %45,5'inde en az bir ADB (*Legionella*, *Mycobacterium* ve *Alphaproteobacteria*) tespit edilmiştir (Thomas ve ark., 2006). Bir diğerinde ise su sistemlerinde %43,3 oranında SYA olduğu (*Acanthamoeba* spp. T3 ve T20, *V. vermiformis* ve *Naegleria gruberi*) tespit edilmiştir. Bununla birlikte *Stenotrophomonas maltophilia* başta olmak üzere solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilen nozokomial enfeksiyon etkenlerinin de SYA ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Su sistemindeki bu durumun bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli sağlık riskleri oluşturacağı belirtilmektedir (Muchesa ve ark., 2017).

Su başta olmak üzere çevresel ortamlarda *Acanthamoeba* ve solunum yolu patojenlerinin birlikte bulunması, amip-bakteri etkileşimi sonucu amip ve/veya bakteri lehine kazanımlar nedeni ile halk sağlığı açısından dikkatle değerlendirilmesi gereken sonuçlar doğurmaktadır. Bu durum toplumda hem sudan kaynaklı *Acanthamoeba* hem de bakteri enfeksiyonu gelişme riskini arttırmaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, patojen bakterilerin SYA (özellikle *Acanthamoeba* spp.) ile birlikte buldukları ortamlarda etkileşime girebildiğini göstermiştir. Bunun sonucunda bakteri suşları çevresel ortamlarda daha uzun süreler canlılıklarını sürdürebilmekte, sayılarını arttırabilmekte, yayılabilmekte, virülan özellik kazanabilmekte, antibiyotik ve biyosidal ürünlere direnç geliştirebilmekte ve hatta amip hücrelerini bir antrenman alanı olarak kullanarak, insan vücudundaki fagositoz yoluyla oluşan savunma mekanizmalarından korunabilmektedir. Bunun yanında *Acanthamoeba* spp. suşlarının da bakterilerle etkileşimi sonucunda canlılıklarında ve patojenitelerinde artış ortaya çıkabilmektedir. Bu şekilde her iki yönde de amip-bakteri birlikteliği, ciddi halk sağlığı problemlerine neden olabilecek sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir.

- Çalışmamızda Türkiye’de ilk defa *A. hatchetti* ile hastalardan izole edilen *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* suşlarının farklı sıcaklıklar ve farklı besin koşullarında hücre dışı ve hücre içi etkileşimleri ile hücreden salınan faktörlerin amip ve bakteri canlılığı üzerine etkileri in vitro deneyler ile araştırılmıştır.
- Hücre dışı etkileşim sonuçlarına göre bakteri suşlarının *A. hatchetti*’nin canlılığına etki göstermediği ancak *A. hatchetti*’nin bakteriler üzerinde etki gösterdiği bulunmuştur.
- Tüm sıcaklık ve besin koşulları birlikte değerlendirildiğinde *A. hatchetti*’nin *M. catarrhalis* canlılığını olumsuz, *S. pneumoniae* canlılığını olumlu yönde etkilediği gözlenmiş ancak bu etki istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır. *B. pertussis* canlılığına genel anlamda etki etmediği bulunmuştur.

- Hücre dışı etkileşim çalışmalarında *A. hatchetti*'nin *H. influenzae* canlılığı üzerine yüksek besin koşullarında 36 °C'de olumlu yönde ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkilediği gösterilmiştir.
- *A. hatchetti*'den salınan faktörlerin *H. influenzae* canlılığı üzerinde 36 °C'de, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* üzerinde ise 25 °C ve 36 °C'de olumlu etkisi olduğu görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*'dan salınan faktörlerin ise *A. hatchetti* canlılığına etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak solunum yolu patojenleri olan *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* ile *A. hatchetti*'nin farklı çevresel koşullarda (sıcaklık ve besin) etkileşime girdiği ve çoğunlukla bakteri canlılığı üzerinde olumlu etkiler ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu durumun özellikle su sistemleri gibi çevresel ortamlarda bu bakterilerin bulunma ihtimalini güçlendirerek, toplumsal ve hastane kaynaklı solunum yolu patojenlerinin bulaşmasına yönelik sağlık risklerini arttırabileceği değerlendirilmiştir.

Ancak bu solunum yolu patojenleri ile *Acanthamoeba*'nın benzer veya farklı yöntemsel yaklaşımlarla yapılacak daha fazla çalışma sonucuna göre etkileşim şekilleri ve düzeylerinin gösterilmesi gerekmektedir. Bu şekilde solunum yolu patojenlerinin çevrede *Acanthamoeba* spp. ile nasıl bir ilişki kurduğu ve bu durumun halk sağlığı açısından anlamlı düzeyde risk oluşturup oluşturmadığı gösterilebilecektir.

ÖZET

Solunum Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan Bakterilerin *Acanthamoeba hatchetti* ile Etkileşiminin Araştırılması

Bu çalışmanın amacı toplumda sıklıkla karşılaşılan solunum yolu patojenlerinden *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordatella pertussis* ve *Haemophilus influenzae* ile *A. hatchetti* arasındaki amip-bakteri etkileşimini tespit etmektir. Çalışmamızda Türkiye’de ilk defa hücre dışı ve hücre içi etkileşim ile hücreden salınan faktörlerin amip ve bakteri canlılığı üzerine etkisi, farklı sıcaklık ve besin koşullarında in vitro olarak gerçekleştirilmiştir. Böylece çevresel ortamlardan, özellikle şebeke, havuzlar, kaplıca gibi su kaynaklarından amip varlığında canlı kalabilen, üreyebilen ve çevre koşullarına dayanabilen solunum yolu patojenlerinin yayılma potansiyeli ortaya konabilecektir.

Çalışmada *A. hatchetti* (2HH suşu) ile hastalardan izole edilen *B. pertussis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* suşları kullanılmıştır. Hücre dışı amip-bakteri etkileşimi, 7 gün boyunca 6 °C, 25 °C ve 36 °C’de sıcaklıklarda, düşük ve yüksek besin koşullarında ko-kültürler yapılarak araştırılmıştır. Hücre içi etkileşim ise 48 saat boyunca hücre dışı amip-bakteri etkileşimi ile aynı sıcaklık ve besin koşullarında gerçekleştirilen ko-kültür çalışmaları ile gözlenmiştir. *A. hatchetti*’den salınan faktörlerinin bakteri suşları üzerine ve *S. pneumoniae* ile *M. catarrhalis*’den salınan faktörlerin *A. hatchetti* üzerine etkisi de 48 saat boyunca 6 °C, 25 °C ve 36 °C’de incelenmiştir.

Hücre dışı etkileşim sonuçlarına göre tüm sıcaklık ve besin koşulları birlikte değerlendirildiğinde *A. hatchetti*’nin *M. catarrhalis* canlılığını olumsuz, *S. pneumoniae* canlılığını olumlu yönde etkilediği gözlenmiş ancak bu etki istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). *B. pertussis* canlılığına genel anlamda etki etmediği bulunmuştur. *A. hatchetti*’nin *H. influenzae* canlılık süresini 36 °C’deki yüksek besin koşullarında önemli düzeyde arttırdığı bulunmuştur ($p = 0,015$). Hücre içi amip-bakteri etkileşimi çalışmamızda ise *B. pertussis*, *H. İnfluenzae* ve *S. pneumoniae* suşlarının *A. hatchetti* ile hücre içi etkileşime girmediği tespit edilmiştir.

