



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı**

**FARKLI SU KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN
ACANTHAMOEBA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER PREVALANSI VE
GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Burcu CENİKLİOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı**

**FARKLI SU KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN
ACANTHAMOEBA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
PREVALANSI VE GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Burcu CENİKLİOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Burcu CENİKLİOĞLU

İmza:



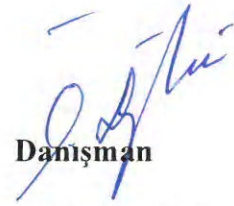
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Farklı Su Kaynaklarından İzole Edilen *Acanthamoeba* Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Genotiplerinin Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



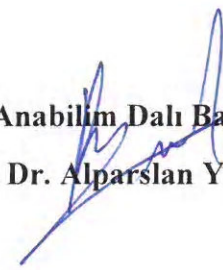
Tezi Hazırlayan

Burcu CENİKLİOĞLU



Danışman

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ danışmanlığında **Burcu CENİKLİOĞLU** tarafından hazırlanan “**Farklı Su Kaynaklarından İzole Edilen *Acanthamoeba* Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Genotiplerinin Belirlenmesi**” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

06/12/2019

JÜRİ:**İmza**

Danışman: Doç. Dr. Önder DÜZLÜ (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun)

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Arif ÇİLOĞLU (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

....../....../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**Enstitü Müdürü**

TEŞEKKÜR

Başta, tez konumun belirlenmesinden sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında bana destek olan danışman hocam Doç. Dr. Önder DÜZLÜ'ye çok teşekkür ederim. Çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım Prof. Dr. Abdullah İNCİ, Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM, Dr. Öğr. Üyesi Zuhal ÖNDER, Dr. Öğr. Üyesi Arif ÇİLOĞLU ve Araş. Gör. Gamze YETİŞMİŞ'e, pozitif kontrol DNA'sı temininde yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğretim elemanı Araş. Gör. Mehmet AYKUR ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim elemanı Araş. Gör. Dr. Miray ONAN'a teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarımın her aşamasında birçok fedakarlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

Burcu CENİKLİOĞLU

Kayseri, Aralık 2019

**FARKLI SU KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *ACANTHAMOEBA*
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER PREVALANSI VE GENOTİPLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2019
Danışman: Doç. Dr. Önder DÜZLÜ**

ÖZET

Bu çalışma, Sinop ve Ordu yörelerindeki çeşitli su kaynaklarından izole edilmiş *Acanthamoeba* türlerinin moleküler prevalansının belirlenmesi ve 18S rRNA gen bölgesi yönünden moleküler karakterlerinin ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. Çalışmada Sinop'un Merkez ve Gerze ilçeleriyle Ordu'nun Fatsa ve Kumru ilçelerindeki çeşme suyu, havuz suları, kaplıca ve göllerden toplanmış toplam 80 örnek steril kaplar içerisine alınarak uygun koşullarda laboratuvara intikal ettirilmiştir. Sahadan toplanan su örneklerinin kültür ortamında üretilmesi için besi yeri hazırlanmış ve katı besiyerinde üreme gözlenen bölgelerden agar kesilerek çözünmesi beklenmiştir. Çözündükten sonra santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı atılarak dipteki kısım DNA izolasyonu amacıyla kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunu takiben izolatların moleküler karakterlerinin ortaya konulması için 18S rRNA gen bölgesinin yaklaşık 450 bp'lik kısmını amplifiye eden primerlerle PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. 18S rRNA gen bölgesi yönünden PCR analizlerinde pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan izolatlardan seçilmiş ampikonlar ilgili gen bölgelerinin kayıpsız sekansının elde edilebilmesi amacıyla klonlanmış ve plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidler vektör spesifik primerlerle sekans analizine tabii tutulmuş ve hedef gen bölgesi dizilimleri elde edilmiştir. Sekans kromotogramları De Novo Assemble üzerinden işlenerek izolatlara ait konsensüs sekanslar elde edilmiştir. İlgili sekanslar GenBank veri tabanında Blastn analizlerine tabii tutularak moleküler identifikasyonları sağlanmış ve filogenetik analizler için elde edilen izolatlara ait sekansla birlikte Türkiye'den ve Dünyanın farklı ülkelerinden GenBank veri tabanına kaydedilmiş izolatları içeren ve toplam 31 sekanstan oluşan 18S rRNA data seti oluşturulmuştur. Data set içerisinde haplotip çeşitliliği, inter ve intra spesifik nükleotid farklılıkları DNAsp ve Mega 7 üzerinden Kimura Two Parameter modeli ile analiz edilmiştir.

Filogenetik ağaç oluşturulmasında maximum likelihood (ML) analizleri 1000 tekrarlı bootstrap kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, Sinop yöresinden toplanan 35 örneğin 6'sında (%17,1), Ordu yöresinden toplanan 45 örneğin ise 9'unda (%20) *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Her iki bölgeden toplanan su örneklerinde toplam pozitiflik %18,8 (15/80) olarak belirlenmiştir. Filogenetik analizlerde Sinop ve Ordu yörelerinden toplanmış su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* izolatlarının Türkiye'den ve dünyadan bildirilen T4 genotipine ait izolatlarla aynı kümede yer aldıkları belirlenmiştir. Pozitif izolatlar arasında TRERUAcantha1 (Sinop) ve TRERUAcantha2 (Ordu) olmak üzere 2 haplotip tespit edilmiş ve ortalama haplotip diversitesi $0,682 \pm 0,084$ olarak belirlenmiştir. 18S rRNA data set içerisinde TRERUAcantha1 ve TRERUAcantha2 izolatlarının da yer aldığı T4 genotipi içerisindeki tüm izolatların %100 identik oldukları belirlenmiştir. Genotip bazında gruplama yapıldığında ise T4 genotipindeki izolatlarla T5, T15, T13, T2, T3, T9, T11 ve T12 genotipleri arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla $0,051 \pm 0,015$, $0,029 \pm 0,011$, $0,012 \pm 0,007$, $0,033 \pm 0,012$, $0,020 \pm 0,009$, $0,034 \pm 0,013$, $0,020 \pm 0,009$ ve $0,047 \pm 0,015$ olarak tespit edilmiştir. 18S rRNA data setinin ML analizlerinde T4 genotipindeki izolatların monofiletik yapılanma gösterdiği saptanmıştır. Çalışmada elde edilen iki izolatın da yer aldığı T4 genotipindeki izolatların en yakın benzerliği %99,9 ile T13 genotipinde bulunan ve Almanya'da kontakt lensten izole edilen KaBo (KJ476522) izolatıyla gösterdiği görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmayla Sinop ve Ordu yörelerindeki farklı su kaynaklarından izole edilen *Acanthamoeba* türlerinin 18S rRNA gen bölgesi yönünden moleküler karakterleri ortaya çıkarılmış, Türkiye'den ve Dünyadan benzer izolatlarla filogenetik yakınlıkları belirlenmiş, Türkiye'nin biyolojik varlıkları olarak Genbank kayıtları gerçekleştirilmiş (MN648628-29) ve 18S rRNA gen bölgesinin *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesinde etkin bir gen bölgesi olduğu teyit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 18S rRNA, *Acanthamoeba*, genotiplendirme, moleküler prevalans, Ordu, Sinop, su

**MOLECULAR PREVALANCE AND GENOTYPING OF *ACANTHAMOEBA*
SPECIES ISOLATED FROM DIFFERENT WATER SUPPLIES**

**Erciyes University, Graduate School of Health Science,
Department of Veterinary Parasitology,
Master Thesis, December 2019
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Onder DUZLU**

ABSTRACT

This study was conducted to determine the molecular prevalence of *Acanthamoeba* species isolated from various water sources in Sinop and Ordu regions and to determine their molecular characteristics for the 18S rRNA gene region. In this study, a total of 80 samples collected from fountain water, pool water, hot springs and lakes in the Central and Gerze districts of Sinop, and Fatsa and Kumru districts of Ordu provinces were transferred to the laboratory under appropriate conditions. The broth was prepared to produce water samples collected from the field in culture medium and the agar was dissected from the regions where growth was observed in solid medium. After thawing, the supernatant of the centrifuged samples was discarded, and the bottom was used for DNA isolation. Following DNA extraction, PCR analysis was performed with primers amplifying approximately 450 bp of the 18S rRNA gene region to determine the molecular characters of the isolates. Positive amplicons determined with analysis for 18S rRNA gene region were cloned, and plasmid purification was performed to obtain the complete sequence of the relevant gene regions. The plasmids were subjected to sequence analysis with vector-specific primers and the target gene region sequences were obtained. Sequence chromatograms were processed via De Novo Assemble to obtain consensus sequences for the isolates. The related sequences were subjected to Blastn analysis in the GenBank database to detect their molecular identifications, and the data sets containing a total of 31 sequences obtained in this study and available in Genbank recorded from Turkey and different countries were created. Haplotype diversity, inter and intra-specific nucleotide differences in the data set were analyzed using DNAsp and Mega 7 with the Kimura Two Parameter model. Maximum likelihood (ML) analysis in phylogenetic tree creation was performed using 1000 replicated bootstrap. *Acanthamoeba* positivity was detected in 6 (17.1%) of 35 samples collected from Sinop region and 9 (20%) of 45 samples collected from Ordu region. Total positivity of water samples collected from both regions was determined as 18.8%

(15/80). In the phylogenetic analyses, *Acanthamoeba* isolates obtained from the water samples collected from Sinop and Ordu regions were determined to belong in the same cluster with the isolates in T4 genotype reported from Turkey and the world. Among the positive isolates, 2 haplotypes were identified as TRERUAcantha1 (Sinop) and TRERUAcantha2 (Ordu), and the mean haplotype diversity was found as 0.682 ± 0.084 . In the 18S rRNA data set, all isolates in the T4 genotype including TRERUAcantha1 and TRERUAcantha2 isolates were determined as 100% identical. When genotype-based grouping is performed, nucleotide differences between isolates of T4 genotype and the other T5, T15, T13, T2, T3, T9, T11, T12 genotypes were detected as $0.051\% \pm 0.015$, $0.029\% \pm 0.011$, $0.012\% \pm 0.007$, $0.033\% \pm 0.012$, $0.020\% \pm 0.009$, $0.034\% \pm 0.013$, $0.020\% \pm 0.009$, $0.047\% \pm 0.015$, respectively. In ML analysis of 18S rRNA data set, it was determined that isolates of T4 genotype exhibited monophyletic structure. The closest similarity of the isolates in the T4 genotype, including the two isolates obtained in the study, was determined as 99.9% identity with KaBo (KJ476522) isolate obtained from the contact lens in Germany and clustered in T13 genotype.

In conclusion, molecular characteristics of *Acanthamoeba* species isolated from different water supplies in Sinop and Ordu regions for 18S rRNA gene region were revealed, phylogenetic relationships were determined with the similar isolates from Turkey and the world, Genbank records (MN648628-29) were performed as biological organisms in Turkey, and 18S rRNA gene was confirmed as valuable genetic marker in DNA barcoding for *Acanthamoeba* species with this study.

Keywords: 18S rRNA, *Acanthamoeba*, genotyping, molecular prevalence, Ordu, Sinop, water

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xiv
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>ACANTHAMOEBA</i> TÜRLERİNİN TARİHÇESİ.....	4
2.2. TAKSONOMİ.....	5
2.3. MORFOLOJİ VE YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	9
2.4. BESLENME FİZYOLOJİSİ	12
2.5. İZOLASYON YÖNTEMLERİ	13
2.5.1. Gram negatif bakteri ile kaplanmış besleyici değeri olmayan agar pleytlerini kullanarak <i>Acanthamoeba</i> izolasyonu	13
2.5.2. <i>Acanthamoeba</i> türlerinin aksenik kültivasyonu.....	14
2.5.3. Kistlenme yöntemleri	14
2.5.4. <i>Acanthamoeba</i> türlerinin depolanması.....	15

2.6. <i>ACANTHAMOEBA</i> TÜRLERİNİN İNSANLARDA NEDEN OLDUĞU ENFEKSİYONLAR.....	15
2.6.1. <i>Acanthamoeba</i> keratiti (kontakt lensten korneaya).....	16
2.6.1.1. Epidemiyoloji	17
2.6.1.2. Klinik semptomlar	18
2.6.1.3. Klinik tanı.....	18
2.6.1.4. Konak duyarlılığı.....	19
2.6.1.5. Risk faktörleri.....	19
2.6.1.6. Tedavi	20
2.6.2. Granülatöz Amibik Ensefalit (GAE).....	21
2.6.2.1. Epidemiyoloji	22
2.6.2.2. Klinik semptomlar	23
2.6.2.3. Klinik Tanı	23
2.6.2.4. Konak duyarlılığı.....	24
2.6.2.5. Risk Faktörleri.....	25
2.6.2.6. Tedavi	26
2.7. <i>ACANTHAMOEBA</i> TÜRLERİ VE BAKTERİ ETKİLEŞİMLERİ	26
2.7.1. Bakteriyel predatör olarak <i>Acanthamoeba</i> spp.	27
2.7.2. Bakteriyel rezervuar olarak <i>Acanthamoeba</i> spp.	27
2.7.3. Bakteriyel truva atı olarak <i>Acanthamoeba</i> spp.	28
2.8. <i>ACANTHAMOEBA</i> TÜRLERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ	28
2.8.1. İzoenzim analizi ve mitokondriyal DNA RFLP	28
2.8.2. Küçük alt ünite ribosomal RNA kodlama DNA-RFLP (Riboprinting)	29

2.8.3. 18S rRNA dizi analizi	30
2.8.4. Mitokondriyal 16S rRNA dizi analizi	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI	32
3.1.1. Araştırma Sahası ve Su Örneklerinin Toplanması.....	32
3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI.....	33
3.2.1. Örnekler İçin Besi Yeri hazırlanması ve Kültür İşlemi.....	33
3.2.2. Genomik DNA izolasyonu	34
3.2.3. Genotiplendirme ve Filogenetik Analizler İçin 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Elektroforezi	35
3.2.4. 18S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid İzolasyonu.....	36
3.2.4.1. Ligasyon basamağı	36
3.2.4.2. Transformasyon Basamağı.....	38
3.2.4.3. Koloni Screening PCR.....	39
3.2.4.4. PCR Tarama ile Transformasyonu Doğrulanmış Kolonilerin Sıvı Besi Yerinde Çoğaltımı	40
3.2.4.5. Rekombinant Plazmidlerin Saflaştırılması.....	40
3.2.4.6. Restriksiyon Enzim ve PCR Analizleri.....	41
3.2.5. Sekans ve Filogenetik Analizler	42
4. BULGULAR	43
4.1. 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyon Sonuçları.....	43
4.2. 18S Gen Bölgesinin Klonlama Sonuçları	44
4.3. 18S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analizleri	46

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
---------------------------	----

6. KAYNAKLAR.....	63
-------------------	----

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



KISALTMALAR ve SİMGELER

GAE	: Granülomatöz amibik ensefalit
RNA	: Ribonucleic acid
RFLP	: Restriksiyon fragment length polymorphism
DNA	: Deoxyribonucleic acid
PYG	: Peptone yeast extract glucose broth
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
PCR	: Polymerase chain reaction
PHMB	: Polyhexamethylene biguanide
CHX	: Chlorhexidine
MSS	: Merkezi sinir sistemi
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
CSF	: Cerebrospinal sıvı
Mt-SSU	: Mitochondrial small subunit
NNA	: Non-nutrient agar
ML	: Maximum likelihood
K2P	: Kimura two-parameter
AIC	: Akaike information criterion
BLAST	: Basic local alignment search tool
DnaSP	: DNA sequence polymorphism