A. hatchetti’den salınan faktörlerin *H. influenzae* canlılığı üzerinde 36 °C’de, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* üzerinde ise 25 °C ve 36 °C’de olumlu etkisi olduğu görülmüş ancak bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae*’dan salınan faktörlerin ise *A. hatchetti* canlılığına etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak solunum yolu patojenleri olan *B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. pneumoniae* ile *A. hatchetti*’nin farklı sıcaklık ve besin koşullarında etkileşime girdiği ve çoğunlukla bakteri canlılığı üzerinde olumlu etkiler ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu durumun özellikle su sistemleri başta olmak üzere çevresel ortamlarda bakterilerin bulunması ve üremesi ihtimalini arttırdığı dolayısıyla toplumsal ve hastane kaynaklı solunum yolu patojenlerinin bulaşması ve yayılmasına yönelik sağlık risklerine neden olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Acanthamoeba*, *Bordatella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*.

SUMMARY

Investigation of Interaction between Bacteria That Cause Respiratory Tract Infections and *Acanthamoeba hatchetti*

The purpose of this study was to detect the interaction between *A. hatchetti* and the respiratory tract pathogens, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordatella pertussis* and *Haemophilus influenzae*, which can be seen frequently in the community. In our study, the effects of intracellular and extracellular interactions and cell-released compounds of amoebae and bacteria on the viability of these cells were investigated in vitro under different temperature and nutrition conditions for the first time in Turkey. We aimed to show the potential for spreading of the respiratory tract pathogens which can survive, proliferate and withstand environmental conditions by the existence of free living amoeba in the environments like water supplies, swimming pools and spa.

We used *A. hatchetti* (2HH strain) and *B. pertussis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* strains which were previously isolated from patients. Extracellular amoeba and bacteria interactions were investigated in co-culture experiments both in low and high nutrition conditions, at 6 °C, 25 °C and 36 °C for seven days. Intracellular amoeba and bacteria interactions were investigated by co-culture experiments at similar temperatures and nutrition conditions for 48 hours. Effects of cell-released compounds from *A. hatchetti* to bacteria and from *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* to *A. hatchetti* were investigated at 6 °C, 25 °C and 36 °C for 48 hours.

According to the findings of extracellular interaction experiments, *A. hatchetti* had a positive impact on the viability duration of *S. pneumoniae*, on the contrary it had a negative impact on the viability of *M. catarrhalis* when the temperature and the nutrition conditions were considered together. These results were not considered statistically significant ($p > 0,05$). It was observed that *A. hatchetti* had no impact on the viability of *B. pertussis*. However, at 36 °C and in high nutrition conditions, *A. hatchetti* increased the viability of *H. influenzae* at a statistically significant level ($p = 0,015$). According to the results of intracellular interaction tests, it was observed that *B. pertussis*, *H. Influenzae* and *S. pneumoniae* did not interact with *A. hatchetti*.

The cell-released compounds of *A. hatchetti* had a positive effect on the viability of *H. influenzae* at 36 °C while a positive effect was seen at 25 °C and 36 °C for the viability of *M. catarrhalis* and *S. pneumoniae*.

As a result, we found that, the respiratory tract pathogens -*B. pertussis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* and *S. pneumoniae*- interact with *A. hatchetti* under different temperatures and nutrition conditions and this interaction mostly reveals positive effect on the viability of bacteria. These interactions will increase the possibility of bacteria existence and proliferation in environments like domestic water systems, and therefore poses a health risk factor in respect to spreading and infecting potential of community and hospital acquired respiratory tract pathogens.

Keywords: *Acanthamoeba*, *Bordatella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*.

KAYNAKLAR

- ABD H, WEINTRAUB A, SANDSTROM G (2005). Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ Microbiol* **7**: 1003-1008.
- ABD H, SAEED A, WEINTRAUB A, SANDSTRÖM G (2009). *Vibrio cholerae* O139 requires neither capsule nor LPS O side chain to grow inside *Acanthamoeba castellanii*. *J Med Microbiol* **58**: 125-131.
- ABEDKHOJASTEH H, NIYYATI M, RAHIMI F, HEIDARI M, FARNIA S, REZAEIAN M (2013). First Report of Hartmannella keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iran J Parasitol* **8(3)**: 481-485.
- ADELEKE A, PRUCKLER J, BENSON R, ROWBOTHAM T, HALABLAB M, FIELDS B (1996). Legionella-like amebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **2**: 225-230.
- ADEKAMBI T, GAUBERT MR, GREUB G, GEVAUDAN MJ, SCOLA BL, RAOULT D, DRANCOURT M (2004). Amoebal Coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the Sputum of a Patient with Hemoptoic Pneumonia. *J Clin Microbiol* **42**: 5493-5501.
- AGHAJANI A, DABIRZADEH M, YAHYA MAROUFI Y, HOOSHYAR H (2016). Identification of *Acanthamoeba* Genotypes in Pools and Stagnant Water in Ponds in Sistan Region in Southeast Iran. *Türkiye Parazit Derg* **40**: 132-136.
- AKBAŞ E, ABACIOĞLU H, ÖTGÜN SN (2014a). *Streptococcus pneumoniae* invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı (B-MT-05). Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Cilt 1. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı.
- AKBAŞ E, ABACIOĞLU H, ÖTGÜN SN (2014b). *Haemophilus influenzae* invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı (B-MT-04). Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Cilt 1. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı.
- AKBAŞ E, ABACIOĞLU H, ÖTGÜN SN (2014c). Boğmaca'nın (*Bordetella sp* enfeksiyonunun) mikrobiyolojik tanısı (B-MT-01). Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Cilt 1. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı.
- AKISU Ç, TUĞLU İ, BAKA M, DURAK İ, ORHAN V (1999). *Acanthamoeba* keratitli bir olgu. Işık ve elektron mikroskoplu bulguları. *T Parazit Derg* **23**: 340-342.
- AKSOZEK A, MCCLELLANB K, HOWARD C K, NIEDERKORNC YJ, ALIZADEH H (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* **88**: 621-623.
- AKYA A, POINTON A, THOMAS C (2010). *Listeria monocytogenes* does not survive ingestion by *Acanthamoeba polyphaga*. *Microbiology* **156**: 809-818.
- AKYOL N, AŞCI Z, KUKNER S (1996). *Acanthamoeba* keratitis: The first reported case from Turkey. *Ophthalmic Practice: Asia Ed.* **2**: 46-48.