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Kistlerin morfolojik özelliklerine göre <i>Acanthamoeba</i> türleri.....	7
Tablo 2.2. <i>Acanthamoeba</i> genotipleri ve insanlarda neden olduğu hastalıklar	8
Tablo 4.1. İncelenen su örneklerinde <i>Acanthamoeba</i> prevalansı	43
Tablo 4.2. Sinop ve Ordu yörelerinden toplanmış su örneklerinde belirlenen <i>Acanthamoeba</i> izolatlarının gen bölgesi, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları.....	46
Tablo 4.3. Dünyadan ve Türkiye’den filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı <i>Acanthamoeba</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	48
Tablo 4.4. Çoklu hizalamaları yapılan <i>Acanthamoeba</i> pozitif izolatlar ve Dünyadan ve Türkiye’den diğer bazı <i>Acanthamoeba</i> izolatlarının nükleotid kompozisyonları.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>Acanthamoeba</i> türlerinin yaşam formları.....	10
Şekil 2.2. <i>Acanthamoeba</i> türlerinin yaşam döngüsü	11
Şekil 3.1. Araştırma sahaları	32
Şekil 3.2. Su örneklerinin alınması.....	33
Şekil 3.3. Besi yeri hazırlama ve kültür hazırlama prosedürleri	34
Şekil 3.4. Elektroforez tankına ampikonların yüklenmesi basamağı	36
Şekil 3.5. pJET1.2/blunt klonlama vektörü.....	37
Şekil 3.6. LB katı besiyeri hazırlama basamağı	38
Şekil 3.7. LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin görünümü	39
Şekil 4.1. <i>Acanthamoeba</i> izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen ampikonların jel elektroforezde görünümü	44
Şekil 4.2. Transformasyon sonucu besiyerinde oluşan koloniler	45
Şekil 4.3. Transforme hücrelerde 18S gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampikonların jel agarozda görünümü.	45
Şekil 4.4. TRERUAcantha1 izolatının parsiyel 18S rRNA gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (MN648628).....	47
Şekil 4.5. TRERUAcantha2 izolatının parsiyel 18S rRNA gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (MN648629).....	47
Şekil 4.6. Su örneklerinde pozitif belirlenen <i>Acanthamoeba</i> izolatları ile Dünya'dan ve Türkiye'den analizleri yapılan diğer bazı izolatların 18S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri	52

Şekil 4.7. Su örneklerinde belirlenen *Acanthamoeba* izolatları ile Dünyadaki ve Türkiye’deki diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının partial 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları 55

Şekil 4.8. Su örneklerinde saptanan *Acanthamoeba* izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları..... 57



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Acanthamoeba türleri toprak, hava, tatlı su, yüzme havuzları, musluk suyu ve okyanus çökeltileri gibi çeşitli insan ortamlarında yaşamaya adapte olmuş ve doğada serbest yaşayan bir amiptir. İnsanların doğa ile temasının artması, toprak, su ve havayı kendi yararları için daha fazla kullanmaya başlamaları doğada serbest yaşayan amiplerin insan vücuduna girme olasılığını arttırmakta ve serbest yaşayan amiplerin neden oldukları hastalıklar da gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Son yıllarda bilim insanları, immün sistemi baskılanmış bireylerde hayatı tehdit eden granülomatöz amibik ensefalite (GAE) ve kontakt lens kullananlarda görmeyi tehdit eden amip keratitine neden olan bu protozoona daha fazla dikkat çekmeye başlamışlardır. *Acanthamoeba* keratit enfeksiyonu insidansı son 30 yılda hızla artmıştır. Son yıllarda GAE kaynaklı ölüm oranları ve keratite bağlı göz hasarları vakalarında artış gözlemlenmiştir (Awwad ve ark., 2007; Patel ve McGhee, 2009).

Acanthamoeba türlerinin tanımlama ve alt cins düzeyinde klasifikasyonunda sıkıntılar bulunmaktadır. *Acanthamoeba* türlerinin cins düzeyde tanımlanması morfolojik özellikler ile yapılabilmektedir. Pussard ve Pons (1977), kist büyüklüğü ve diğer morfolojik özelliklerine göre *Acanthamoeba* türlerini üç morfolojik gruba ayırmıştır. Grup 1'deki *Acanthamoeba* spp. nispeten büyük kistler, belirgin yıldız şeklinde endokistler ve pürüzsüz küresel ektokistlere sahiptir. Grup 2 ve Grup 3'teki *Acanthamoeba* spp. ise daha küçük kistlere sahiptir (çapı 18 μm 'den az). Grup 2'deki türler düzensiz veya buruşuk ektokistlerle yıldız şeklinde endokistleri poligonal hale getirirken, Grup 3'teki türlerinin kistleri kalaylı ve pürüzsüz veya hafif buruşmuş ektosistleri olan yuvarlak veya hafif açısallı endokistlere sahiptir. Gruplandırma, amip türlerinin tanımlanmasından önce yaygın olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, kistin

morfolojik özellikleri kültür koşulları ile değişebilir ve aynı suş içerisinde oldukça değişken yapıya bürünmektedir. Bu nedenle, türlerin sadece morfolojiye dayalı tanımlanması zorlukla mümkün olabilmektedir (Sawyer, 1971; Visvesvara, 1991). Bu güçlüklerin üstesinden gelmek amacıyla *Acanthamoeba* türlerinin taksonomik sınıflandırılmasında izoenzim analizi, RFLP metodu ve özellikle 18S rRNA gen bölgesinin sekans analizleri gibi moleküler metotlar kullanılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Son yıllarda moleküler çalışmaların hız kazanmasıyla *Acanthamoeba* türlerinin genotiplere ayrıldıkları belirlenmiştir. Bu genotiplendirme çalışmaları sonucu birçok patojen ve apatojen türlerin tespiti yapılmış ve yeni tanı yöntemleri geliştirilerek tedavide daha etkin ilaçlar keşfedilmeye başlamıştır. *Acanthamoeba* türleri üzerindeki artan araştırma ilgileri ve dünya çapında ileri moleküler tekniklerin mevcudiyeti şüphesiz ek genotiplerin tanımlanmasına sebep olacaktır. Bu çalışmalar, *Acanthamoeba* türlerinin ekosistemdeki bakteriyel simbiyozun yanı sıra birincil ve ikincil insan enfeksiyonlarına neden olmadaki rolünü netleştirmeye yardımcı olacaktır (Khan, 2006).

Acanthamoeba türlerinin genotiplendirilme çalışmalarına rağmen Türkiye’de bu türlerin moleküler filogenileri ve karakterizasyonları hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında Sinop ve Ordu yörelerindeki çeşitli su kaynaklarından toplanan örneklerden elde edilen *Acanthamoeba* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin moleküler karakterinin ve genotiplerinin ortaya konulması ve elde edilen haplotiplerin Türkiye’nin biyolojik çeşitliliğine katkı sağlaması amacıyla Genbank kayıtlarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Amip terimi protistler içerisindeki en büyük organizma olan *Amoeba proteus* gibi organizmaları kapsar ve ilkel mikroskobun keşfinden beri çalışılmaktadır. Bu organizmalar yaygın olarak sürünür gibi amipsi hareket eder olmalarına rağmen birkaç farklı grupta sınıflandırılmışlardır. Bunlar 1873'te kanlı dizanteri geçiren bir hastada keşfedilen ve 1903 yılında *Entamoeba histolytica* olarak adlandırılan *Entamoeba* türü gibi güçlü parazitik organizmaları içerir. Serbest yaşayan amipler arasında *Naegleria* türleri ilk olarak 1899 yılında *Amoeba gruberi* organizmasına adını veren Sohardinger tarafından keşfedilmiş ve 1912 yılında *Naegleria fowleri* olarak tanımlanmıştır. 1930 yılında *Acanthamoeba* türleri ökaryotik hücre kültürü organizmaları olarak keşfedilmiştir. *Balamuthia mandrillaris* meningoensefalitten ölen bir maymunun beyninden izole edilmiş ve *Balamuthia*'nın yeni bir cinsi olarak tanımlanmıştır. Yıllar geçtikçe bu serbest yaşayan amipler özellikle ciddi ve bazen ölümcül insan enfeksiyonlarına neden olan çeşitli rolleri sebebiyle bilim insanları tarafından ilgi görmeye başlamıştır (Khan, 2006).

Bu amip türleri arasındaki en önemlilerinden biri olan *Acanthamoeba* türleri çeşitli ortamlarda hayatta kalma yeteneğine sahiptir. Halka açık su kaynaklarından, yüzme havuzları, şişelenmiş su, deniz suyu, havuz suyu, durgun su, tatlı su gölleri, tuzlu su gölleri, nehir suyu, damıtılmış su şişeleri, havalandırma kanalları, su-hava arayüzü, iklimlendirme üniteleri, kanalizasyon, organik gübre, çökelti, toprak, plajlar, sebzeler, hava, cerrahi aletler, kontakt lensler ve atmosferden izole edilmesi bu organizmaların her yerde yaygın olduğunu göstermektedir. Bunun yanında *Acanthamoeba* türleri hastaneler, diyaliz üniteleri, göz yıkama istasyonları, insan burun boşlukları, farengeal svaplar, akciğer dokuları, cilt lezyonları, kornea biyopsiler, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve beyinden de izole edilmiştir (Khan, 2006).

2.1. ACANTHAMOEBA TÜRLERİNİN TARİHÇESİ

Castellani (1930), *Cryptococcus pararoseus* mantarlarının kültüründe bir amip keşfetmiştir. Bu amip, 13,5-22,5 µm çapa sahip yuvarlak veya oval şekilli ve psödopoda sahip bir morfolojiye sahip olup *Hartmonella* cinsi içinde sınıflandırıldı ve *Hartmonella castellani* olarak adlandırıldı. Bir yıl sonra Volkonsky (1931), *Hartmonella* cinsini özelliklerine göre 3 cinse böldü:

- 1- *Hartmonella*: Yuvarlak, düz duvarlı kistler ile karakterize amipler
- 2- *Glaeseria*: Kistlerde çekirdek bölünmesi ile karakterize amipler
- 3- *Acanthamoeba*: Mitoz, çift duvarlı kistler ve düzensiz dış tabakada sivri uçların görünmesi ile karakterize amipler

Singh (1950) ile Singh ve Das (1970) amiplerin morfoloji, hareket yeteneği ve kistlerin görünümüyle sınıflandırılmasının sınırlı filogenetik değere sahip olduğunu ve bu özelliklerin tanısal olmadığını iddia etmişlerdi. Bu bilim insanları, mitotik iğ şeklinin genel bir karakter olarak yetersiz olduğu ve *Acanthamoeba* cinsinden ayrıldığı sonucuna varmışlardır. 1966'da Pussard, iğ şeklinin türlerin farklılaşması için yetersiz bir özellik olduğunda Singh (1950) ile aynı fikirdeydi ancak kistin ayırt edici morfolojisinin genel düzeyde belirleyici bir karakter olduğunu düşünmüş ve *Acanthamoeba* cinsini tanımıştır. *Hartmonella* ve *Acanthamoeba*'nın birkaç suşunu inceledikten sonra Page (1967a, b) ayrıca iğ şeklinin türlerin farklılaşması için şüpheli bir kriter olduğu sonucuna varmıştır. *Hartmonella* ve *Acanthamoeba*'nın genel adlandırmalarını haklı çıkarmak için acanthapodianın varlığı ve kistin yapısının yeterince ayırt edici olduğunu düşünmüş ve ayrıca *Hartmonella* cinsinin diğer birçok amiple paylaşılan bir özellik olan genel bir mitotik model olmasının haricinde *Acanthamoeba* ile hiçbir ortak yanı olmadığını belirtmiştir. Sawyer ve Griffin (1975), *Acanthamoebidae* ailesini keşfetmiş ve Page (1988) *Hartmonella* türlerini *Hartmonellidae* ailesi içerisine yerleştirmiştir. "Acant" ön eki bu organizmaların yüzeyinde omurga benzeri yapıların (acanthapodia olarak bilinir) varlığını belirtmek için amipler terimine eklenmiştir. 1930'da ilk ismin keşfinden sonra bu organizmalar yaklaşık 30 yıl boyunca göz ardı edilmiştir. Ancak 1950'lerin sonunda *Acanthamoeba* türleri doku kültürü atıkları olarak keşfedilmiştir. Sonra Culbertson ve ark. (1958, 1959) ilk kez bu organizmaların patojenik potansiyelini laboratuvar ortamında maymun böbrek hücreleri üzerine sitopatik etkiler üretme ve canlı ortamda laboratuvar hayvanlarını öldürme yeteneğini göstererek kanıtlamıştır.

Jager ve Stormn (1972) insanlarda GAE tanımlamıştır. İlk *Acanthamoeba* kaynaklı keratit vakası Nagington ve ark. (1974) tarafından rapor edilmiştir. *Acanthamoeba*'nın ilk kez 1954'te (Drozonski, 1956) bakteri ile enfekte olduğu gösterilmiş; endosymbiontlar olarak bakteri barındırdığı kanıtlanmış ve patojenik fakültatif mikobakteriler için bir rezervuar sağladığı gösterilmiştir. *Acanthamoeba*'nın ilk kez Rowbotham (1980) tarafından lejyoner hastalığı ile bağlantısı kurulmuştur. O zamandan beri *Acanthamoeba* alanındaki araştırma ilgisi dünya çapında çarpıcı bir şekilde artmış ve artmaya da devam etmektedir.

2.2. TAKSONOMİ

Taksonomik sınıflandırmaya göre *Acanthamoeba* türlerinin klasifikasyonları aşağıdaki gibidir (<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1064&src=0>).

Natura

actualia

Mundus Plinius

naturalia

Biota

“neomura”

Domain “**Eukaryota**” Chatton, 1925

“neokaryotes”

“neozoa”

“**scotokaryotes**” Cavalier-Smith, 1999

“**podiates**” Cavalier-Smith, 2013

“**Amorphea**” Adl et al., 2012

Phylum “**Amoebozoa**” L  he, 1913

Subphylum “**Lobosa**” Carpenter, 1861

Class “**Discosea**” Cavalier-Smith, 2004

Subclass “**Longamoebia**” Cavalier-Smith & Smirnov, 2011

Order “**Centramoebida**” Rogerson & Patterson, 2002

Family “**Acanthamoebidae**” Sawyer & Griffin, 1975

Genus “**Acanthamoeba**” Volkonsky, 1931

Acanthamoeba tubiashi Lewis & Sawyer, 1979

Acanthamoeba astronyxis (D.L. Ray & R.E. Hayes, 1954)

Acanthamoeba comandoni Pussard, 1964

Acanthamoeba lugdunensis Pussard & Pons, 1977

Acanthamoeba castellanii (Douglas, 1930)

Acanthamoeba rhyodes (Singh, 1952)

Acanthamoeba mauritaniensis Pussard & Pons, 1977

Acanthamoeba polyphaga (Puschkarew, 1913)

Acanthamoeba griffini Sawyer, 1971

Acanthamoeba quina Pussard & Pons, 1977

Acanthamoeba divionensis Pussard & Pons, 1977

Acanthamoeba triangularis Pussard & Pons, 1977

Acanthamoeba hatchetti Sawyer, Visvesvara & Harke, 1977

Acanthamoeba palestinensis (Reich, 1933)

Acanthamoeba royreba Willaert, Stevens & Tyndall, 1978

Acanthamoeba culbertsoni (Singh & Das, 1970)

Acanthamoeba lenticulata Molet & Ermolieff-Braun, 1976

Acanthamoeba gigantea Schmoller, 1964

Acanthamoeba jacobsi Sawyer, Nerad & Visvesvara, 1992

Acanthamoeba stevensoni Sawyer, Nerad, Lewis & McLaughlin, 1993

Acanthamoeba pearcei Nerad, Sawyer, Levis & McLaughlin, 1995

Acanthamoeba healyi Moura, Wallace & Visvesvara, 1992

Acanthamoeba türleri kistlerin morfolojik özelliklerine göre üç grupta sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Kistlerin morfolojik özelliklerine göre *Acanthamoeba* türleri

Gruplar	Grup 1	Grup 2	Grup 3
	<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
	<i>A. tubiashi</i>	<i>A. divionensis</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. echinulata</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. commandoni</i>	<i>A. hatchetti</i>	<i>A. lenticulata</i>
		<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. palestinensis</i>
		<i>A. mauritaniensis</i>	
		<i>A. guina</i>	
		<i>A. rhysodes</i>	
		<i>A. stevensoni</i>	
		<i>A. triangularis</i>	
		<i>A. griffini</i>	
		<i>A. parativionensis</i>	

Grup 1: Bu grupta *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* ve *A. tubiashi* dahil olmak üzere dört tür bulunmaktadır. Bu türler büyük trofozoitleri sergilerken, kist formlarında ektosist ve endokist geniş ölçüde ayrılır ve aşağıdaki özellikleri sergiler: (1) ortalama kist çapı $\geq 18\mu\text{m}$ olan altıdan daha az kola sahip. *A. astronyxis*; (2) 6–10 kolu ve ortalama kist çapı $\geq 25.6\mu\text{m}$ olan *A. comandoni*; (3) 12–14 kolu ve ortalama kist çapı $\geq 25\mu\text{m}$ – *A. echinulata*; (4) ortalama kist çapı $\geq 22.6\mu\text{m}$ – *A. tubiashi* (Khan, 2006)

Grup 2: Bu grup, en yaygın ve en çok izole edilen *Acanthamoeba* türlerini kapsamakta olup 11 tür bulunmaktadır. Ektosist ve endokist birbirine yakın olabilir veya geniş ölçüde ayrılabilir. Ektosistler kalın, ince olabilir ve endokistler poligonal, üçgen veya yuvarlak olabilir ve ortalama çapı 18 μm 'den az olabilir. Bu gruba dahil olan türler, *A. mauritaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhysodes*, *A. parativionensis* ve *A. hatchetti*'dir (Khan, 2006)

Grup 3: Beş grup bu gruba dahil edildi: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* ve *A. pustulosa*. Bu gruptaki ektosistler incedir ve endokistler ortalama kist çapı 18 μm olan 3-5 yumuşak köşeye sahiptirler (Khan, 2006).

Acanthamoeba türlerinin tek başına morfolojik özelliklere dayanarak tanımlanmasının problemli olduğu açıktır. Çalışmalarda aynı izolat veya suşun kist morfolojisindeki tutarsızlıklar ve farklılıklar rapor edilmiştir. Örneğin, Sawyer (1971), büyüme ortamının iyonik kuvvetinin kist duvarlarının şeklini değiştirebileceğini keşfetmiş ve böylece kist morfolojisinin taksonomik bir karakteristik olarak güvenilirliğini büyük ölçüde azalttığını rapor etmiştir. Çeşitli araştırmalar, *A. castellanii* içindeki suşların virulent,

zayıf virulent veya avirulent olabileceğini göstermiştir. İleri moleküler tekniklerin keşfi özellikle rRNA gen sekanslarına dayalı *Acanthamoeba* cinsinin sınıflamasında öncü çalışmalara yol açmıştır. rRNA dizilerine dayanarak, *Acanthamoeba* cinsi, 22 farklı genotipe ayrılmıştır (T1-T22) Tablo 2.2) (Schuster ve Visvesvara, 2004; Corsaro ve ark., 2015; Dodangeh ve ark., 2018).

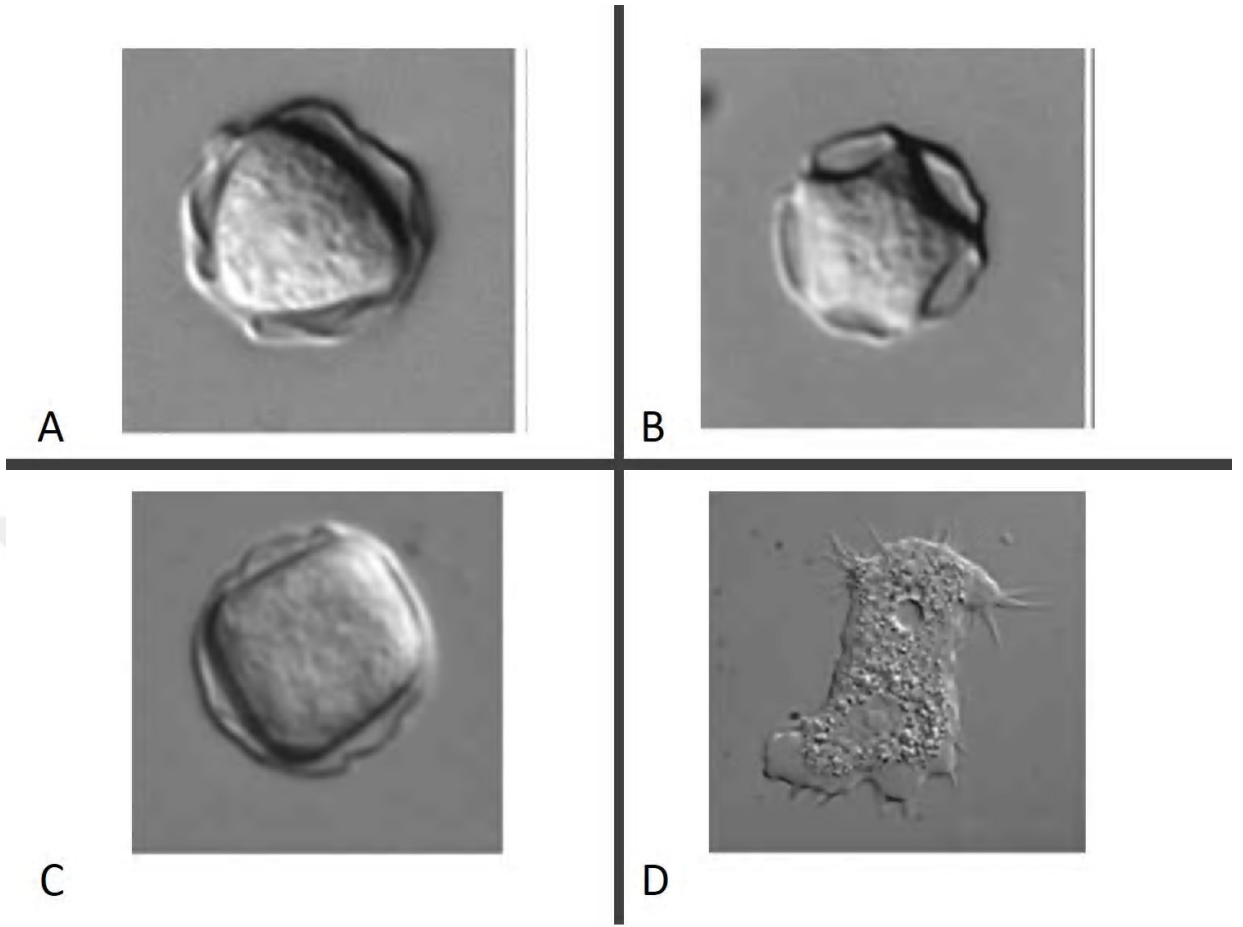
Tablo 2.2. *Acanthamoeba* genotipleri ve insanlarda neden olduğu hastalıklar

Genotipler	Hastalıklar
T1	Ensefalit
T2a	Keratit
T2b	Keratit
T3	Keratit
T4	Ensefalit, Keratit
T5	Bilinmiyor
T6	Keratit
T7	Bilinmiyor
T8	Bilinmiyor
T9	Bilinmiyor
T10	Ensefalit
T11	Keratit
T12	Ensefalit
T13	Bilinmiyor
T14	Bilinmiyor
T15	Bilinmiyor
T16	Bilinmiyor
T17	Bilinmiyor
T18	Bilinmiyor
T19	Bilinmiyor
T20	Bilinmiyor
T21	Bilinmiyor
T22	Bilinmiyor

Bu sınıflandırmaya göre *Acanthamoeba* kaynaklı insan enfeksiyonlarının çoğu T4 genotipiyle ilişkilendirilmiştir. Keratit vakalarının %90'ından fazlasının nedeninin bu genotip olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde T4 genotipi, GAE ve deri enfeksiyonları gibi keratit dışı enfeksiyonlarla ilişkili ana genotip olmuştur. Ayrıca, son bulgular insan enfeksiyonlarında T4 izolatlarının bolluğunun büyük olasılıkla daha yüksek virülans veya bulaşıcılıklarını arttıran özelliklerinin yanı sıra kemoterapötik ajanlara karşı azalan duyarlılıklarından kaynaklanabileceğini göstermiştir (Maghsood ve ark., 2005).

2.3. MORFOLOJİ VE YAŞAM DÖNGÜSÜ

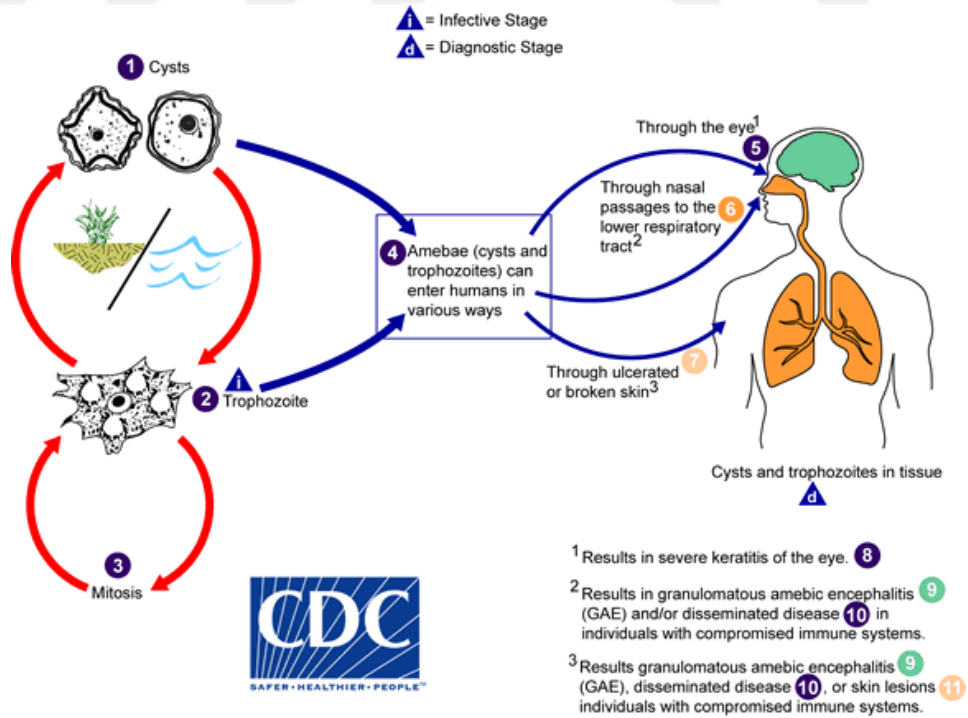
Acanthamoeba türlerinin yaşam döngüsünde bir trofozoit ve bir kist dönemi bulunur (Şekil 2.1.). Trofozoitlerin çapı 12-35 µm arasında değişir ancak büyüklüğü farklı türlere/genotiplere ait izolatlar arasında önemli ölçüde çeşitlilik gösterir. Mikroskop altında aktif olarak beslenen bir trofozoit, işlevi suyu dışarı çıkarmak olan bir veya daha fazla belirgin kasılma vakuölü bulundurur. *Acanthamoeba* türleri protein sentezi için sitoplazmik yüzey üzerine bağlanmış ribozomlarla geniş bir endoplazmik retikulum ağına sahiptir. Trofozoit, beslenmeyle ilgili metabolik faaliyetler ve aynı zamanda hareket, üreme ve diğer hücresel işlevler için gerekli enerjiyi üreten çok sayıda mitokondriye sahiptir. Plazma membranında, membranın her iki tarafında açığa çıkan şekerlerle (Bowers ve Korn, 1974) memeli hücrelerinde bulunmayan (Korn ve ark., 1974) bir lipofonoglikan mevcuttur. Sitoplazma çok sayıda fibril, glikojen ve lipid damlacıklarına sahiptir. Aktin (toplam proteinin %20 sini oluşturur) ve miyozin 20'den fazla sitoskeletal protein ile birlikte trofozoitlerden izole edilmiştir ve hareket, hücre içi taşınma ve hücre bölünmesiyle ilişkili hücresel fonksiyonlardan sorumludur. Optimal büyüme koşulları altında *Acanthamoeba* ikili bölünme tarafından çoğaltılır. Jenerasyon süresi farklı türlere/genotiplere ait izolatlar arasında 8-24 saate kadar farklılık gösterir (Khan, 2006).