- AL-HERRAWY Z, MOHAMED SH, ALI M, MOHAMMED AH, GAD MA (2014). Distribution of Naegleria in Water Resources in Egypt. *Egyptian Journal of Environmental Research*, **2**: 1-14.
- ALSAM S, JEONG SR, SISSONS J, DUDLEY R, KIM KS, KHAN NA (2006). *Escherichia coli* interactions with Acanthamoeba: a symbiosis with environmental and clinical implications. *J Med Microbiol* **55**: 689-694.
- AMIRTHALINGAM G, CAMPBELL H, CRAIG L, FRY N, HARRISON T, MILLER L, RAMSAY M (2012). Guidelines for the Public Health Management of Pertussis, HPA. Erişim adresi: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/323098/HPA_Guidelines_for_the_Public_Health_Management_of_Pertussis_2012_PB65.01- Oct 2012.pdf]. Erişim tarihi: 14/12/2016.
- ANACARSO I, NIEDERHÄUSERN S, MESSI P, GUERRIERI E, ISEPPI R, SABIA C, BONDI M (2012). *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. *J Basic Microbiol* **52**: 261-268.
- ANAND CM, SKINNER AR, MALIC A, KURTZ JB (1983). Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg* **91**: 167-178.
- ARNALICH-MONTIEL F, LUMBRERAS-FERNÁNDEZ B, MARTÍN-NAVARRO CM, VALLADARES B, LOPEZ-VELEZ R, MORCİLLO-LAÍZ R, JACOB LORENZO-MORALES J (2014). Influence of Acanthamoeba genotype on clinical course and outcomes for patients with Acanthamoeba keratitis in Spain. *J Clin Microbiol* **52**: 1213-1216.
- ASHBOLT NJ (2015a). Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems. *Curr Envir Health Rpt* **2**: 95-106.
- ASHBOLT NJ (2015b). Environmental (Saprozoic) Pathogens of Engineered Water Systems: Understanding Their Ecology for Risk Assessment and Management. *Pathogens* **4**: 390-405.
- ATAŞ M (2012). Çeşitli su örnekleri ve su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* türlerinde *Francisella tularensis* araştırılması. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi.
- BAQUERO RA, REYES-BATLLE M, NICOLA GG, MARTÍN-NAVARRO CM, LOPEZ-ARENCEBIA A, ESTEBAN JG, VALLADARES B, MARTÍNEZ-CARRETERO E, PINERO JE, MORALES JL (2014). Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. *Pathog Glob Health* **108(4)**: 206-211.
- BARRE J, SABBE K, HUWS S, VERCAUTEREN D, BRAECKMANS K, VAN GREMBERGHE I, FAVOREEL H, HOUF K (2010). "Influence of temperature, oxygen and bacterial strain identity on the association of *Campylobacter jejuni* with *Acanthamoeba castellanii*", *FEMS Microbiol Ecol* **74**: 371-381.
- BARETE S, COMBES A, DE JONCKHEERE JF, DATRY A, VARNOUS S, MARTINEZ V, PTACEK SG, CAUMES E, CAPRON F, FRANCÈS C, GIBERT C, CHOSIDOW O (2007). Fatal disseminated Acanthamoeba lenticulata infection in a heart transplant patient. *Emerg Infect Dis* **13**: 736-738.
- BERK SG, TING RS, TURNER GW, R. J. ASHBURN RJ (1998). Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**: 279-286.
- BARKER J, BROWN MRW (1994). Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**: 1253-1259.

- BARKER JP, LAMBERT A, BROWN MR (1993). Influence of intraamoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **61**: 3503–3510.
- BASTIDAS O. Cell Counting with Neubauer Chamber Basic Hemocytometer Usage. Technical Note-Neubauer Cell Counting. Erişim adresi: [<http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>] Erişim tarihi: 13/12/2016.
- BERNHARDA S, SPANIOL V, AEBI C (2012). Molecular pathogenesis of infections caused by *Moraxella catarrhalis* in children. *Swiss Med Wkly* **142**: 1-9.
- BERTELLI C, GREUB G (2012). Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 110.
- BOOTON GC, VISVESVARA GS, BYERS TJ, KELLY DJ, FUERST PA (2005). Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* **43**: 1689-1693.
- BOZUE JA, JOHNSON W (1996). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**: 668-673.
- BRIERE EC, WANG X (2015). *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib): Chapter 2. Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases, 6th Ed. ROUSH SW, BALDY RM.
- BRUGGEMANN H, CAZALET C, BUCHRIESER C (2006). Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol* **9**: 86-94.
- BUI XT, WINDING A, QVORTRUP K, WOLFF A, BANG DD, CREUZENET C (2012). Survival of *Campylobacter jejuni* in co-culture with *Acanthamoeba castellanii*: role of amoeba-mediated depletion of dissolved oxygen. *Environ Microbiol* **14**: 2034-2047.
- CASTILLO D, HARCOURT B, HATCHER C, JACKSON M, KATZ L, MAIR R, MAYER L, NOVAK L, RAHALISON L, SHCMINK S, THEODORE MJ, THOMAS J, VUONG J, WANG X (2011). Chapter 9. Identification and Characterization of *Haemophilus influenzae*. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae*. 2nd Ed. WHO Manual.
- CATEAU E, VERDON J, FERNANDEZ B, HECHARD Y, RODIER MH (2011). *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* **319**: 19-25.
- CEYHAN M, GURLER N, OZSUREKCI Y, KESER M, AYGAN AE, GURBUZ V, SALMAN N, CAMCIOGLU Y, DINLEYICI EC, OZKAN S, SENSOY G, BELET N, ALHAN E, HACIMUSTAFAOGLU M, CELEBI S, UZUN H, FAIK ONER A, KURUGOL Z, ALI TAS M, AYGUN D, KARADAG ONCEL E, CELIK M, YASA O, AKIN F, COŞKUN Y (2014). Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* Type B and *Streptococcus pneumoniae* during 2005-2012 in Turkey. A multicenter prospective surveillance study. *Hum Vaccin Immunother* **10**: 2706-2712.
- CHANDRASEKAR PH, NANDI PS, FAIRFAX MR, CRANE LR (1997). Cutaneous infections due to *Acanthamoeba* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* **157**: 569-72.
- CHAPPELL CL, WRIGHT JA, COLETTA M, NEWSOME AL (2001). Standardized Method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 724-730.

- CIRILLO JD, FALKOW S, TOMPKINS LS (1994). Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* **62**: 3254-3261.
- CIRILLO JD, FALKOW S, TOMPKINS LS, BERMUDEZ LE (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* **65**: 3759-3767.
- CIRILLO JD, CIRILLO SL, YAN L, BERMUDEZ LE, FALKOW S, TOMPKINS LS (1999). "Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*." *Infect Immun* **67**: 4427-434.
- CORSARO D, VENDITTI D (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res* **107**: 233-238.
- CORSARO D, VENDITTI D (2011). More *Acanthamoeba* genotypes: Limits to use rDNA fragments to describe new genotype. *Acta Protozool* **50**: 51-56.
- COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- COŞKUN KA, OZÇELİK S, TUTAR L, ELALDI N, TUTAR Y (2013). Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed Res Int* doi: 10.1155/2013/675145.
- Counting Chamber (Hemocytometer). Marienfeld-Superior Laboratory glassware information manual (2010). Erişim adresi: [<http://www.marienfeld-superior.com/index.php/manuals.html>]. Erişim tarihi: 16/12/2016.
- CAMUR D, DEGERLI S, VAIZOGLU SA, YAVUZ CI, ILTER H, GULER C (2016). Important Emerging Public Health Problem in Thermal Springs: Amoeba. A Preliminary Study From Turkey. *J Environ Prot Ecol* **17**: 469-476.
- DENONCOURT AM, PAQUET VE, CHARETTE SJ (2014). Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front Microbiol* **5**: 240.
- DIRKS BP (2012). Development of a modified gentamicin protection assay to investigate interactions between *Campylobacter jejuni* and *Acanthamoeba castellanii*. The Department of Biology at Drexel University. The Degree of Doctor of Philosophy.
- DIRKS BP, QUINLAN JJ (2014). Development of a modified gentamicin protection assay to investigate the interaction between *Campylobacter jejuni* and *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010. *Exp Parasitol* **140**: 39-43.
- DOĞAN S, YAZAR S, KUK S (2013): Toprakta serbest yaşayan ve insanda parazitlenebilen bazı amiplerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. *Sağlık Bilimleri Dergisi* **23**: 187-191.
- DOUESNARD-MALO F, DAIGLE F (2011). Increased persistence of *Salmonella enterica* Serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7640-7646.
- DOYSCHER D, FIESELER L, DONS L, LOESSNER MJ, SCHUPPLER M (2013). *Acanthamoeba* feature a unique backpacking strategy to trap and feed on *Listeria monocytogenes* and other motile bacteria. *Environ Microbiol* **15**: 433-446.
- DROZANSKI W (1956). Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol Pol* **5**: 315-317.

- EDWARDS KJ, SCHWINGEL JM, DATTA AK, CAMPAGNARI AA (2005). Multiplex PCR assay that identifies the major lipooligosaccharide serotype expressed by *Moraxella catarrhalis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **43**: 6139-6143.
- ENGELKIRK PG, DUBEN-ENGELKIRK JL (2008). Genus *Moraxella*. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases-Essentials of Diagnostic Microbiology, Lippincott. p.: 285.
- ERCI E, ABAY E; AKARSU GA, KARAHAN ZC (2013). Investigation of free-living Amoebae and respiratory bacterial pathogens in water samples taken from recreational fountains and ornamental pools in Ankara, Turkey. *HealthMed* **7**: 1158-1167.
- ERDEM E, EVCIL Y, YAGMUR M, EROGLU F, KOLTAS S, ERSOZ R (2014). Non-contact lens use-related *Acanthamoeba* keratitis in southern Turkey: evaluation of risk factors and clinical features. *Eur J Ophthalmol* **24**: 164-72.
- EROĞLU F, EVYAPAN G, KOLTAŞ İS, EVCİL Y, ERDEM E, TANIR F, YAĞMUR M, ERSÖZ R (2011). Çeşme suyu *Acanthamoeba* keratiti etkeni midir? 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi Kitabı s.: 109.
- ERTABAKLAR H, DAYANIR V, APAYDIN P, ERTUĞ S, WALOCHNIK J (2009). Olgu Sunumu: *Acanthamoeba* Keratiti. *Türkiye Parazitol Derg* **33**: 283-285.
- ERTABAKLAR H, TÜRK M, DAYANIR V, ERTUĞ S, WALOCHNIK J (2007). *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res* **100**: 241-246.
- EVSTIGNEEVA A, RAOULT D, KARPACHEVSKIY L, SCOLA BL (2009). Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **155**: 657-664.
- FAULKNER A, SKOFF T, MARTIN S, CASSIDAY P, TONDELLA ML, LIANG J (2015). Pertussis: Chapter 10. Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases, 6th Ed. ROUSH SW, BALDY RM.
- FEAZEL LM, BAUMGARTNER LK, PETERSON KL, FRANK DN, HARRIS JK, PACE NR (2009). Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci* **106**: 16393-16399.
- FIESELER L, DOYSCHER D, LOESSNER MJ, SCHUPPLER M (2014). *Acanthamoeba* release compounds which promote growth of *Listeria monocytogenes* and other bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 3091-3097.
- FILIPPO MMD, SANTORO M, LOVREGLIO P, CAPOLONGO RMC, CALIA C, FUMAROLA L, D'ALFONSO R, BERRILLI F, CAVE DD (2015). Isolation and Molecular Characterization of Free-Living Amoebae from Different Water Sources in Italy. *Int J Environ Res Public Health* **12**: 3417-3427.
- FRANK M, COLLIN PM, PEAK IR, GRICE ID, WILSON JC (2015). An unusual carbohydrate conformation is evident in *Moraxella catarrhalis* oligosaccharides. *Molecules* **20**: 14234-14253.
- FREI M. Cell Viability and Proliferation. Sigma Aldrich Bio Files **6(5)**: 17-21. Erişim adresi: [<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.htm#trypan-blue>] Erişim tarihi: 01/12/2016.
- FRITSCH TR, GAUTOM RK, SEYEDIRASHTI S, BERGERON DL, LINDQUIST TD (1993). Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* **31**: 1122-1126.

- FRITSCH TR, SOBEK D, GAUTOM RK (1998). Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp: following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 231-236.
- GAST RJ (2001). Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol* **48**: 609-615.
- GEDİKOĞLU S (2002). Pasteurella, Francisella, Bordetella. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, TOPÇU AW, SÖYLETİR G, DOĞANAY M. Cilt 2: 1658-1666.
- GOERS L, FREEMONT P, POLIZZI KM (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface*. **11**: doi: 10.1098/rsif.2014.0065.
- GONZALEZ MM, GOULD E, DICKINSON G, MARTINEZ AJ, VISVESVARA GS, CLEARY TJ, HENSLEY GT (1986). Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Arch Pathol Lab Med* **110**: 749-51.
- GREUB G, RAOULT D (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413-433.
- GREUB G, SCOLA BL, RAOULT D (2003). *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba polyphaga* depending on the incubation temperature. *Ann N Y Acad Sci* **990**: 628-634.
- GREUB G, SCOLA BL, RAOULT D (2004). Amoebae-resisting bacteria isolated from human nasal swabs by amoebal coculture. *Emerg Infect Dis* **10**: 470-477.
- GUILLOT S, GUISO N (2014). Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/ *Bordetella parapertussis*. Immunisation, Vaccine and Biologicals. WHO/IVB/ 14.03.
- GUIMARAES AJ, GOMES KX, CORTINES JR, PERALTA JM, PERALTA RH (2016). *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res* **193**: 30-38.
- HALLSTRÖM T, NORDSTRÖM T, TAN TT, MANOLOV T, LAMBRIS JD, ISENMAN DE, ZIPFEL PF, BLOM AM, RIESBECK K (2011). Immune evasion of *Moraxella catarrhalis* involves ubiquitous surface protein A-dependent C3d binding. *J Immunol* **186**: 3120-3129.
- HAMBORSKY J, KROGER A, WOLFE C (2015a). Pneumococcal Diseases. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Chapter 17, The Pink Book: Course Textbook-13th Ed. Erişim adresi: [<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pneumo.html>] Erişim tarihi: 16/12/2016.
- HAMBORSKY J, KROGER A, WOLFE C (2015b). *Haemophilus influenzae*. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Chapter 8, The Pink Book: Course Textbook - 13th Ed. Erişim adresi: [<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html>] Erişim tarihi: 16/12/2016.
- HAMBORSKY J, KROGER A, WOLFE C (2015c). Pertussis. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Chapter 16, The Pink Book: Course Textbook - 13th Ed. Erişim adresi: [<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pert.html>] Erişim tarihi: 16/12/2016.
- HARB OS, GAO LY, ABU KWAİK Y (2000). From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* **2**: 251-265.

- HEWETT MK, ROBINSON BS, MONIS PT, SAINT CP (2003). Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer-Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool* **42**: 325-329.
- HOFFMANN R, MICHEL R (2001). Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int J Hyg Environ Health* **203**: 215-219.
- HORN M, FRITSCHER TR, GAUTOM RK, SCHLEIFER KH, WAGNER M (1999). Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol* **1**: 357-367.
- HUWS SA, MORLEY RJ, JONES MV, BROWN MRW, SMITH AW (2008). Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. *FEMS Microbiol Lett* **282**: 258-265.
- IQBAL J, SIDDIQUI R, KHAN NA (2014). *Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart. *Parasit Vectors* **7**: doi: 10.1186/1756-3305-7-56.
- JACQUIER N, AEBY S, LIENARD J, GREUB G (2013). Discovery of New Intracellular Pathogens by Amoebal Coculture and Amoebal Enrichment Approaches. *J Vis Exp* **80**: 1-7.
- JAGER BV, STAMM WP (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet*. **2**: 1343-1345.
- JUNG SY, MATIN A, KIM KS, KHAN NA (2007). The capsule plays an important role in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Int J Parasitol* **37**: 417-423.
- KHAN NA (2006). *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 564-595.
- KHAN NA, SIDDIQUI R (2014). Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. *Parasitology* **141**: 869-874.
- KILIC A, TANYUKSEL M, SISSONS J, JAYASEKERA S, KHAN NA (2004). "Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2,T3,T4,T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitologica* **49**: 246-252.
- KILVINGTON S, PRICE J (1990). Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* **68**: 519-25.
- KING CH, SHOTTS EB, WOOLEY RE, PORTER KG (1988). Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol*. **54**: 3023-3033.
- KOUBAR M, RODIER MH, GARDUNO RA, FRERE J (2011). Passage through *Tetrahymena tropicalis* enhances the resistance to stress and the infectivity of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* **325**: 10-15.
- KRISHNA-PRASAD BN, GUPTA SK (1978). Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr Sci* **47**: 245-247.
- KUK S, YAZAR S, DOĞAN S, ÇETİNKAYA Ü, SAKALAR Ç (2013). Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water. *Turk J Med Sci* **43**: 12-17.