Şekil 2.1. *Acanthamoeba* türlerinin yaşam formları. A, B, C. Kist, D. Trofozoit (Kong, 2009)

Trofozoitler yüzeylerinde acanthopodia olarak bilinen omurga benzeri yapılar sergilerler. Acanthopodia yüzeylere yapışma, hücresel hareketler veya besin maddesinin yakalanmasında önemlidir. Trofozoitler, 1/6 oranında tek bir çekirdeğe sahiptir. Trofozoit evresi sırasında *Acanthamoeba* aktif olarak bakteriler, algler, mayalar veya küçük organik partiküller ile beslenir ve hücrenin sitoplazmasında birçok yiyecek vakuölü görülebilir. Hücre bölünmesi aseksüeldir ve ikili bölünme ile oluşur. Katlanarak bölünen hücreler için, hücre bölünmesi büyük ölçüde G2 fazında (%90'a kadar) ve G1 fazında, %2,3 M fazında (mitoz) ve %2-3 S fazında (sentez) bulunur. *Acanthamoeba* türleri bol besin maddesi, nötr PH, uygun sıcaklık ve 50-80 osmol arasında ozmolaritenin bulunduğu durumlarda trofozoit aşamasında kalabilir (Khan, 2006). Bununla birlikte, zorlu koşullar (örneğin; gıda eksikliği, artmış ozmolarite ya da hipoozmolarite, sıcaklık ve ph'daki aşırılıklar) trofozoitlerin kist aşamasına dönüşümünü sağlar. Basit anlamda trofozoit metabolik olarak inaktif hale gelir

(minimal metabolik aktivite) ve kendini dirençli bir kabuk içine kapatır. Tam olarak, kistlenme aşaması sırasında aşırı yiyecek, su ve partikül madde atılır ve trofozoit zor şartlarda hayatta kalmak için kendisini dış duvarı sadece bir kabuk olarak hizmet eden çift duvarlı bir kist haline olgunlaşan yuvarlatılmış bir yapıya yoğunlaşır. RNA, proteinler, triasilgliseritler ve glikojenin hücresel seviyeleri tutma işlemi sırasında büyük ölçüde azalır, sonucunda hücre hacmi ve kuru ağırlık azalır (Weisman, 1976). Kist aşaması 15-20 µm çapındadır ancak yine farklı türler/genotipler arasında değişmektedir. Kistler hava yoluyla yayılır ve bu da *Acanthamoeba*'nın çevreye yayılmasına ve bu patojenlerin duyarlı konaklara taşınmasına yardımcı olabilir. Kistlerin birkaç yıl boyunca canlı kalabileceği ve patojenitelerini korudukları rapor edilmiştir. Kistler çevresel değişimleri izlemek için kullanılan ostioles olarak bilinen gözeneklere sahiptir. Trofozoitler dış kabuğu arkasında bırakarak uygun koşullar altında kistlerden çıkar ve yukarıda açıklandığı gibi aktif olarak çoğalır, böylece döngüyü tamamlar (Şekil 2.2). Hem kistlenme hem de kistten çıkma işlemleri aktif makromolekül sentezini gerektirir ve sikloheksimid (bir protein sentez inhibitörü) ile bloke edilebilir (Khan, 2006).



Şekil 2.2. *Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü
<https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/pathogen.html>

Trofozoitler toplam DNA'nın %80-85'ini içeren nükleer DNA ile hücresel, nükleer ve mitokondriyal DNA içerir. Ek olarak sitoplazmik olmayan mitokondriyal DNA bildirilmiş olup kaynağı bilinmemektedir (Ito ve ark., 1969). Toplam hücresel DNA, log fazı sırasında tek hücreli tek çekirdekli amipler için 1 ile 2 pg arasında değişmektedir (Byers ve ark., 1990). Nükleer kromozomların sayısı belirsizdir. Nükleer DNA içeriğinin ölçümleri (T4 genotipine ait *Acanthamoeba castellanii* Neff suşu) 10^9 bp'lik bir toplam DNA içeriği göstermiştir. Kinetik karmaşıklığın ölçümü yaklaşık $4-5 \times 10^7$ bp'lik bir haploid genom büyüklüğüne işaret etmektedir (Byers ve ark., 1990). Pulse-field jel elektroforezi 5,000'den fazla transkript ifade eden yaklaşık $2.5-3.5 \times 10^7$ bp'lik bir genom göstermektedir. Zorlu koşullar altında trofozoitler bölünmeyen, çift duvarlı dirençli kist formuna farklılaşırlar. Kist duvarları, kistin toplam kuru ağırlığının %10'unu oluşturan selüloz (trofozoit aşamasında mevcut değildir) içerir (Tomlinson ve Jones, 1962). Kist duvarı kompozisyonu farklı türlere/genotiplere ait izolatlar arasında değişiklik göstermekte olup T4 izolatının (*A. castellanii*) %33 protein, %4-6 lipid, %35 karbonhidrat (çoğunlukla selüloz), %8 kül ve %20 bilinmeyen materyal içerdiği gösterilmiştir (Neff ve Neff, 1969).

2.4. BESLENME FİZYOLOJİSİ

Acanthamoeba türleri yüzeylerde, çeşitli ortamlarda ve hatta hava ve su yüzeylerinde bulunan mikroorganizmalardan beslenir. *Acanthamoeba* türleri, yüzeylerinden çıkan dikenli yapılar veya acanthapodiaları besin maddesi olarak bakterileri yakalamak için kullanırlar. Gıda alımı fagositoz ve pinositoz aracılığıyla gerçekleşir. Pinositoz membran invazyonları yoluyla spesifik olmayan bir süreçken, fagositoz reseptör bağımlı bir süreçtir ve büyük miktarlarda çözünen besin maddelerinin alınması için kullanılır. *Acanthamoeba* spp. yiyecek parçacıkları ve çözünen maddelerin büyük miktarlarda alımı için hem spesifik fagositoz hem de spesifik olmayan pinositoz kullanırlar. Albumin, inulin, glikoz ve lösin dahil olmak üzere çeşitli moleküler ağırlıkların çözeltileri 10^6 hücre başına 2 μ l'lik oranda bu amiplere girerler. Ancak amiplerin pinositoz ve fagositoz arasında nasıl bir ayrım yaptıkları, neden birini ya da diğerini kullandıkları ve bu konuda patojenik ve patojenik olmayan *Acanthamoeba* arasındaki farkın tam olarak nasıl bilindiği anlaşılamamıştır. *Acanthamoeba* türleri sindirilebilir ve sindirilemeyen partiküller içeren vakuollerini ayırt etme yeteneği gösterir (Khan, 2006). Bowers ve Olszewski (1983), *Acanthamoeba* içindeki vakuollerin

akıbetinin partiküllerin doğasına, lateks taneciklerine ve yiyecek partiküllerine bağlı olduğunu göstermiştir. Yeni parçacıklar sunulduktan sonra gıda parçacıkları içeren vakuoller korunur ve sindirilir. Bu süreçler *Acanthamoeba* türlerindeki partikül alımının hem gıda alımında hem de *Acanthamoeba* patogeneğinde önemli bir rol oynayabilecek karmaşık bir süreç olduğunu göstermektedir.

2.5. İZOLASYON YÖNTEMLERİ

Doğal ortamlarda *Acanthamoeba* spp., mayalar, protozoonlar, bakteriler, küçük organizmalar ve organik parçacıklar ile beslenir. Bu organizmlerden herhangi biri, laboratuvar şartlarında *Acanthamoeba* spp. için büyüme substratları olarak kullanılabilir. Ancak bazı teknik problemler bulunmaktadır. Örneğin; maya ve protozoanın büyüme substratları olarak kullanılması, hazırlanmalarındaki karmaşıklık, bunların olası karşı konulamaz büyüme sorunu ve saf aksenik *Acanthamoeba* kültürleri elde etmek için mayanın yok edilmesindeki zorluk nedeniyle sorunludur. Glikoz, proteaz pepton ya da diğer substratlar gibi organik maddeler, istenmeyen organizmalar yani mayalar, mantarlar, diğer protozoalar ve bakteriler için zengin besinler sağlar. Bu teknik problemlerin üstesinden gelmek ve *Acanthamoeba*'nın çevresel ve klinik örneklerden izolasyon olasılığını en üst düzeye çıkarmak için aşağıda tarif edildiği gibi basit kaplama deneyleri kullanılarak protokoller geliştirilmiştir (Khan, 2006).

2.5.1. Gram negatif bakteri ile kaplanmış besleyici değeri olmayan agar pleytlerini kullanarak *Acanthamoeba* izolasyonu

Bu yöntem, dünya çapında hem çevresel hem de klinik örneklerden *Acanthamoeba* spp. izolasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin temeli, *Acanthamoeba* spp. için besin kaynağı olmayan agar pleytler üzerine ekilmiş olan Gram-negatif bakterilerin (*Escherichia coli* veya daha önce *Klebsiella aerogenes* olarak bilinen *Enterobacter aerogenes*) kullanımıdır. Besleyici olmayan agar minimum besin içerir ve böylece istenmeyen organizmaların büyümesini engeller (Khan ve Paget, 2002). Kısaca; %4 (a/h) malt ekstratı ve %4 (a/h) maya ekstratı ile desteklenmiş %1 (a/h) oksoit no.1 agar içeren PGAE'in amip tuzunda (PAS) (2.5mM NaCl, 1mMKH₂P0₄, 0.5mM Na₂HP0₄, 40mM CaCl₂.6H₂O ve 20mM MgS0₄.7H₂O) besleyici olmayan agar pleytleri hazırlanır ve pH, KOH ile 6,9'a ayarlanır. Gram-negatif bakterilerin yaklaşık 5 ml faz kültürleri besleyici olmayan agar plakalara dökülür ve 5 dakika bekletilir. Daha sonra

fazla kültür sıvısı çıkarılır ve pleytler, çevresel örnek veya klinik örneklerle muamele edilmeden önce kurumaya bırakılır. Sonra pleytler 30 °C'de inkübe edilir ve *Acanthamoeba* trofozoitlerinin mevcudiyeti için günlük olarak gözlemlenir (Khan ve ark, 2001; Khan ve Paget, 2002). Numunedeki amiplerin sayısına bağlı olarak, trofozoitler birkaç saat içinde gözlenebilir (12 saate kadar). Ancak, amip yokluğunda, pleytler 7 güne kadar izlenmelidir. Bakteriler tükendiğinde, *Acanthamoeba* karakteristik kistlere farklılaşır.

2.5.2. *Acanthamoeba* türlerinin aksenik kültürasyonu

Acanthamoeba spp., harici canlı besin maddelerinin yokluğunda "aksenik" olarak yetiştirilebilir. Bu, diğer canlı organizmaların olmadığını göstermek için tipik olarak aksenik kültür olarak adlandırılır. Bununla birlikte, *Acanthamoeba* kültürleri, endosymbiont olarak hayatta kalan canlı bakterileri içerebildiklerinden hiçbir zaman gerçek anlamda aksenik olamazlar. Laboratuvar koşulları altında, sıvı PYG ortamı [proteoz pepton %0,75 (ağırlık/hacim), %0,75 (ağırlık/hacim) maya özütü ve %1,5 (ağırlık/hacim) glikoz] kullanılarak aksenik büyüme sağlanır. Kısaca bakteri ile kaplanmış besleyici olmayan agar pleytleri, bakteri alanını öldürmek için 15-30 dakika boyunca UV ışığına yerleştirilir. Amipli kistler içeren küçük bir besleyici olmayan agar parçası bu UV ile öldürülmüş bakterileri içeren pleytlere yerleştirilir. Amipler büyümeye başladığında, trofozoitleri veya kistleri içeren agarın pul büyüklüğünde bir parçası, antibiyotikler, yani penisilin ve streptomisin içeren 10 ml steril PYG ortamına aktarılır. *Acanthamoeba* spp., gıda kaynağı olarak PYG ortamına geçer ve çoğalmaları birkaç gün içinde gözlemlenebilir. PYG ortamında çoğaltıldıktan sonra, *Acanthamoeba* spp. tipik olarak doku kültüründe aerobik olarak yetiştirilir ve statik koşullarda 30°C'de filtre kapakları ile şişelenebilir. Trofozoitler şişe duvarlarına yapışır ve 15-30 dakika (41°C'de) şişe soğutularak toplanır ve ardından hücreleri içeren ortamın santrifüjlenir (Khan, 2006).

2.5.3. Kistlenme yöntemleri

Acanthamoeba kistlerini elde etmek için hem ksenik hem de aksenik yöntemler geliştirilmiştir. Ksenik kültürler için *Acanthamoeba* spp., yukarıda belirtildiği gibi bakteri ile kaplanan besleyici olmayan agar pleytlerine dökülür. Pleytler, bakteriler temizlenene ve trofozoitler kistlere dönüşene kadar 30°C'de inkübe edilir. Kistler, fosfat

tamponlu salin (PBS) kullanılarak agar yüzeyinden sıyrılabilir ve deneyler için kullanılabilir. Bu, en olası doğal kesişme moduna benzemektedir ve %100'e kadar kist elde ederek etkili olabilmektedir. Aksenik kistlenme için *Acanthamoeba* spp., 17-20 saat boyunca PYG ortamında büyütülür. Bu inkübasyondan sonra, RPMI 1640 (Invitrogen) içindeki %8 glikoz tutulmayı uyarmak için eklenir. Pleytler, 30°C'de 48 saate kadar inkübe edilir. Trofozoitlerin kistlere dönüştürülmesini sağlamak için, sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenir. Trofozoitler SDS'ye duyarlıdır ve kalanlar SDS eklendikten hemen sonra eritilir ve kistler bozulmadan kalır (Cordingley ve ark., 1996; Dudley ve ark., 2005). Bu yöntem, bir hemositometre kullanarak kistlerin basit sayımını mümkün kılar ve kistlenme sürecinin çalışılmasında yararlıdır.

2.5.4. *Acanthamoeba* türlerinin depolanması

Kısa süreli depolama için *Acanthamoeba* türleri besleyici olmayan agar pleytler üzerinde muhafaza edilir. *Acanthamoeba* inokule edilmiş pleytler, birkaç ay boyunca 4°C altında nemli koşullarda ya da pleytleri kurumaya karşı korunduğu sürece muhafaza edilebilir. Kistler, aksenik kültürler elde etmek için antibiyotiklerin varlığında PYG ortamına yeniden inokule edilebilir. Alternatif olarak, *Acanthamoeba* trofozoitleri uzun süreli depolama için aksenik kültürler olarak depolanabilir. Kısaca, log-fazlı amipler (aktif olarak bölen), donma ortamı içinde 3-5 10^6 parazit ml^{-1} yoğunluğunda yeniden süspanse edilir (%10 dimetilsülfoksit içeren PYG, DMSO) (John ve John, 1994). Son olarak, kültürler 24 saat boyunca -20°C'ye aktarılır, ardından -70°C'de veya sıvı azot içinde depolanırlar. *Acanthamoeba* kültürleri 37°C'de çözülerek canlandırılabilir, ardından 30°C'de bir T75 şişesinde PYG ortamına hemen transfer edilir. Bununla birlikte, donma besisi yerinde %20 fetal bovin serumu dahil edilmesinin, uzun vadede *Acanthamoeba* türlerinin canlanabilme kabiliyetini arttırdığı gösterilmiştir (Khan, 2006).

2.6. ACANTHAMOEBA TÜRLERİNİN İNSANLARDA NEDEN OLDUĞU ENFEKSİYONLAR

Acanthamoeba türleri insan sağlığında büyük sorun olan iki hastalığa neden olur: körlüğe yol açabilen keratit ve immün sistemi baskılanmış hastalarda neredeyse her zaman ölümle sonuçlanan merkezi sinir sistemi hastalığı GAE (Khan, 2006).

2.6.1. *Acanthamoeba keratiti* (kontakt lensten korneaya)

İlk olarak İngiltere'de Nagington ve ark. (1974) tarafından keşfedilen *Acanthamoeba keratiti* önemli bir oküler mikrobiyal enfeksiyondur. *Acanthamoeba keratiti*nde kilit predispozan faktör, kirli suya maruz kalan kontakt lenslerin kullanılmasıdır. Ancak bu işlemle ilgili kesin mekanizmalar tam olarak anlaşılmamıştır. Genel olarak bu, (i) uzun süre kontakt lens aşınması, (ii) kişisel hijyen eksikliği, (iii) kontakt lenslerin uygunsuz şekilde temizlenmesi, (iv) kontakt lenslerde biyofilm oluşumu ve (v) kirli suya maruz kalmayı içeren çok faktörlü bir süreçtir. Beattie ve ark. (2003), *Acanthamoeba* türlerinin kullanılmamış kontakt lenslere kıyasla, kullanılan kontakt lenslere daha yüksek bağlanma gösterdiğini göstermiştir. Kullanılan kontakt lensler üzerinde yapılan testler, kontakt lenslerin yalnızca 30 dakikalık kullanımından sonra kontakt lenslerin yüzeyinde mannoz, glukoz, galaktoz, fukoz, N-asetil-D-glukozamin, N-asetil-D-galaktozamin, N-asetil neuraminik asit (sialik asit) ve proteinler, glikoproteinler, lipidler, müsinler, polisakaritler, kalsiyum, demir, silika, magnezyum, sodyum, laktoferrin, lizozim ve immünoglobulin (Ig) molekülleri (Tripathi ve Tripathi, 1984; Gudmundsson ve ark., 1985; Klotz ve ark., 1987) dahil sakkaritlerin varlığını göstermiştir. Bunlar *Acanthamoeba* trofozoitleri için reseptör görevi görebilir ve parazitlerin kontakt lenslere bağlanabilme yeteneğini artırır. Örneğin, *Acanthamoeba* spp., yüzeyinde spesifik olarak mannoz kalıntılarına bağlanan bir mannoz bağlayıcı protein (MBP) taşır. Bu, *Acanthamoeba* türlerinin kullanılmamış kontakt lenslerden ziyade, kullanıma daha yüksek bağlanma sergileme yeteneğini açıklayabilmektedir (Beattie ve ark. 2003). Alternatif olarak, kontakt lenslerde biyofilm oluşumu *Acanthamoeba* spp. için artmış affinite sağlayabilir. Bu, biyofilm içermeyen kontakt lenslerin aksine biyofilm kaplı merceklerle bağlanan *Acanthamoeba* spp. artışıyla gösterilmiştir (Simmons ve ark., 1998; Tomlinson ve ark., 2000; Beattie ve ark., 2003). Ek olarak, biyofilmler, *Acanthamoeba* spp. için besin sağlamanın yanı sıra, kontakt lens depolama/temizleme sırasında *Acanthamoeba* spp. kalıcılığını artırabilir. *Acanthamoeba* spp. bulaşmış bir lens korneanın üzerine yerleştirildiğinde parazitler korneayı istila eder. *Acanthamoeba* türlerinin korneaya yayılması, *Acanthamoeba* spp.'nin virülansına ve korneanın fizyolojik durumuna bağlıdır. Örneğin, birkaç çalışma, in vivo *Acanthamoeba keratiti*nde kornea travmasının bir ön koşul olduğunu ve sağlam korneaları olan hayvanların bu enfeksiyonu geliştirmedeğini göstermiştir (Niederhorn ve ark., 1999).

Bununla birlikte, kornea travmasının ardından kirli suya, toprağa veya diğer vektörlere (kirli nesneler gibi inert cisimler veya biyolojik yüzeyler) maruz kalması yeterlidir ki bu da *Acanthamoeba* keratitine neden olur ve temassız lens kullananlarda *Acanthamoeba* keratitinin en olası nedenidir. Kornea travması, zarar görmüş kornealarda *Acanthamoeba*-reaktif glikoproteinlerin ekspresyonunun, sağlıklı kornealara göre 1,8 kat daha fazla olması, kornea hasarının *Acanthamoeba* enfeksiyonuna katkıda bulunduğunu göstermesi ile açıklanabilir (Sharma ve ark., 1990; Chang ve Soong, 1991).

2.6.1.1. Epidemiyoloji

Başlangıçta nadir görülen bir enfeksiyon olduğu düşünülen *Acanthamoeba* keratitinin, insan sağlığı açısından önemi gittikçe daha fazla bilinmektedir. Bunun sebebi artan farkındalık ve teşhis yöntemlerinin mevcudiyetidir. Son birkaç yılda, kontakt lens kullanıcılarının kornea enfeksiyonları riskinde artış olduğu ortaya çıkmıştır. Örneğin, kontakt lens kullananların, kullanmayanlara kıyasla kornea enfeksiyonuna yakalanma ihtimalinin 80 kat daha fazla olabileceği rapor edilmiştir (Dart ve ark., 1991; Alvord ve ark., 1998). Kontakt lens kullanımında mikrobiyal keratit insidansı, ABD'de yılda 10,000 kullanıcı başına 20,9 olarak belirlenmiştir (Poggio ve ark., 1989). İsveç (Nilsson ve Montan, 1994), İskoçya (Seal ve ark., 1999) ve Hollanda'dan (Cheng ve ark., 1999) benzer sonuçlar bildirilmiştir. Şu anda dünya genelinde kontakt lens kullanan yaklaşık 70 milyon insan olduğu düşünüldüğünde bu sayının artacağı şüphe götürmez bir gerçektir (Barr, 1998). Kontakt lens kullanan insanların sayısı arttıkça, ilgili riskleri değerlendirmek ve hem mevcut hem de yeni kullanıcıları bilinçlendirmek önemlidir. Diğer mikrobiyal ajanlar arasında, *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* gibi bakteriler ve *Acanthamoeba* spp. içeren protozoa, kontakt lens kullanıcılarında kornea enfeksiyonlarının başlıca nedenleridir (Giese ve Weissman, 2002). *Acanthamoeba* keratit insidansı farklı coğrafi bölgeler arasında değişmektedir. Örneğin, Hong Kong'da 10,000 kontakt lens kullanıcısı başına 0,33'lük bir insidans oranı, Hollanda'da 10,000'de 0,05, ABD'de 10,000'de 0,01 (Stehr-Green ve ark., 1989), İngiltere'de 10,000'de 0,19 (Radford ve ark., 2002) ve İskoçya'da 10,000 başına 1,49'dur (Seal ve ark., 1999; Lam ve ark., 2002). Bununla birlikte, bu değişiklikler *Acanthamoeba* türlerinin coğrafi dağılımını yansıtmaz ve büyük olasılıkla yumuşak kontakt lenslerin uzun süreli aşınması, kontakt lenslerin takılması ile ilgili potansiyel risklerin farkında olunmaması,

gelişmiş algılama ve sadece patojen amipler büyümesini destekleyen yerel koşullar nedeniyledir (örneğin su sertliği veya tuzluluk).

2.6.1.2. Klinik semptomlar

Acanthamoeba türlerinin inokulum büyüklüğüne ve kornea travmasının derecesine bağlı olarak semptomların başlaması birkaç gün ile birkaç hafta arasında sürebilir. Enfeksiyon boyunca semptomlar, hastalığın klinik yönetimine bağlı olarak değişebilir. En yaygın *Acanthamoeba* keratiti, gözyaşı, epitel defektleri ve fotofobi ile ilişkilidir. Bu, kızarıklık, stromal infiltrasyon, ödem, stromal opasite ile radial sinir iltihabından dolayı acı verici ağrı, epitelyal kayıp ve görmeyi tehdit edici sonuçları olan stromal apselere yol açar. Diğer semptomlar dağınık subepitelyal sızmaları, anterior üveit, stromal perforasyon ve skleral inflamasyonun varlığını içerebilir. Bakterilere bağlı sekonder enfeksiyon ayrıca hastalığın klinik yönetimini de karmaşıklştırabilir. Glokom sıklıkla bildirilir ve bazen sinir ödemi, optik atrofi ve retina dekolmanı gibi arka segment bulguları görülür. Tedavi edilmeyen gözlerde, nekrotik bölge içe doğru yayıldıkça körlükle sonuçlanabilir (Niederkorn ve ark., 1999).

2.6.1.3. Klinik tanı

Acanthamoeba keratitinin klinik tanısı hem klinik sendromları hem de amip varlığının gösterilmesini içerir (Martinez ve Visvesvara, 1991). Vakaların çoğunda, bu enfeksiyon Herpes simpleks virüsü veya adenovirüs enfeksiyonu olarak yanlış teşhis edilir. Klinik semptomlar yukarıda belirtilmiştir, ancak şiddetli ağrı ile hasta tarafından kontakt lens kullanımı, *Acanthamoeba* keratitinin kuvvetli göstergesidir. Doğrulayıcı kanıt, *Acanthamoeba*'nın kontakt lens kılıfından veya kornea biyopsisinden izolasyonundan gelir. Bu amaçla, birkaç yöntem mevcuttur. Örneğin, *Acanthamoeba* türlerinin kontakt lenslerde, lens kılıfı çözeltisinde veya korneal biyopsi örneklerinde hızlı bir şekilde tanımlanması için ışık mikroskopisi kullanılmıştır (Epstein ve ark., 1986). Winchester ve ark. (1995), *Acanthamoeba* keratitinin teşhisine yardımcı olmak için noninvazif konfokal mikroskopinin kullanıldığını göstermiştir. Konfokal mikroskopi, konvansiyonel optik mikroskopiye göre, önemli miktarda kalınlıktaki bir numunenin içindeki tabakaları görüntüleyebilme avantajına sahiptir. Bu yüzden korneanın görüntülenmesinde etkilidir. Morfolojik özelliklere dayanan bu mikroskobik tanımlamalar beceri ve tanımlama için sağlam anahtarların kullanılmasını gerektirir.

Teşhisi koyacak uzmanlar *Acanthamoeba* türlerinin morfolojik özelliklerini bilmelidir; aksi halde tanı, korneal biyopsi veya keratoplasti ile elde edilen malzemenin histolojik incelemesini gerektirebilir. Ek olarak, *Acanthamoeba* türlerinin hızlı tespiti için 18S rRNA genini kullanan PCR tabanlı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntem oldukça spesifiktir ve beş hücreden daha azını tespit edebilir (Lehmann ve ark., 1998; Khan ve ark., 2001; Schroeder ve ark., 2001). Mikroskopik ve moleküler temelli yaklaşımların geliştirilmesine rağmen, *Acanthamoeba* türlerinin korneal biyopsi örneklerinden veya kontakt lenslerden veya lens vakalarından ekimi, klinik ortamlarda en yaygın kullanılan testtir. Çünkü bu test basit ve ucuz olup santrifüj sırasında hücre kaybı olmaz.

2.6.1.4. Konak duyarlılığı

Önceki çalışmalar *Acanthamoeba* keratitinde konak duyarlılığını açıkça göstermiştir. Örneğin, *Acanthamoeba* keratit modelleri yalnızca domuzlarda ve Çin hamsterlerinde üretilmiş, ancak sıçanlarda, farelerde veya tavşanlarda üretilmemiştir. Bu, spesifik moleküler belirleyicilerin ekspresyonunun bazı memeli türleriyle sınırlı olabileceğini düşündürmektedir (Niederkorn ve ark., 1999). Duyarlı türlerde bile kornea zedelenmesi *Acanthamoeba* keratitinin ön şartı olup sağlam epitel tabakaları olan hayvanlarda *Acanthamoeba* keratiti gelişmemektedir (Niederkorn ve ark., 1999). Kornea zedelenmesinin önemi, *Acanthamoeba* sp. ile kontamine su sıçramasına rağmen, korneanın yüzeyine zarar vermenin kontakt lens kullanmayan bireylerde *Acanthamoeba* keratitine yol açabileceğinin bildirilmesiyle kanıtlanmıştır (Sharma ve ark. 1990; Chang ve Soong, 1991). *Acanthamoeba*-reaktif glikoproteinlerin yüzeyine zarar görmüş kornea epitel hücreleri üzerindeki ekspresyonunun, kornea hasarının *Acanthamoeba* keratitine belirgin bir şekilde katkıda bulunduğunu gösteren normal korneal epitel hücrelerinin yüzeyinden belirgin şekilde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Jaison ve ark., 1998). Ek olarak, bazı kişilerin gözyaşı tabakalarında antiakanthamoebik savunma belirleyici faktörler bulunmayabilir veya korneayı *Acanthamoeba* keratitine daha duyarlı hale getirebilecek hem yüzeyde hem de moleküler düzeyde kornea özellikleri gösterebilir.

2.6.1.5. Risk faktörleri

Acanthamoeba keratitinin ana risk faktörü, kontakt lens kullanımında kötü hijyendir. *Acanthamoeba* keratiti vakalarının %85'inden fazlası kontakt lens kullananlarda görülmektedir. Bu durum bireysel davranış ile ilişkilidir. *Acanthamoeba* keratit en sık

genç erkekler ile ilişkilendirilmiştir (Niederkorn ve ark., 1999). Bu, kişisel hijyen eksikliği, lenslerin veya lens saklama kutularının kötü kullanımı ve bakımı, ev yapımı tuzlu su kullanmak gibi dezenfeksiyon prosedürlerine uyulmamasından kaynaklanıyor olabilir (Brennan, 2002). Yanlış kullanım nedeniyle çizilen veya parçalanmış kontak lensler kullanılmamalıdır. Ek faktörler, kontakt lens takarken yüzme ve gözlerin yıkanması veya kontakt lens temizliği için klor bazlı dezenfektanların kullanılmasıdır. Çünkü *Acanthamoeba* spp., klorine karşı oldukça dirençlidir (Radford ve ark., 1995, 1998; Seal ve ark., 1999). *Acanthamoeba* spp., hidrojel kontakt lenslere kıyasla silikon hidrojel kontakt lenslere konvansiyonel belirgin şekilde daha yüksek bağlanma sergiler (Beattie ve ark., 2003). Bu nedenle, uygun bakım olmadan lenslerin uzun süre kullanımı *Acanthamoeba* keratiti için önemli risk faktörleri olabilir. Genel olarak, bu özellikler bozulmamış korneanın *Acanthamoeba* spp. ile enfeksiyonuna karşı oldukça dirençli olmasına rağmen, kornea travmasının ardından kirlenmiş suya (yüzme, göz yıkama, su sıçramaları), tozlara, bitkisel maddelere veya herhangi bir yabancı partiküle maruz kalmasının *Acanthamoeba* keratitine bağlı önemli risk faktörleri olduğunu göstermektedir. *Acanthamoeba* spp. su, hava, su-hava arayüzü ve toprakta her zaman mevcut olduğundan, duyarlı konaklar, yüzerken veya yıkanırken kontakt lenslerin takılması, ev yapımı tuzlu su ile lenslerin temizlenmesi vb. ile ilgili riskler konusunda uyarılmalıdır (Preston ve ark., 2001; Khan, 2003; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). Kontakt lenslerin uygun şekilde temizlenmesi bu yıkıcı enfeksiyonun önlenmesinde çok önemlidir. *Acanthamoeba* spp., klorine karşı oldukça dirençli olduğu için klor bazlı temizleme çözeltileri kullanılmamalıdır. Fakat %3 konsantrasyondaki iki aşamalı bir hidrojen peroksit sistemi, kistler ve trofozoitlere karşı oldukça etkilidir (Beattie ve ark. 2002). Ek olarak, biyofilm oluşumunu ve kontakt lenslerde karbonhidrat kısımlarının birikmesini azaltmaya yönelik stratejiler ve kontrol önlemleri enfeksiyonun önlenmesine yardımcı olmalıdır.

2.6.1.6. Tedavi

Acanthamoeba keratiti, tedavisi zor bir enfeksiyondur. Erken tanıyı takiben agresif tedavi başarılı bir prognoz için önemlidir (Perez-Santonja ve ark. 2003). Önerilen tedavi rejimi, diamidine (ayrıca brolene olarak da bilinen %0,1 propamidine isethionate ya da Desomedine olarak da bilinen %0,1 hexamidine) ile bir biguanid (%0,02 poliheksametilen biguanid, PHMB veya %0,02 klorheksidin diglukonat, CHX) içerir.