- LA SCOLA B, RAOULT D (2001). Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect* **7**: 75-79.
- LA SCOLA B, MEZI L, WEILLER PJ, RAOULT D (2001). Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *J Clin Microbiol* **39**: 365-366.
- LAMBRECHT E, BARÉ J, VAN DAMME I, BERT W, SABBE K, HOUF K (2013). Behavior of *Yersinia enterocolitica* in the presence of the bacterivorous *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 6407-6413.
- LASKOWSKI-ARCE MA, ORTH K (2008). *Acanthamoeba castellanii* promotes the survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7183-7188.
- LASS A, SVOSTAKOWSKA I, CHOMICZ L (2014). The first genotype determination of *Acanthamoeba* potential threat to human health, isolated from natural water reservoirs in Poland. *Parasitol Res* **113**: 2693-2699.
- LEMONT F, GREUB G (2010). Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 260-280.
- LORENZO-MORALES J, KHAN NA, WALOCHNIK J (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, **22**: doi: 10.1051/parasite/2015010
- LY TMC, MULLER HE (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol* **33**: 51-54.
- MAGNET A, FENOY S, GALVÁN AL, IZQUIERDO F, RUEDA C, FERNANDEZ VADILLO C, DEL AGUILA C (2013). A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res* **47**: 6966-6972.
- MANDELL LA, WUNDERINK RG, ANZUETO A, BARTLETT JG, CAMPBELL GD, DEAN NC, DOWELL SF, FILE TM, MUSER DM, NIEDERMAN MS, TORRES A, WHITNEY CG (2007). Infectious diseases society of America/American Thoracic Society consensus Guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* **44**: 27-72.
- MARCIANO-CABRAL F, CABRAL G (2003). *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol Rev* **16**: 273-307.
- MARRIE TJ, RAOULT D, LA SCOLA B, BIRTLES RJ, CAROLIS E (2001). Legionella-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerg Infect Dis* **7**: 1026-1029.
- MARTINEZ AJ, VISVESVARA GS (1997) Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* **7**: 583-598.
- MATIN A, JUNG SY (2011). Interaction of *Escherichia coli* K1 and K5 with *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Korean J Parasitol* **49**: 349-356.
- MATTOO S, CHERRY JD (2005). Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**: 326-382.
- MATZ C, KJELLEBREG S (2005). Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* **13**: 302-307.

- MAZUR T, HADAŚ E, IWANICKA I (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* **46**: 106-108.
- MCCUDDIN ZP, CARLSON SA, RASMUSSEN MA, FRANKLIN SK (2006). Klebsiella to Salmonella gene transfer within rumen protozoa: implications for antibiotic resistance and rumen defaunation. *Vet Microbiol* **114**: 275-284.
- MICHEL, R, BURGHARDT H, BERGMANN H (1995). *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **196**: 532-544.
- MILTNER EC, BERMUDEZ LE (2000). *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1990-1994.
- MOLINER C, FOURNIER PE, RAOULT D (2010). Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 281-294.
- MOLMERET M, HORN M, WAGNER M, SANTIC M, ABU KWAİK Y (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**: 20-28.
- MORAES J, ALFIERI SC (2008). Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 221-229.
- MUCHESA P, BERNARD TG, BARTIE C (2015). The prevalence of free-living amoebae in a South African hospital water distribution system. *S Afr J Sci* **111**: 1-3.
- MUCHESA P, LEIFELS M, JURZIK L, HOORZOOK KB, BARNARD TG, BARTIE C (2017). Coexistence of free-living amoebae and bacteria in selected South African hospital water distribution systems. *Parasitol Res* **116**: 155-165.
- MURPHY TF, PARAMESWARAN GI (2009). *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis* **49**: 124-131.
- NAGINTON J, WATSON PG, PLAYFAIR TJ, MCGILL J, JONES BR, STEELE AD (1974). Amoebic infection of the eye. *Lancet* **2**: 1537-1540.
- NIYYATI M, RAHIMI F, LASEJERDI Z, REZAEIAN M (2014). Potentially pathogenic free-living amoebae in contact lenses of the asymptomatic contact lens wearers. *Iranian J Parasitol* **9**: 14-19.
- OBRITSCH MD, FISH DN, MACLAREN R, JUNG R (2005). Nosocomial infections due to multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* **25**: 1354-1364.
- OHNO A, KATO N, SAKAMOTO R, KIMURA S, YAMAGUCHI K (2008). Temperature-Dependent Parasitic Relationship between *Legionella pneumophila* and a Free-Living Amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Appl Environ Microbiol* **74**: 4585-4588
- ÖDEK Ç, ÖZDEMİR H, TAPISIZ A, ÇİFTÇİ E, DOĞU F, GÜRİZ H, İNCE E, DOĞRU Ü (2010). *Haemophilus influenzae* tip b Aşılması Yapılan İki Çocukta İnvaziv *Haemophilus influenzae* Enfeksiyonları. *Çocuk Enf Derg* **4**: 76-78.
- ÖZÇELİK S, COŞKUN KA, YÜNLÜ O, ALİM A, MALATYALI E (2012). Sivas ilinde potansiyel patojen serbest yaşayan amip türlerinin musluk sularında ve çevresel su kaynaklarında yaygınlığı, izolasyonu ve morfolojik karakterizasyonu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi* **36**: 198-203.

- ÖZEROL IH, ASGIN N, KALCIOGLU MT (2002). Üst solunum yolu enfeksiyonlarında *Moraxella catarrhalis*'in önemi. *Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* **9**: 25-27.
- ÖZKOC S, TUNCAY S, DELİBAS SB, AKİSU C, OZBEK Z, DURAK I, WALOCHNIK J (2008). Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. *J Med Microbiol* **57**: 392-396.
- PAGNIER I, RAOULT D, LA SCOLA B (2008). Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ Microbiol* **10**: 1135-1144.
- PANDA A, KHALIL S, MIRDHA BR, SINGH Y, KAUSHIK S (2015). Prevalence of *Naegleria fowleri* in Environmental Samples from Northern Part of India. *PLoS ONE*, **10**: doi: 10.1371/journal.pone.0137736.
- PATERSON GN, RITTIG M, SIDDIQUI R, KHAN NA (2011). Is *Acanthamoeba* pathogenicity associated with intracellular bacteria? *Exp Parasitol* **129**: 207-210.
- PILISHVILI T, NOGGLE B, MOORE MR (2012). Pneumococcal disease. Chapter 11. Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases, 6th Ed. ROUSH SW, BALDY RM.
- PROCA-CIOBANU M, LUPASCU GH, PETROVICI A, IONESCU MD (1975). Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellani* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol* **5**: 49-56.
- QVARNSTROM Y, NERAD TA, VISVESVARA GS (2013). Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol* **60**: 626-633.
- RAHMAN M, ABD H, ROMLING U, SANDSTROM G, MÖLLBY R (2008). *Aeromonas-Acanthamoeba* interaction and early shift to a viable but nonculturable state of *Aeromonas* by *Acanthamoeba*. *J Appl Microbiol* **104**: 1449-1457.
- RYAN KJ (2004a). Streptococci and Enterococci. Chapter 17, Sherry's Medical Microbiology, an Introduction of Infectious Diseases, 4th Ed. RYAN KJ, RAY CG.
- RYAN KJ (2004b). Haemophilus and Bordetella. Chapter 24. Sherry's Medical Microbiology, an Introduction of Infectious Diseases, 4th Ed. RYAN KJ, RAY CG.
- RICHTER SS, HEILMANN KP, DOHRN CL, RIAHI F, DIEKEMA DJ, DOERN GV (2013). Pneumococcal Serotypes before and after Introduction of Conjugate Vaccines, United States, 1999-2011. *Emerg Infect Dis* **19**: 1074-1083.
- ROWBOTHAM TJ (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179-1183.
- ROWBOTHAM TJ (1986). Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* **22**: 678-689.
- RUOHOLA A, MEURMAN O, NIKKARI S, SKOTTMAN T, SALMI A, WARIS M, OSTERBACK R, EEROLA E, ALLANDER T, NĪESTERS H, HEIKKĪNEN T, RUUSKANEN O (2006). Microbiology of Acute Otitis Media in Children with Tympanostomy Tubes: Prevalences of Bacteria and Viruses. *Clin Infect Dis* **43**: 1417-1422.