Bakterilerin de enfeksiyonla ilişkili olması ve şüphelenilmesi durumunda, ek olarak antibiyotiklerin kullanımı, yani neomisin veya kloramfenikol eklenmesi tavsiye edilir. İlk tedavi, 2-3 gün boyunca gece ve gündüz saatlik topikal uygulama, ardından 3-4 gün boyunca gündüz saatlik topikal uygulama içerir. Daha sonra, uygulama bir aya kadar gün boyunca olan en fazla 2 saate azaltılır. Bu, önümüzdeki birkaç aydan bir yıla kadar günde altı kez uygulayarak takip edilir ve bu enfeksiyondan kaynaklanan belirgin sosyal ve ekonomik yükler açıkça görülür. Kalıcı şişlik ve şiddetli ağrı, ağrı kesicilerle birlikte %0,1 deksametazon gibi steroidlerin topikal uygulanmasıyla tedavi edilebilir. Bununla birlikte, deksametazonun in vivo bir modelde *Acanthamoeba* keratitinde amip sayılarının çoğalmasında önemli bir artışa neden olduğu belirtilmelidir (McClellan ve ark., 2001). Bu nedenle, steroidlerin uzun süreli uygulaması özenle yapılmalıdır. Bu agresif, karmaşık ve uzun süreli tedavi, *Acanthamoeba* türlerinin sert koşullara hızla adapte olma ve dirençli kist formuna geçme kabiliyeti ve hem trofozoitlerin hem de kistlerin hedefli öldürülmesi için mevcut yöntemlerin bulunmaması nedeniyle gereklidir. Antibiyotiklerin (neomisin veya kloramfenikol) varlığı, olası bakteriyel enfeksiyonu sınırlar veya en azından *Acanthamoeba* spp. için besin kaynağını ortadan kaldırır. Son çare olarak, özellikle ilaca dirençli vakalarda bir keratoplasti belirtilebilir. Kornea hasarlarında rehabilitasyona ulaşmak için penetran keratoplasti durumunda, yukarıdakilerle topikal tedavi ilk önlem olarak önemlidir. Reddetme meydana gelebilir, ancak nadir görülür. Topikal tedavinin postoperatif bir yıla kadar devam etmesinin önerilmesine rağmen enfeksiyonun tekrarı meydana gelebilir, çünkü kistler alıcı korneada hayatta kalabilir (Khan, 2006).

2.6.2. Granülomatöz Amibik Ensefalit (GAE)

GAE, nadir görülen bir enfeksiyon olup neredeyse her zaman ölümcüldür. Patogenezi ile ilişkili mekanizmalar net olmamakla birlikte merkezi sinir sistemini (MSS) içeren patofizyolojik komplikasyonlar büyük olasılıkla proinomatik yanıtların uyarılmasını, kan-beyin bariyerinin ve bağ dokusunun istila edilmesini ve beyin fonksiyon bozukluğuna yol açan nöronal hasarı içerir. Giriş yolları arasında alt solunum yolu bulunur, bu da intravasküler boşluğun amip istilasına neden olur ve ardından hematojen yolla yayılır. Deri lezyonları alt solunum yollarını atlayarak kan dolaşımına doğrudan amip girişini sağlayabilir. MSS'ye amip girişi, büyük olasılıkla kan-beyin bariyeri bölgelerinde meydana gelir (Martinez, 1985, 1991). Deri ve solunum yolu

enfeksiyonları aylarca sürebilir. Ancak MSS'nin katılımı günler veya haftalar içerisinde ölümcül sonuçlara neden olabilir. Ek olarak, koku alma nöroepitelyumu MSS'ye başka bir giriş yolu sağlar ve deneysel modellerde çalışılmıştır (Martinez, 1991; Martinez ve Visvesvara, 1997).

2.6.2.1. Epidemiyoloji

GAE'nin epidemiyolojisi oldukça karışıktır. Bu enfeksiyonun ikincil olması teşhisi zorlaştırır ve dolayısıyla GAE enfeksiyonlarının gerçek sayısını değerlendirmek oldukça güç bir hal alır. HIV hastalarında GAE vakalarının sayısı tam olarak doğru olmamasına rağmen bu enfeksiyonun gerçek yükünü gösterebilir. ABD'de 1981-1996 yılları boyunca HIV/AIDS' den dolayı yaklaşık 350,000 ölüm rapor edilmiştir. 1990'ların ortalarında en yüksek ölüm oranı; 1944'te 49,000, 1995'te 50,000 iken 1996'da bu sayı 39,000'e düşmüştür. Benzer bir süre boyunca HIV/AIDS hastalarında GAE ölümlerinin sayısı yaklaşık 55'ti. Bu yüzden yaklaşık oran ABD'de her HIV/AIDS ölümü başına 1,57 GAE ölümü olarak hesaplanabilir. Buna rağmen aynı anda her yerde bulunması ve artan dış aktivitelerden dolayı daha sıcak iklime sahip ülkelerde GAE enfeksiyonlarının sayısı daha yüksek olabilir (Martinez ve Visvesvara, 1997; Heath ve ark., 1998). Şu anda dünya çapında HIV/AIDS hastalarının sayısı tahmini 40-45 milyon gibi büyük bir rakamdır ve hızlıca artmaya devam etmektedir. Varsayımsal olarak bu sayı GAE'ye duyarlı konakların sayısını temsil eder. Eğer öyleyse, neden GAE enfeksiyonlarının sayısı çok fazla değildir (Khan, 2006). Mevcut birkaç açıklaması olabilir. En azından ABD için HIV/AIDS'den dolayı olan ölümlerin sayısı 1990'ların sonlarından beri azalıyor, örneğin; ABD'de 1997'de 22,000 ölüm ve 2003'te 18,000 ölüm olmuştur. Dolayısıyla GAE'ye duyarlı konakların sayısı azalıyor. ABD'de HIV/AIDS ölümlerindeki bu azalma erken tanıyı takiben yeni antiretroviral tedavilerin yani ilk kez 1996'da tanıtılan yüksek düzeyde aktif antiretroviral tedavinin (HAART) başlamasına dayandırılmaktadır. Bununla birlikte bu tedaviler dünyanın diğer bölgelerinde az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerdeki HIV/AIDS hastalarının çoğunluğu için ulaşılabilir değildir. Bu nedenle bu gibi ülkelerde 10,000 HIV/AIDS ölümü başına 1,57 GAE oranı, GAE enfeksiyonlarının yükünün sadece minimum bir tahminini sağlayabilir. GAE vakaları uzman yokluğu, raporlama problemleri, uygun denetleyen eksikliği ve uygun sağlık sistemlerinin bulunmamasından dolayı gelişmekte olan ülkelerde (özellikle Afrika) bildirilmemektedir (Carter ve ark., 2004; Khan, 2006).

2.6.2.2. Klinik semptomlar

Klinik semptomlar viral, bakteriyel ya da tüberküloz menenjitte benzeyebilmekte olup en sık görülen semptomlar baş ağrısı, ateş, davranış değişiklikleri, kısmi felç, letarji, boyun tutulması, afazi, ataksi, kusma, bulantı, kranial sinir felci, artan kafa içi basıncı, nöbet ve ölümdür. Bunlar şiddetli meningeal irritasyon ve ensefalit ile kanamalı nekroze lezyonlardan dolayıdır. Solunum yolu enfeksiyonu, cilt ülseri veya beyin apsesi olan hastalarda serbest yaşayan amiplerden kaynaklanan enfeksiyonlardan çok ciddi biçimde şüphelenilmelidir. Post mortem muayene sıklıkla şiddetli ödem ve hemorajik nekroz gösterir (Martinez, 1985, 1991). Bu nekrotik fazın aktif olarak trofozoitleri beslemesinden ya da sitokin salınımı gibi inflamatuvar süreçlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı bilinmemektedir. GAE'den dolayı olan lezyonlar, kronik granülomatöz ensefalitis ile sonuçlanan MSS parankiminde karakteristik lezyonlar ile bazal gangliyonlar, orta beyin, beyin sapı ve serebral hemiparezde çok sayıdadır. Granülomatöz cevap hücrel immun yanıtın bozukluğu olarak yorumlanan ciddi şekilde bozulmuş bir bağışıklık sistemine sahip hastalarda bulunmayabilir veya çok az olabilir. MSS'den başka etkilenen dokular derialtı dokusu, cilt, karaciğer, akciğerler, böbrekler, adrenal bezler, pankreas, prostat, lenf düğümleri ve kemik iliği olabilir (Khan, 2006).

2.6.2.3. Klinik Tanı

Hastalığın az görülmesi ve MSS enfeksiyonlarına neden olan diğer patojenlerde sık görülen komplike semptomları nedeniyle GAE'nin tanısı sorunludur. Semptomlar virüs, bakteri ve mantar içeren diğer MSS patojenleri ile benzerdir. Bu, GAE tanısını problemli hale getirir ve onun sebep olduğunu anlamak için altta yatan yüksek bir şüpheyi ihtiyaç duyulur ve uzmanlık gerektirir. Bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme taramaları kullanılarak yapılan beyin görüntü analizleri beyin apsesi veya MSS bozukluklarını düşündüren tümörleri gösteren sinyal yoğunluğu multifokal lezyon alanlarını gösterebilir. BOS bulguları, GAE'yi doğrulayıcı olmasına rağmen, MSS katılımının tanısında değerlidir. Lenfositik üstünlüğe sahip pleositoz, yüksek sayıda polimorfonükleer lökositler, artmış protein konsantrasyonları, azalmış glukoz konsantrasyonları ve minimal bulanıklık ile birlikte önemli bir özelliktir. Viral ve bakteriyel patojenlerin yokluğu GAE'den şiddetle şüphelenilmesini gerektirir.

Parazitlerin düşük yoğunluğundan dolayı bir konakçı immun yanıtının tespiti birincil öneme sahip olmalıdır. Hastanın serumunda yüksek seviyede *Acanthamoeba* spesifik antikorlarının gösterimi şüpheli GAE enfeksiyonu için kullanışlı ve doğru bir yöntem sağlayabilir. Bu dolaylı immunofloresan (IIF) deneyleri kullanılarak gerçekleştirilir. Hastanın serumunun birbirini izleyen seyreltileri sabit amip kaplanmış lamlarla (tercihen GAE enfeksiyonlarına neden olduğu gösterilen T₁, T₄, T₁₂ izolatları) ardından floresin izotiyosiyonat (FITC) etiketli bir antihuman antikor ile üretilir ve florasan mikroskobu altında görselleştirilir. Normal populasyonlarda anti-*Acanthamoeba* antikorlarının seviyelerinin 1:20-1:60 aralığında olabileceğini hatırlamak önemlidir. Bununla birlikte ciddi şekilde bozulmuş bir bağışıklık sistemine sahip hastalar yüksek bir titre geliştirmeyebilir ve bu nedenle doğru tanı için diğer klinik bulgular göz önünde bulundurulmalıdır (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003).

Doğrulayıcı kanıt CSF’de (düşük hızda santrifüjden sonra) veya beyin biyopsisinde amiplerin doğrudan mikroskopik gözlenmesinden gelir ancak morfolojik karakterlerin bilinmesini gerektirir. Giemsa-Wright, akridin turuncu veya kireç rengi beyaz lekeler bu amiplerin morfolojik olarak pozitif temelli tanımlanmasını kolaylaştırabilir. Amiplerin morfolojik karakterlerini bilememenin eksikliği GAE’nin klinik tanısına yardımcı olması gereken etiyolojik ajanı tanımlamak için *Acanthamoeba* karşıtı antiserum kullanan immunohistokimyasal çalışmaları gerektirebilir. Ek olarak daha önce tarif edildiği gibi amip kültürü için birkaç damla BOS ve/veya beyin biyopsisi inokule etmek için faydalıdır. *Acanthamoeba* spp., besin kaynağı olarak bakterilerle beslenir ve numunedeki amiplerin sayısına bağlı olarak trofozoitler birkaç saat içinde gözlenebilir (12 saate kadar). Ancak amiplerin yokluğunda plaklar yedi güne kadar izlenmelidir. Bu yöntem *Acanthamoeba*’yı monositlerden, polimorfonükleer lökositlerden ve makrofajlardan ayırmada problemlerle karşılaşıldığında özellikle faydalıdır. Tartışıldığı gibi PCR tabanlı yöntemler geliştirilmiştir ancak mikroskopi ve kaplama tabanlı analiz tercih edilen yöntemler olmaya devam etmektedir (Cursons ve ark., 1980; Khan, 2006).

2.6.2.4. Konak duyarlılığı

GAE çoğunlukla, HIV enfeksiyonu, diyabet, immunosupresif tedavi, tümörler, yetersiz beslenme ve alkolizmden dolayı bağışıklık sistemi baskılanmış veya güçsüzleşmiş hastalarda görülen ve genellikle ikincil bir enfeksiyon olarak ortaya çıkan nadir bir hastalıktır. Bu, *Acanthamoeba* türlerinin immunokompetan bireylerin immun

sisteminden kaçmaya yetersiz olmasından dolayıdır. Aslında sağlıklı insan serumu alternatif komplement yolunu aktive ederek amip öldürücü faaliyetler sergiler. İlgi çeken, konak immun sisteminden kaçma yeteneğine sahip protozoon parazitler plazma membranı üzerinde özel bir tabaka ya da kapsülü belirten veya alternatif enzim yolunu bloke eden sialik asite sahip olmasıdır. Bununla birlikte *Acanthamoeba* türlerinin plazma membranı sialik asit veya koruyucu bir tabaka veta kapsülden yoksundur ve böylece amip antikordan bağımsız bir yolda komplement sistemi saldırısına maruz kalır. Ek olarak normal populasyonlarda anti-*Acanthamoeba* antikorlarının varlığı bu fırsatçı patojenlere karşı ek koruma sağlar. Genel olarak komplement yolları ve antikorlar nötrofiller ve makrofajlarla birlikte güçlü amip öldürücü faaliyetler gösterir böylece enfeksiyonu baskırlarlar. Bu bulgulardan çıkan sonuç konağın zayıflatılmış bağışıklık durumunun GAE’de genellikle bir ön şart olduğudur ancak GAE’ye yakalanmada konak duyarlılığının temel esası konak etnik kökeni (yani konağın genetik temeli) veya bu patojenlere karşı özel bir immun yanıt oluşturmakta konağın yetersizliği gibi diğer faktörleri içerebileceği için daha fazla çalışma gerektirir (Ferrante ve Allison, 1983; Cursons ve ark., 1980; Khan, 2006). Chappell ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada İspanyol deneklerin T4 izolatlarına karşı seropozitif olma ihtimallerinin Kafkasyalı’lardan 14,5 kat daha az olduğu görülmüştür. Ancak İspanyol’ların *Acanthamoeba* enfeksiyonlarına daha duyarlı olup olmadıkları henüz belirlenmemiştir. Gelecekteki çalışmalar bu ölümcül enfeksiyonların kontrolünde önemli bir rol oynayan doğru konak faktörünü tanımlayacak ve bu duyarlı konakçılar için terapötik girişimlerin gelişimine yardımcı olabilir.