- SANDSTRÖM G, SAEED A, ABD H (2011). Acanthamoeba-Bacteria: A Model to Study Host Interaction with Human Pathogens. *Curr Drug Targets* **12**: 936-941.
- SAYGI G, POLAT Z (2003). Özgür Yaşayan Amipler ve Neden Oldukları Parazitler (Primer Amibik Meningoensefalit-Granümatöz Amibik Ensefalit-Keratif). *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* **25**: 140-149.
- SCHUSTER FL (2002). Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clin Microbiol Rev* **15**: 342-354.
- SCHUSTER FL, VISVESVARA GS (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* **34**: 1001-1027.
- SEAL DV (2003). Acanthamoeba keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye (Lond)*, **17**: 893-905.
- SIDDIQUI R, KHAN NA (2012a). War of the microbial worlds: Who is the beneficiary in Acanthamoeba-bacterial interactions? *Exp Parasitol* **130**: 311-313.
- SIDDIQUI R, KHAN NA (2012b). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors*. **5**: 6. Published online doi: 10.1186/1756-3305-5-6.
- SIMMONS PA, TOMLINSON A, SEAL DV (1998). The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. *Optom Visual Sci* **75**: 860-866.
- SINGER M (2010). Pathogen-pathogen interaction: A syndemic model of complex biosocial processes in disease. *Virulence*, **1**: 10-18.
- SMIRNOV AV, CHAO E, NASSONOVA ES, CAVALIER-SMITH TA (2011) A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist* 2011, **162**: 545-570.
- SNELLING WJ, MCKENNA KP, LECKY DM, DOOLEY JSG (2005). Survival of *Campylobacter jejuni* in Waterborne Protozoa. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5560-5571.
- STEINERT M, BIRKNESS K, WHITE E, FIELDS B, QUINN F (1998). Mycobacterium avium Bacilli Grow Saprozoically in Coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and Survive within Cyst Walls. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2256-2261.
- STOTHARD DR, SCHROEDER-DIEDRICH JM, AWWAD MH, GAST RJ, LEDEE DR, RODRÍGUEZ-ZARAGOZA S, DEAN CL, FUERST PA, BYERS TJ (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbio* **45**: 45-54.
- ŞENOL G, ERİŞ FN (2000). Akciğer Enfeksiyonlarında *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve *Streptococcus pneumoniae* Suşlarının izolasyon Oranları ve Antibiyotiklere Direnci. *Toraks Dergisi*, **1**: 46-49.
- TAMANG MD, KIM S, KIM SM, KONG HH, KIM J (2011). Interaction of *Acinetobacter baumannii* 19606 and 1656-2 with *Acanthamoeba castellanii*. *J Microbiol* **49**: 841-846.
- TEZCAN-MERDOL D, LJUNGSTROˆM M, WINIECKA-KRUSNELL J, EWERT LINDER E, ENGSTRAND L, MIKAEL RHEN M (2004). Uptake and Replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhodes*. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 3706-3714.

- THOM S, WARHURST D, DRASAR BS (1992). Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol* **36**: 303-306.
- THOMAS V, HERRERA-RIMANN K, BLANC DS, GREUB G (2006). Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2428-2438.
- THOMAS JM, ASHBOLT NJ (2011). Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ Sci Technol* **45**: 860-869.
- THOMAS V, MCDONNELL G, DENYER SP, MAILLARD JY (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 231-259.
- TILLER PM (2014): *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis* Chapter 40, Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th Ed.
- TORNO MS, BABAPOUR R, GUREVITCH A, WITT MD (2000). Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J Am Acad Dermatol* **42**: 351-354.
- TRABELSI H, DENDANA F, SELLAMI A, SELLAMI H, CHEIKHROUHOU F, NEJI S, MAKNI F, AYADI A (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* **60**: 399-405.
- Trypan Blue Exclusion Protocol. [<http://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/trypan-blue-exclusion.html>] Erişim tarihi: 01/12/2016.
- TS EN 1276 (2010). Kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler- Gıda, sanayi, ev ve kurumsal alanlarda kullanılan kimyasal dezenfektanlar ve antiseptiklerin bakterisit aktiviteilerinin değerlendirilmesi için nicel süspansiyon deneyi - Deney yöntemi ve özellikler (safa 2, adım 1).
- TSVETKOVA N, SCHILD M, PANAIOTOV S, KURDOVA-MINTCHEVA R, GOTTSTEIN B, WALOCHNIK J, ASPOCK H, LUCAS MS, MULLER N (2004). The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* **92**: 405-413.
- TUNG MC, HSU BM, TAO CW, LIN WC, TSAI HF, Ji DD, SHEN SM, CHEN JS, SHIH FC, HUANG YL (2013). Identification and Significance of *Naegleria fowleri* Isolated from the Hot Spring Which Related to the First Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM) Patient in Taiwan. *Int J Parasitol* **43**: 691-696.
- VAEREWIJCK MJM, BAR'E J, LAMBRECHT E, SABBE K, HOUF K (2014). Interactions of Foodborne Pathogens with Free-living Protozoa: Potential Consequences for Food Safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **13**: 924-944.
- VERDUIN CM, HOL C, FLEER A, DIJK H, BELKUM A (2002). *Moraxella catarrhalis*: from Emerging to Established Pathogen. *Clin Microbiol Rev* **15**: 125-144.
- VERANI JR, LORICK SA, YODER JS, BEACH MJ, BRADEN CR, ROBERTS JM, CONOVER CS, CHEN S, MCCONNELL KA, CHANG DC, PARK BJ, JONES DB, VISVESVARA GS, ROY SL (2009). National outbreak of *Acanthamoeba keratitis* associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg Infect Dis* **15**: 1236-1242.
- VISVESVARA GS, MOURA H, SCHUSTER FL (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**: 1-26.

- VISVESVARA GS, SCHUSTER FL (2008). Opportunistic Free-living Amebae, Part 1. *Clin Microbiol Newsl* **30**: 151-158.
- WALOCHNIK J, HALLER-SCHOBER EM, KOLLI H, PICHER O, OBWALLER A, ASPÖCK H (2000a). Discrimination between Clinically Relevant and Nonrelevant Acanthamoeba Strains Isolated from Contact Lens-Wearing Keratitis Patients in Austria. *J Clin Microbiol* **38**: 3932-3936.
- WALOCHNIK J, OBWALLER A, ASPÖCK H (2000b). Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4408-4413.
- WALOCHNIKA J, UTE SCHEIKLA U, HALLER-SCHOBER EM (2015). Twenty Years of Acanthamoeba Diagnostics in Austria. *J Eukaryot Microbiol.* **62**: 3–11
- WANG X, AHEARN DG (1997). Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr Microbiol* **34**: 212-215.
- WANG W, WEI F, LI J, LI N, LIU Q (2014). Isolation and identification of Naegleria species from environmental water in Changchun, Northeastern China. *Iranian J Parasitol* **9**: 254-259.
- WATKINS RR, LEMONOVICH TL (2011). Diagnosis and management of community-acquired pneumonia in adults. *Am Fam Physician* **83**: 1299-1306.
- WERNO AM, MURDOCH DR (2008). Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis* **46**: 926-932.
- WINIECKA-KRUSNELL J, LINDER E (2001). Bacterial infections of freeliving amoebae. *Res Microbiol* **152**: 613-619.
- WINIECKA-KRUSNELL J, WREIBER K., VON EULER A, ENGSTRAND L, LINDER E. (2002). Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis* **34**: 253-256.
- WOODHEAD M (2002). Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur Respir J* **20**: 20-27.
- YAZAR S, KUK S, DOĞAN S, ÇETİNKAYA Ü (2011). Kayseri kuyu sularında serbest yaşayan amiplerin izolasyonu ve genotiplendirilmesi. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi Kitabı, s.: 194-195.
- YLI-PIRILÄ T, KUSNETSOV J, HIRVONEN MR, SEURI M, NEVALAINEN A (2006). Effects of amoebae on the growth of microbes isolated from moisture-damaged buildings. *Can J Microbiol* **52**: 383-90.
- ZEE A, SCHELLEKENS JF, MOOI FR (2015). Laboratory diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev.* **28**: 1005-1026.
- ZEYBEK Z, ÜSTÜNTÜRK M, BİNAY AR (2010). Morphological Characteristics and Growth Abilities of Free Living Amoeba Isolated From Domestic Tap Water Samples in İstanbul. *IUFS J Biol* **69**: 17-23.
- ZHOU X, ELMOSE J, CALL DR (2007). Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). *Environ Microbiol* **9**: 913-922.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Umut

Soyadı: BERBEROĞLU

Doğum yeri ve tarihi: K.K.T.C 24/01/1978

Uyruğu: T.C ve K.K.T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Yapıldı

İletişim adresi ve telefonu: Sancak Mah. 524 Sok. Ufuk Sit. B blok 15/10
Çankaya/ANKARA

II. Eğitim-Ünvanlar

Tarih	Eğitim Kurumu	Alınan Ünvan
1994-1999	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü, İstanbul	Tıbbi Biyolog
2000-2004	R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara	Mikrobiyoloji ve Kl. Mikrobiyoloji Uzmanı
2009-Devam	Ankara Üni. Tıp Fak. Mik. ve Kl. Mik. Anabilim Dalı, Parazitoloji Bilim Dalı	Doktor (PhD)

III. Mesleki Deneyim

Tarih	Kurum	Laboratuvar	Unvanı/Görevi
30/08/2000-25/01/2004	R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara	Uzmanlık Eğitimi,	Asistan
26/01/2004-13/07/2005	R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara	Seroloji Laboratuvarı	Mikrobiyoloji Uzmanı
14/07/2005-20/06/2008	R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Çevre Sağlığı Araştırma Müdürlüğü, Ankara	Çevre Mik. Analiz Lab.	Mikrobiyoloji Uzmanı

21/06/2008-18/03/2012	R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Tüketici Ürün Güvenliği ve Sağlığa Etkileri Araştırma Laboratuvarları, Ankara	- Çevre Mik. Analiz Lab. - Su Mik. Analiz Lab.	Mikrobiyoloji Uzmanı/Lab Sorumlusu
19/03/2012-13/12/2013	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Tüketici Güvenliği Laboratuvarları Daire Başkanlığı	- Su Mikrobiyoloji Lab. - Tüketici Ürünleri Mikrobiyoloji Lab. - Biyosidal Ürünler Mik. Etkinlik Test Lab	Mikrobiyoloji Uzmanı/ Merkez Tüketici Ürünleri Mikrobiyolojik Araştırma Laboratuvarları Sorumlusu
28/02/2014-01/04/2016	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı	- Yüksek Riskli Patojenler Merkez Referans Laboratuvarı	Mikrobiyoloji Uzmanı
04/04/2016-Devam	Ankara Halk Sağlığı Müdürlüğü-	- Ankara Halk Sağlığı Laboratuvarı	Mikrobiyoloji Uzmanı/Laboratuvar Sorumlusu

IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Tarih	Dernek, Komisyon, Kurul Adı	Görev
2004-Devam	Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (TMC)	Üye
2009-Devam	Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD)	Üye

V. Bilimsel İlgi Alanları

- Uzmanlık tezi. Antalya, Diyarbakır ve Samsun illerinde Q Humması. Umut BERBEROĞLU, R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ocak 2005, Ankara.
- **Berberoğlu U.** Gözalan A, Kılıç S, Kurtoğlu D, Esen B. Antalya, Diyarbakır ve Samsun illerinde *Coxiella burnetti* seroprevalans çalışması, Mikrobiol Bül 2004, 38:385-391
- **Berberoğlu U.** Gözalan A, Kılıç S, Kurtoğlu D, Esen B. Seçilmiş üç ilde Q Hummasının seroepidemiolojik araştırması, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 19-23 Eylül 2004, Kuşadası/AYDIN
- **Berberoğlu U.** Kurtoğlu D, Esen B. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'na 2000-2005 yıllarında gelen kaplıca ve yüzme havuzu suyu örneklerinde bakteriyolojik analiz sonuçları. III. Türk Belediyecilik Sempozyumu. 26-27 Nisan 2006, Keçiören/ANKARA

- Bulaşıcı Hastalıkların Kontrolü ve Sürveyansı Sistemi Kapsamında Spesifik Mikrobiyoloji Pratiği, Laboratuvar Eğitim Programı Rehberi, Mikrobiyolojik Su Kalitesi Prosedürleri. Haziran 2009, RSHMB.
- Spesifik Su Mikrobiyolojisi Uygulamalı Eğitim Programı Kitapçığı. 2011, R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara.
- Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları El Kitabı. 2013, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
- Sule Senses Ergül, Havva Sarı, Sevinç Ertaş, **Umut Berberoğlu**, Yıldırım Cesaretli, Hasan İrmak. Tüketime Sunulan Hazır Yemek Ürünlerinin Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma
- **Umut Berberoğlu**, Çiğdem Güngör. Yüzey Suyu ve Sulama Amaçlı Atık Sularda Helmint Yumurta ve Protozoa Kistlerinin Araştırılması. Poster sunumu, 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül-4Ekim 2013, Denizli.
- **Berberoğlu U.** Güngör C. Yüzey suyu ve sulama amaçlı atık sularda fekal kirlilik düzeyleri ile helmint yumurta ve protozoa kistlerinin araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg: 2013; 70(4): 191 – 200
- **Berberoğlu U.** Termal Sularla Bulaşan Bakteriler ve Legionella. Bölüm 18: 209-220. Termal Turizm, 1. Basım Haziran 2015.

VI. Bilimsel Etkinlikler

- ‘Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi TR 0503.13’. ‘Spesifik Mikrobiyoloji Pratiği Laboratuvar Eğitim Programı-2008’in ‘Halk Sağlığı Laboratuvarları Modülü. 15-19 Aralık 2008, Ankara
- Spesifik Mikrobiyoloji Pratiği Laboratuvar Eğitimi- Su ve Gıda Kaynaklı Hastalıkların Kontrolünde laboratuvarların Rolü Eğitimi. 01-05 Haziran 2009, R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara
- Spesifik Mikrobiyoloji Pratiği Laboratuvar Eğitimi- Su ve Gıda Kaynaklı Hastalıkların Kontrolünde laboratuvarların Rolü Eğitimi.08-12 Haziran 2009, R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı,Ankara
- Spesifik Mikrobiyoloji Pratiği Laboratuvar Eğitimi- Su ve Gıda Kaynaklı Hastalıkların Kontrolünde laboratuvarların Rolü Eğitimi.15-19 Haziran 2009, R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara
- Kurum içi “Temel Laboratuvar Güvenliği Uyum Eğitimi”, Kasım 2009-Nisan 2010, RSHMB
- Spesifik Su Mikrobiyolojisi Uygulamalı Eğitim Programı. 31 Ekim-4 Kasım 2011, R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara.
- Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Eğitim Programı. 1-5 Ekim 2012, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Eğitim Programı. 5-9 Kasım 2012, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Eğitim Programı. 14-18 Ocak 2013, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Eğitim Programı. 11-15 Şubat 2013, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Eğitim Programı. 18-22 Şubat 2013, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Peloid Mikrobiyolojisi Uygulamaları Eğitim Programı. 24-26 Nisan 2013. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.