2.6.2.5. Risk Faktörleri

GAE normalde diğer birincil hastalıklar için ikincil bir enfeksiyondur. Bildirilen vakaların hemen hepsi HIV (AIDS hastaları)’den dolayı immun sistemi baskılanmış hastalarda ve lenfoproliferatif hastalıklar, hemotolojik hastalıklar, diabetes mellitus, pnömoni, böbrek yetmezliği, karaciğer sirozu, nezle, farenjit, gammaglobulinem, sistemik lupus eritematozus, glukoz 6-fosfat eksikliği, tüberküloz ve kronik alkolizme sahip bireylerde, hamile kadınlar, yetersiz beslenmiş bireyler, kronik hastalığı olan veya başka şekilde zayıflatılan ya da radyoterapiye maruz kalanlarda meydana gelmiştir. Hastalar immunosupresif tedavi, steroidler ve yoğun antibiyotik tedavi ile organ/doku nakli yapılan hastalarda risk altındadır. Yukarıdaki hastalıklardan muzdarip olan

hastalar için risk faktörleri yüzme havuzları, plajlar veya bahçe toprağı gibi kirlenmiş suya maruz kalmayı kapsar (Khan, 2006).

2.6.2.6. Tedavi

GAE için önerilen tedavi yoktur. GAE'den kaynaklanan vakaların çoğı ölüm sonrası tespit edilir. Bu, *Acanthamoeba* türlerinin birçok amip karşıtı ajana duyarlılığının düşük olmasından dolayıdır ancak daha da önemlisi bu bileşiklerin MSS'de kan-beyin bariyerini geçememesidir. Mevcut terapötik ajanlar serbest yaşayan amiplerden dolayı MSS enfeksiyonlarına etkili olabilen ancak ciddi yan etkilere sahip olan ketokonazol, sulfadiazine, pentomidine isethionate, amphateicin B, azitromisin, itrokonazol ya da rifampinin birleşimini kapsar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar heksadekilfosfokalin gibi alkilfosfokalin bileşiklerin, antiacanthamoeba özelliklerinin yanı sıra kan-beyin bariyerini geçme kabiliyeti sergilediğini ve bu nedenle GAE tedavisinde değerli olabileceğini göstermektedir. *Acanthamoeba* spp. üzerindeki hareketin kesin şeklini belirlemek, uygulama yöntemlerini geliştirmek ve daha da önemlisi bu bileşiklerin in vivo başarısını değerlendirmek için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır. Tedavi ile bile, hayatta kalanlarda işitme kaybı ve görme bozukluğu gibi sakatlıklar gelişebilir (Kotting ve ark., 1992; Walochnik ve ark., 2002).

2.7. ACANTHAMOEBA TÜRLERİ VE BAKTERİ ETKİLEŞİMLERİ

Acanthamoeba türlerinin ilk kez 1954'te bakteri ile enfekte olduğu, parçalandığı ve 1975'te endosimbiyotları olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar *Acanthamoeba* türlerinin patojenik fakültatif mikobakteriler için rezervuar görevi gördüğünü ortaya çıkarmıştır. *Acanthamoeba* türlerinin ayrıca lejyoner hastalığı ile ilişkili öldürücü *Legionella* spp. barındırdığı gösterilmiştir. *Acanthamoeba* spp. ve bakteri etkileşimleri oldukça karmaşık olup amipin virulansı, bakterinin virulansı ve çevre şartlarına bağlıdır. Bu son derece karmaşık ve anlaşılmaz etkileşimlerin sonucu *Acanthamoeba* spp. ya bakterilere yararlı olabilir ya da simbiyotik bir ilişkinin gelişmesi ile sonuçlanabilir. Bu karmaşıklığa ek olarak *Acanthamoeba* türlerinin çeşitli Gram pozitif ve negatif bakterilerle iletişime girdiğı ve bunun çok çeşitli sonuçlara yol açtığı bilinmektedir (Proca-Ciobanu ve ark., 1975; Khan, 2006).

2.7.1. Bakteriyel predatör olarak *Acanthamoeba* spp.

Bu grup *Acanthamoeba* spp. için gıda kaynağı olarak kullanılan bakterileri içerir. Bakteriler fagositozla, ardından fagolizozomlardaki lizis ile alınır. *Acanthamoeba* spp. hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterileri tüketmesine rağmen tercihen *Acanthameba* türlerinin izolasyonunda yaygın şekilde gıda kaynağı olarak kullanılan Gram negatif bakterilerden sıyrılır. Bununla birlikte *Acanthamoeba* türlerinin bakteri tüketme yeteneği bakterilerin virulans özelliklerine ve çevresel şartlara bağlıdır. Örneğin; son zamanlarda yapılan çalışmalar besin yokluğunda *Escherichia coli* K1'in virulent suşlarının *Acanthamoeba* türlerini istila ettiği hücre içinde canlı kaldığını göstermiştir. Aksine *E. coli* K12'nin virulent olmayan suşları besin yokluğunda *Acanthamoeba* spp. tarafından fagosit edilir (onların yerini istila eder) ve öldürülür. Bu, *Acanthamoeba* türlerinin *E. coli*'nin virulans özelliklerine ve çevresel koşullara bağlı olan *E. coli* ile etkileşime girme kabiliyetinde açık farklılıklar olduğunu göstermektedir (Bottone ve ark., 1994; Alsam ve ark., 2005).

2.7.2. Bakteriyel rezervuar olarak *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba türlerinin bakteriyel bir rezervuar olarak işlev yapma kabiliyeti çok dikkat çekmiştir. Çünkü ilişkili bakterilerin çoğu insan patojenidir. Bunlar; *Legionella pneumophila* (Lejnoner hastalığı); *Escherichia coli* O157 (ishale etkeni); *Coxiella burnetii* (Q fever etkeni); *Pseudomonas aeruginosa* (keratit etken,); *Vibrio cholerae* (kolera etken,); *Helicobakter pylori* (gastrik ülser etkeni); *Simkonina negevensis* (pnömoni etkeni); *Listeria monocytogenes* (listeriozis etken,) ve *Mycobacterium avium* (solunum yolu hastalıkları etkeni) türleridir. *Acanthamoeba* türlerinin bu özelliği bu bakteriyel patojenlerin hücre içinde sadece hayatta kalmaları değil onların içinde çoğalmaları nedeniyle de özellikle önemlidir. Bu bakterilerin çevre boyunca yayılmasını, konak savunması ve kemoterapötik ilaçlardan kaçmasını ve hastalık üretmek için yeterli sayıda üremesini sağlar. Uygun koşullardan sonra artan bakteri yoğunluğu konak amiplerini eritir ve yeni amipler enfekte eder ve hastalık yapar. Uzun vadede *Acanthamoeba*-bakteri etkileşimleri genellikle amiplerin ölümüyle sonuçlanarak parazitik olaral kabul edilebilir (Krishna-Prasad ve Gupta, 1978; Ly ve Muller, 1990; Steinert ve ark., 1998; Kahane ve ark., 2001; Greub ve Raoult, 2004).

2.7.3. Bakteriyel truva atı olarak *Acanthamoeba* spp.

Birçok bakteri patojeni için anahtar şartlardan biri, bir konakdan diğerine nakil sırasında zorlu ortamlarda hayatta kalmaktır. Bakteriler hastalık oluşturmak için burun mukozası, akciğer epitel hücreleri veya bağırsak mukozası gibi konak dokularını istila ettiğinde, çapraz biyolojik engellere ve ayrıca doğuştan gelen savunmalara karşı direnç göstermelidirler. Bu amaçla *Acanthamoeba* türleri bakteriler için bir “truva atı” olarak hareket edebilir. “Truva atı” terimi, *Acanthamoeba* spp. içindeki bakteriyel varlığı sadece yüzeye bağlanma/tutunma olabilen “taşıyıcı”ya karşıyı tanımlamak için kullanılır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar *Burkholderia cepacia*’nın (akciğer enfeksiyonu etkeni) *Acanthamoeba* spp. içinde canlı kaldığını ancak çoğalmadığını göstermiştir. Essig ve ark. (1997) *Chlamydomonas pneumoniae* (solunum yolu hastalıkları etkeni) kullanarak benzer bulgular göstermiştir. Bu özellik diğer patojenlerde de gözlenmiştir. Genel olarak bu bulgular *Acanthamoeba* türlerinin bakteriyel aktarımı kolaylaştırdığını ve/veya insan immün sistemine karşı koruma sağladığını göstermektedir. Bunu desteklemek için Cirillo ve ark. (1997) farelerin amiplerin varlığında aşılandıkları zaman *Mycobacterium avium* kolonizasyonunun arttığını göstermiştir. *Acanthamoeba* türlerinin özellikle kist aşaması boyunca zorlu koşullara (aşırı sıcaklıklar, PH ve ozmolarite gibi) dayanma kabiliyeti bakteriyel vektörler olarak faydalı olduklarını gösterir. Özellikle, *Acanthamoeba* kistleri klorine dirençlidir. Bu özellikle gelişmekte olan ülkelerde, bakteriyel patojenlerin halka açık su kaynaklarından yok edilmesinde açık zorluklara yol açmaktadır. Ek olarak, *Acanthamoeba*-bakteri etkileşimleri bakteriyel virulansı da etkilemektedir. Örneğin; *Acanthamoeba* spp.’de yetişen *L. pneumophila*, aksenik olarak yetiştirilen *Legionella* türleriyle karşılaştırıldığında artmış hareketlilik, virulans ve ilaç direnci sergilemiştir.

2.8. ACANTHAMOEBA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ

2.8.1. İzoenzim analizi ve mitokondriyal DNA RFLP

Acanthamoeba türlerinin tanımlanması için izoelektrik odaklanma izoenzimleri uygulanmıştır. İzoenzim şekillerinin çalışmaları (Costas ve Griffiths 1980, 1985; Mathews ve ark., 1983), Pussard ve Pons’un (1977) morfolojik kriterlerine dayanarak önceki türlerin görevi ile tutarlı olmayan diğer *Acanthamoeba* suşları gruplarını önermiştir. De Jonckheere ve ark. (1983), 3-10 pH aralığında agaroz izoelektrik

odaklama (IEF) ile izoenzim modelleri için 15 *Acanthamoeba* türünün 30 suşunu incelemiş ve beş enzimin zimogramlarını karşılaştırarak her türe amip suşlarını atamıştır. Kong ve ark. (1995), morfolojik olarak *Acanthamoeba polyphaga*'ya atanan yedi *Acanthamoeba* suşu arasında izoenzim profillerinin suş arası polimorfizmini gözlemlemişlerdir. Bir *Acanthamoeba* türü içinde önemli zimogram çeşitliliği belirtildiğinden, tek başına izoenzim çalışması türlerin tanımlanması için tamamen yeterli görülmemektedir.

Acanthamoeba taksonomisi için mt-DNA RFLP analizi de uygulanmıştır. Bogler ve ark. (1983), 13 suşun analizinden sonra *Acanthamoeba* suşlarının çoğunun mt-DNA'nın farklı fragman modellerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Yagita ve Endo (1990), ayrıca *Acanthamoeba castellanii* veya *A. polyphaga* olarak tanımlanmış 8 izolatu analiz etmiş ve farklı *A. castellanii* türleri arasında Mt-DNA sindirim fenotiplerinin değişkenliğini bildirmişlerdir. Kong ve ark. (1995), *A. polyphaga* ve *A. castellanii*'nin sindirim fenotipindeki değişkenliği doğrulamışlardır. *Acanthamoeba* türlerinin mt-DNA'sının suş arası sekans çeşitliliğine gelince, diğer araştırmacılar da benzer sonuçlar bildirmiştir (Byers ve ark., 1990; Kilvington ve ark., 1991; Gautom ve ark., 1994). Mt-DNA RFLP türlerinde ve alloenzim profillerinde derin suş arası çeşitliliği göz önüne alındığında, Kong ve ark. (1995) ve Chung ve ark. (1998), her iki analizin de türlerin tanımlanması yerine türlerin tanımlanması, farklılaşması ve karakterizasyonu için kullanılması gerektiğini önermişlerdir.

2.8.2. Küçük alt ünite ribosomal RNA kodlama DNA-RFLP (Riboprinting)

Acanthamoeba türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin (riboprinting) PCR-bazlı DNA sekans analizleri *Acanthamoeba* türlerinin farklılaşması için ümit verici sonuçlar göstermiştir (Chung ve ark. (1998). PCR için primerlerin dizisi, ökaryotik SSU rRNA'nın yüksek oranda korunan dizilerde hibritleşmek üzere tasarlanmıştır (Bhattacharya ve ark., 1998). Riboprinting ile alt tür düzeyinde sınıflandırma için 18 (neo) tip soyları içeren 23 referans *Acanthamoeba* suşunu analiz etmişlerdir. Riboprinting dendrogramı, kistlerin morfolojik özelliklerine dayanarak Pussard ve Pons (1977)'un gruplandırılması ile iyi bir şekilde uyuşmuştur. Khan ve Paget (2002), İngiltere'den klinik ve çevresel izolatları tanımlamak için benzer yöntemler uygulamıştır. Riboprinting, numunelerin DNA sekansını elde etmek için sınırlı koşullar

altında klinik ve çevresel numunelerden *Acanthamoeba* izolatlarının hızlı tanımlanması için uygulanabilir.

2.8.3. 18S rRNA dizi analizi

Byers ve ark. (1990) morfolojik olarak belirlenmiş 18 izolatı ve 35 yeni izolatı içeren 53 suşlu bir gruptaki 18S rRNA dizi varyasyonunun incelenmesinden sonra, 12 genotip önermişlerdir (T1-T12). 18S rRNA dizi analiziyle filogeni içerisinde 3 morfolojik grup açıkça ayırt edilmiştir. Morfolojik grupların her biri birkaç farklı dizi türünden oluşur. Morfolojik grup I'de *Acanthamoeba astronyxis* için T7, *Acanthamoeba tubiashi* için T8 ve *Acanthamoeba comandoni* için T9 olmak üzere üç tür tanımlanmıştır. Grup 3'te *Acanthamoeba culbertsoni* T10 ve *A. healyias* T12 ve *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba pustulosa* ve *Acanthamoeba lenticulata* sırasıyla T1, T2 ve T5 olarak tanımlanmışlardır. Diğer 3 tip, T3, T4 ve T11 grup 2'ye dahil edilmiştir; *Acanthamoeba griffinii* için T3 ve *Acanthamoeba hatchetti* ve *Acanthamoeba stevensoni* için T11. En büyük soy olan T4 kalan tüm grup 2 izolatları içerir. Bununla birlikte, bu sistem tarafından, T4 içindeki tüm oranlar arasındaki ilişki açıkça tanımlanmamıştır. T4'teki suşlar, 18S rRNA sekansları kullanılarak tamamen çözülemeyecek kadar yakındır. T4'teki çeşitli türlerin tümü *A. castellanii* olarak yeniden sınıflandırılabilir, çünkü dizi tipi bu türlerin tip suşunu içerir.

Her ne kadar 18S rRNA dizi analizi ile filogenisi, türlerin T4 dizi tipinde ayırt edilmesinde bir sınırlama olsa da türlerin tanımlanması için klinik veya çevresel numunelerin sınıflandırılmasında bu gen bölgesi oldukça pratiktir. Şu anda klinik numuneden veya ortamdan yeni bir *Acanthamoeba* izolatı tanımlanması esas olarak 18S rRNA sekans analizi ile gerçekleştirilmektedir (Schroeder ve ark., 2001; Yu ve ark., 2004; Lee ve ark., 2006).