- Su Mikrobiyolojisi Uygulamalı Modül Eğitimi. 09-13 Aralık 2013. Samsun Halk Sağlığı Laboratuvarı, Samsun
- Su Mikrobiyolojisi Uygulamalı Modül Eğitimi. 03-07 Mart 2014. Ankara Halk Sağlığı Laboratuvarı, Ankara
- Su Mikrobiyolojisi Uygulamalı Modül Eğitimi. 24-28 Mart 2014. Erzurum Halk Sağlığı Laboratuvarı, Erzurum
- Su Mikrobiyolojisi Uygulamalı Modül Eğitimi. 05-09 Mayıs 2014. Antalya Halk Sağlığı Laboratuvarı, Antalya
- “Su kalitesi ve Analiz Yöntemleri” oturumunda “Sularda Mikrobiyolojik Analizler ve Kalite Kontrolü” konusunda konuşmacı, Sağlıklı Su Yönetimi Kongresi, 20-22 Mayıs 2015, ERZURUM
- Uygulamalı Su Mikrobiyolojisi Eğitimi (Bir günlük). Ulusal Su ve Sağlık Kongresi, 26-30 Ekim 2015, ANTALYA

VII. Diğer Bilgiler

- Lejyoner Hastalığının Surveyansında Laboratuvarların Rolü ve Legionella Türlerinin Çevresel Örneklerde Araştırılması, Workshop Eğitim Programı, T.C. Sağlık Bakanlığı R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 17-21 Mart 2003
- AB Meda Programı ‘Türkiye’de Kalite Altyapısının Desteklenmesi Projesi’ kapsamında Uzmanlık Merkezi tarafından yapılan ‘Mikrobiyolojik Metot Validasyonu’ konulu teknik eğitim. T.C. Sağlık Bakanlığı R.S. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 12-15 Aralık 2005.
- AB Meda Programı ‘Türkiye’de Kalite Altyapısının Desteklenmesi Projesi’ kapsamında Uzmanlık Merkezi tarafından Ankara Sanayi Odasında yapılan ‘ISO 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartlar’ eğitimi. 03-05 Temmuz 2006.
- Avrupa Birliği Temel Eğitim Kursu. Avrupa Toplulukları Araştırma ve Uygulama Merkezi. 08.10.2005-10.01.2006
- Avrupa Birliği Uzmanlık Kursu. Avrupa Toplulukları Araştırma ve Uygulama Merkezi. 14.03.2006-15.06.2006.
- TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Ankara Şubesi tarafından Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığında verilen ‘TS-EN-ISO/IEC 17025:2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Akreditasyonu Bilinçlendirme’ eğitimi. 24 Ağustos 2006
- Tıbbi Atıkların Kontrolü Yönetmeliği’nin 52. maddesi gereğince Ankara valiliği İl Çevre ve Orman Müdürlüğünce düzenlenen ‘Yerel eğitim Programı. 02-03 Nisan 2007
- Halk Sağlığının korunmasına yönelik su alanındaki, Mevzuatın Uyumlaştırılması ve uygulanmasında Sağlık Bakanlığının Güçlendirilmesi Projesi (TR/2004/IB/EN/04) kapsamında yapılan ‘I. Yüzme Suları Eğitimi’. Antalya, 16-20 Nisan 2007
- Halk Sağlığının korunmasına yönelik su alanındaki, Mevzuatın Uyumlaştırılması ve uygulanmasında Sağlık Bakanlığının Güçlendirilmesi Projesi (TR/2004/IB/EN/04) kapsamında yapılan ‘Yüzme Suları, Doğal Mineralli Sular ve İçme Suları için Numune Alım ve Analiz Yöntemleri Eğitimi’. Antalya, 11-15 Haziran 2007
- Toplam Kalite Yönetimi ve ISO 9001:2000 Bilinçlendirme Eğitimi. 18-20 Haziran 2007.
- Halk Sağlığının korunmasına yönelik su alanındaki, Mevzuatın Uyumlaştırılması ve uygulanmasında Sağlık Bakanlığının Güçlendirilmesi Projesi (TR/2004/IB/EN/04) kapsamında yapılan ‘II. Yüzme Suları, Doğal Mineralli Sular İçme Suları için Numune Alım ve Analiz Yöntemleri Eğitimi’. Antalya, 22-26 Ekim 2007
- Halk Sağlığının korunmasına yönelik su alanındaki, Mevzuatın Uyumlaştırılması ve uygulanmasında Sağlık Bakanlığının Güçlendirilmesi Projesi (TR/2004/IB/EN/04) kapsamında yapılan ‘I. İçme Suları Eğitimi’. 6-7 Aralık 2007, Ankara

- ‘Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi. Temel Laboratuvar Yönetimi eğitimi. 3-5 Mart 2008, Ankara
- Proje Süreç Yönetimi Eğitimi. 14-18 Nisan 2008.
- Fekal ve Çevresel Örneklerde Giardia ve Cryptosporidium’un Spesifik Moleküler Yöntemlerle Araştırılması Çalıştayı. 28-30 Mayıs 2008 ERZURUM
- “Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi-Faz II” Spesifik Mikrobiyoloji Pratiği-Laboratuvar Eğitim Programı-2008 Parazitoloji Modülü. 16-20 Haziran 2008
- Laboratuvar biyogüvenliği, Güvenli Mikrobiyolojik Teknikler (SMT) Eğitici Eğitimi. The Centre of Bioscience and Diagnostics, Leiden Highschool, 29 Ağustos 2008, Hollanda
- “Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi”, Yetişkin Eğitim Programı. 02-04 Şubat 2009, Ankara
- TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gıda Enstitüsü, Mikrobiyolojik Metotlarda Validasyon ve Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması eğitimi. 21-22 Mayıs 2009, Ankara
- Laboratuvar Güvenliği Temel Uyum Eğitimi. Kasım 2009-Şubat 2010. RSHMB-ANKARA
- ‘Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Laboratuvar Değerlendirme Aracı (LAT) Eğitimi. 27-29 Haziran 2011, Ankara
- Biorisk Yönetimi Uygulamalı Eğitimi. 16-18 Kasım 2011, RSHMB-ANKARA
- Halk Sağlığı Laboratuvarları Eğitici Eğitimi. 27-31 Mayıs 2013, THSK-ANKARA
- Halk Sağlığı Laboratuvarları Eğitici Eğitimi. 24-26 Haziran 2013, THSK-ANKARA
- Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi-Faz III-Biyogüvenlik Pilot Eğitimi” 29-31 Ocak 2014 THSK-ANKARA
- Enfeksiyöz maddelerin taşınması, uluslar arası taşıma düzenlemelerine dayalı göndericiler için eğitim kursu. Dünya Sağlık Örgütü. 11 Şubat 2014, Ankara
- Biorisk yönetimi gelişmiş eğitim kursu. Dünya Sağlık Örgütü, 12-14 Şubat 2014, Ankara
- Dış Kalite Değerlendirme Örneklerinin Hazırlanması Uygulamalı Laboratuvar Eğitimi, 01-04 Nisan 2014 THSK-ANKARA
- Biyolojik savaş ajanlarının sahada tanımlanması kursu (pratik ve teorik). ABD, Askeri Enfeksiyöz Hastalıkların Tıbbi Araştırma Enstitüsü (USAMRIID). 29 Eylül-24 Ekim 2014, Maryland/ABD