Klinik veya çevresel izolatların çoğu, 18S rRNA dizisi tip T4'e ait olduğundan, birçok araştırmacı, *A. castellanii* gibi önceden adlandırılmış türler durumunda bile, bir izolatı, onların genotipleri gibi bilimsel isimlerden sınıflandırmayı tercih etmektedir. T4 genotipindeki suşları bir tür kompleks veya diğer moleküler özelliklere dayanan birkaç tür olarak tanımlamak gereklidir (Schroeder ve ark., 2001; Yu ve ark., 2004; Lee ve ark., 2006).

2.8.4. Mitokondriyal 16S rRNA dizi analizi

Acanthamoeba izolatları arasındaki filogenetik ilişkide olan taksonomik bir araç olarak mitokondriyal küçük alt birim rRNA geni (mt-SSU rRNA) analizinin değeri de değerlendirildi (Yu ve ark., 1999; Ledee ve ark., 2003). Mt-RNA, *Acanthamoeba* spp. gibi mitokondri ökaryotik hücrelerin içindeki bir moleküler klondur. Mt-SSU rRNA'nın değeri intron olmayışı ve nükleer ssu rDNA'dan daha küçük ve daha tutarlı olmasıdır. Ledee ve ark. (2003) 68 izolatın Mt-SSU rDNA dizilerini analiz etmiş ve bir filogenetik ağaç yapmıştır. Mt ssu rDNA analizi ile nükleer rDNA genleri ile yapılan benzer genotip kümelemesi, bu kümelemenin *Acanthamoeba* spp. filogenisinde ana dalları temsil ettiğini göstermiştir. Dahası, T4 genotiplerinin sekiz gruba alt gruplanmasına dayanarak, Mt-SSU rDNA dizisinin, türlerin bu genotip ile ayırt edilmesi için mevcut en iyi moleküler baz olarak hizmet edebileceğini önermişlerdir.

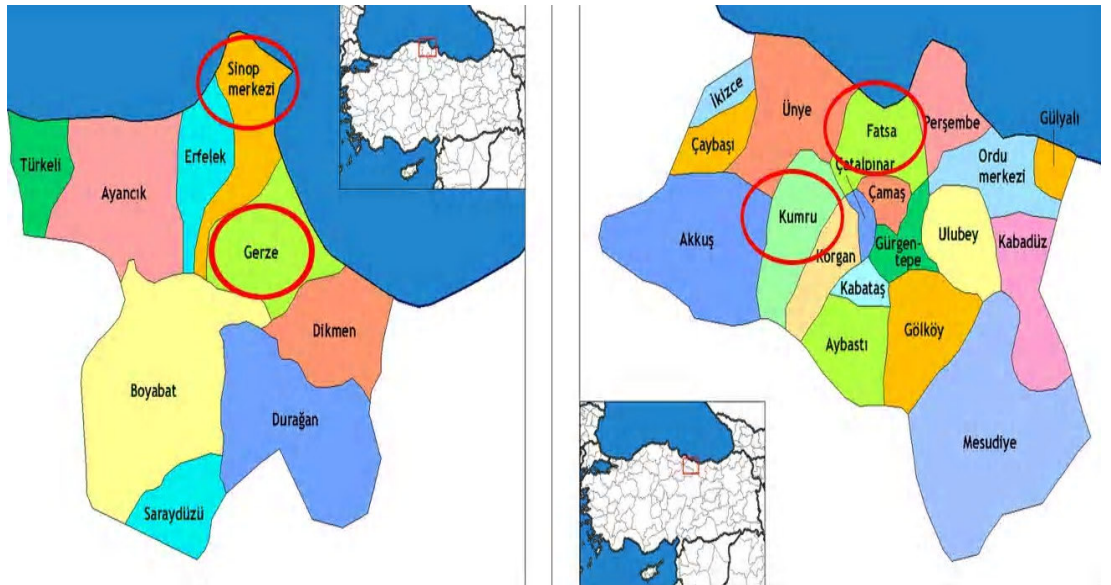


3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1. Araştırma Sahası ve Su Örneklerinin Toplanması

Çalışma, Aralık 2018 ve Haziran 2019 tarihleri arasında Sinop'un Merkez ve Gerze ilçeleriyle Ordu'nun Fatsa ve Kumru ilçelerindeki (Şekil 3.1.) çeşme suyu, havuz suları, kaplıca ve göllerden toplanmış toplam 80 örnek üzerinde yürütüldü (Şekil 3.2). Her örneğin üzerine örneğin hangi bölgeden alındığı ve tarihi yazıldı. Toplanan örnekler uygun şartlarda laboratuvara intikal ettirildi.



Şekil 3.1. Araştırma sahaları

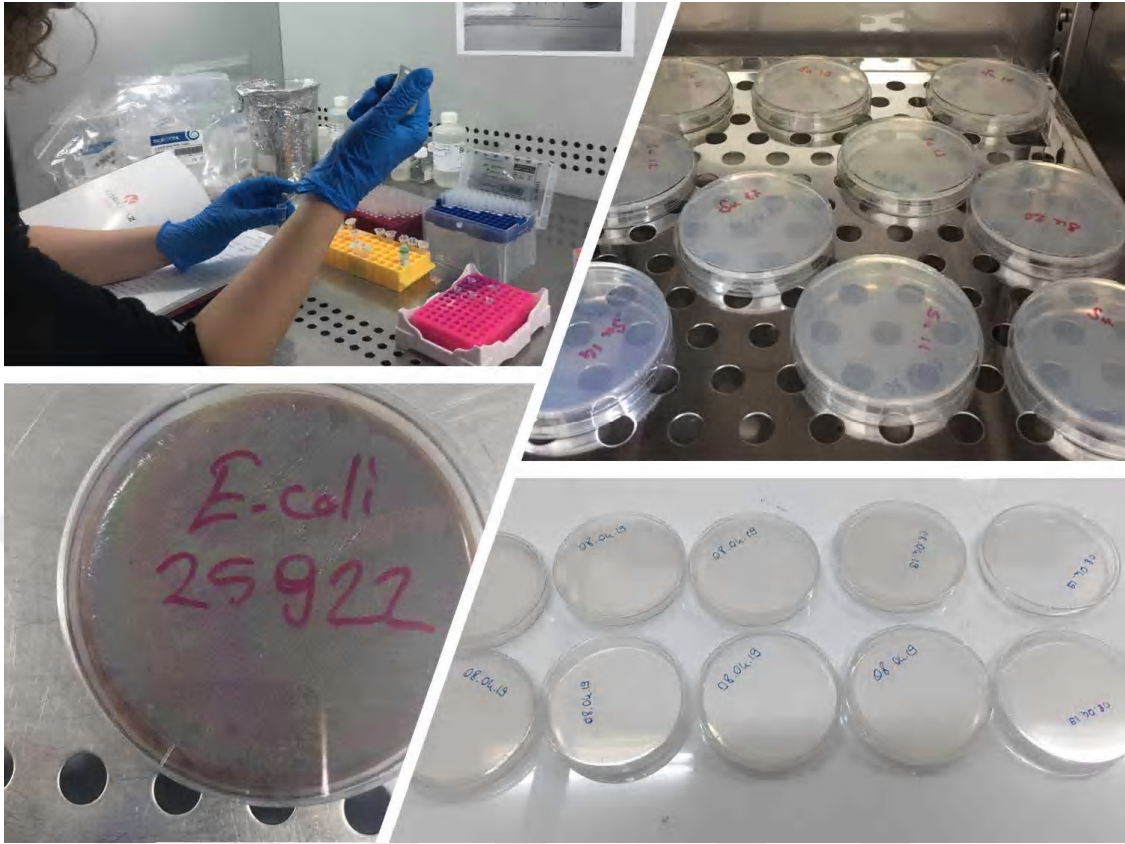


Şekil 3.2. Su örneklerinin alınması (Orijinal)

3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Örnekler İçin Besi Yeri hazırlanması ve Kültür İşlemi

Sahadan toplanan su örneklerinin kültür ortamında üretilmesi için besi yeri hazırlanması işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla 12 gr agar (American Bacteriological Agar) 500 ml'lik distile su içerisine eklendi ve karıştırılarak süspansiyon elde edildi. Elde edilen karışım yaklaşık 121°C 'de 20 dk süresince otoklavlandı. Boş petri kapları sterilizasyon amacıyla iki saat boyunca yaklaşık 100°C 'de ısıya maruz bırakıldı. Otoklavlanan karışım bu petrilere döküldü. Dökülen petri kapları 4°C 'ye kaldırılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün ekim gerçekleştirilmeden önce besi yerlerine *E. coli* sürüldü. Pastör pipetiyle alınan örnekler besleyici değeri olmayan non-nutrient agar (NNA) besiyerine ekilerek 28°C 'lik etüvün içerisinde 10 gün inkübasyona bırakıldı. Katı besiyerinde üreme gözlenen bölgelerden agar kesilerek alındı ve 60°C 'de tamamen çözünmesi beklendi. Çözündükten sonra 15,000 rpm'de santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı atıldı ve dipteki kısım DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Besi yeri hazırlama ve kültür hazırlama prosedürleri (Orijinal)

3.2.2. Genomik DNA izolasyonu

Su örneklerinden *Acanthamoeba* DNA'larının ekstrakte edilmesi amacıyla AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kiti (AP-MN-MS-GDNA-250, Axygen Biosciences, USA) kullanılmış ve kit prosedürü uygulanmıştır:

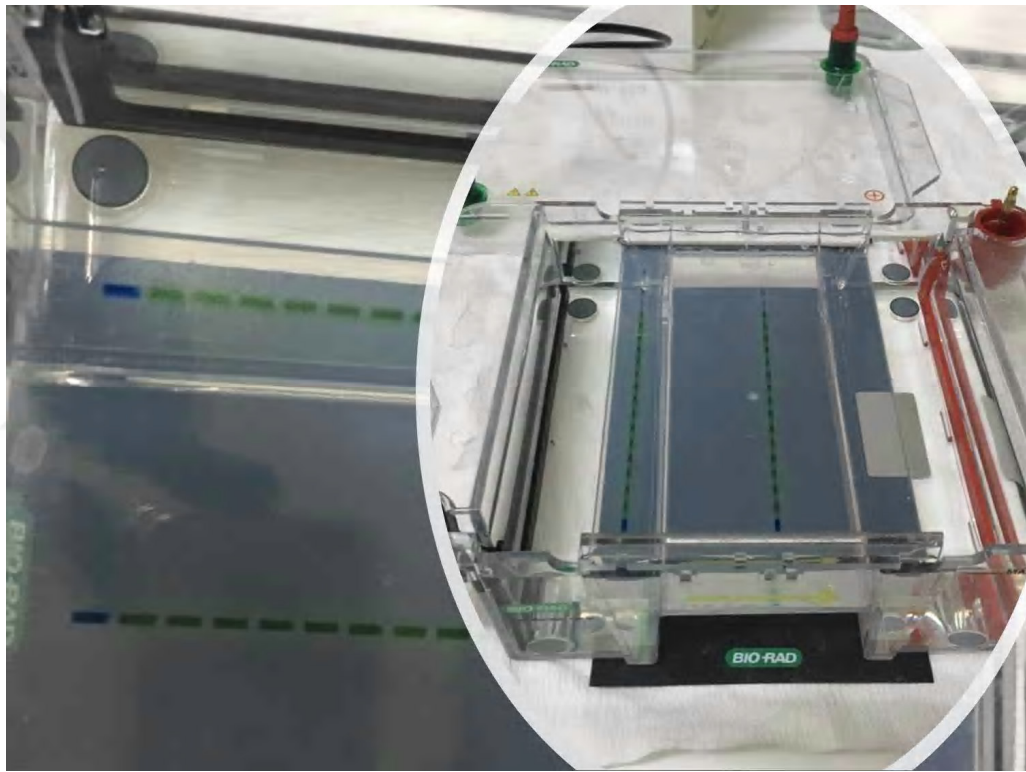
- i. Ependorf tüplerinin dibinde kalan tortu üzerine 350 µl PBS (phosphate-buffered saline) ve 0,9 µl RNase A ilave edilmiş ve 30 sn yumuşak hareketlerle hafifçe çalkalama hareketi yapıldı.
- ii. 350 µl homojenat 2 ml'lik yeni ve kit içerisinde bulunan ependorf tüp içine aktarıldı.
- iii. Bu tüpe 20 µl Proteinase K ve 150 µl Buffer C-L ilave edilip 1 dk vortekslendi.
- iv. Tüpler 56°C'de 15 dk süresince su banyosuna koyuldu.
- v. Tüplerin içine 350 µl Buffer P-D eklenip 30 sn vortekslendi.
- vi. 14,000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi.

- vii. Örnekler için 2 ml'lik ependorf tüplerine miniprep kolon yerleştirildi. Santrifüj sonrası üstteki süpernatant alınarak miniprep columnlar içerisine konulup 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- viii. Dipteki kısım döküldü ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi ve içlerine 500 µl Buffer W1 ilave edilip 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- ix. Süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırıldı. Miniprep kolonlar içerisine 700 µl of Buffer W2 ilave edilip 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve bu işlem 2 kez tekrar edildi.
- x. Yıkama sonucu dipteki sıvı uzaklaştırılıp miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirildi. Boş tüpler 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilip etanolün tamamen uçması sağlandı.
- xi. Miniprep columnlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. İçine 65°C'lik su banyosunda ısıtılan eluent (100 µl) ilave edilip oda sıcaklığında 1 dk bekletildi. Takiben 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj sonrası genomik DNA elde edildi.
- xii. Genomik DNA örnekleri Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenip DNA miktarları belirlendi ve DNA konsantrasyonlarına göre en uygun sulandırılmalar hazırlandı.
- xiii. DNA'lar kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Genotiplendirme ve Filogenetik Analizler İçin 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Elektroforezi

Acanthamoeba DNA örneklerinin, 18S rRNA gen bölgesini çoğaltan JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTACCGTGAA-3') ve JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3') primerleriyle (Schroeder ve ark., 2001) PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır: 2,5 µl 10X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0,4 µM her bir primer, 0,2 mM her bir dNTP, 2U Taq DNA polimerase ve 2 µl template DNA. Termal profil ön denatürasyon: 94°C'de 5 dk; 40 siklus, denatürasyon 94°C'de 1 dk, yapışma 60°C'de 1 dk, uzama 72°C'de 1 dk ve final uzama 72°C'de 5 dk olarak ayarlanmıştır (Schroeder ve ark., 2001).

PCR analizlerinde kontaminasyon riskine karşı pozitif kontrol olarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğretim elemanı Araş. Gör. Mehmet AYKUR ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim elemanı Araş. Gör. Dr. Miray ONAN'dan temin edilen DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise steriliz su kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jelde koşturulmuş (Şekil 3.4) ve CLP Jel Dökümantasyon Sistemiyle (UVP INC Uplant, CA) görüntülenmiştir.



Şekil 3.4. Elektroforez tankına amplikonların yüklenmesi basamağı (Orijinal)

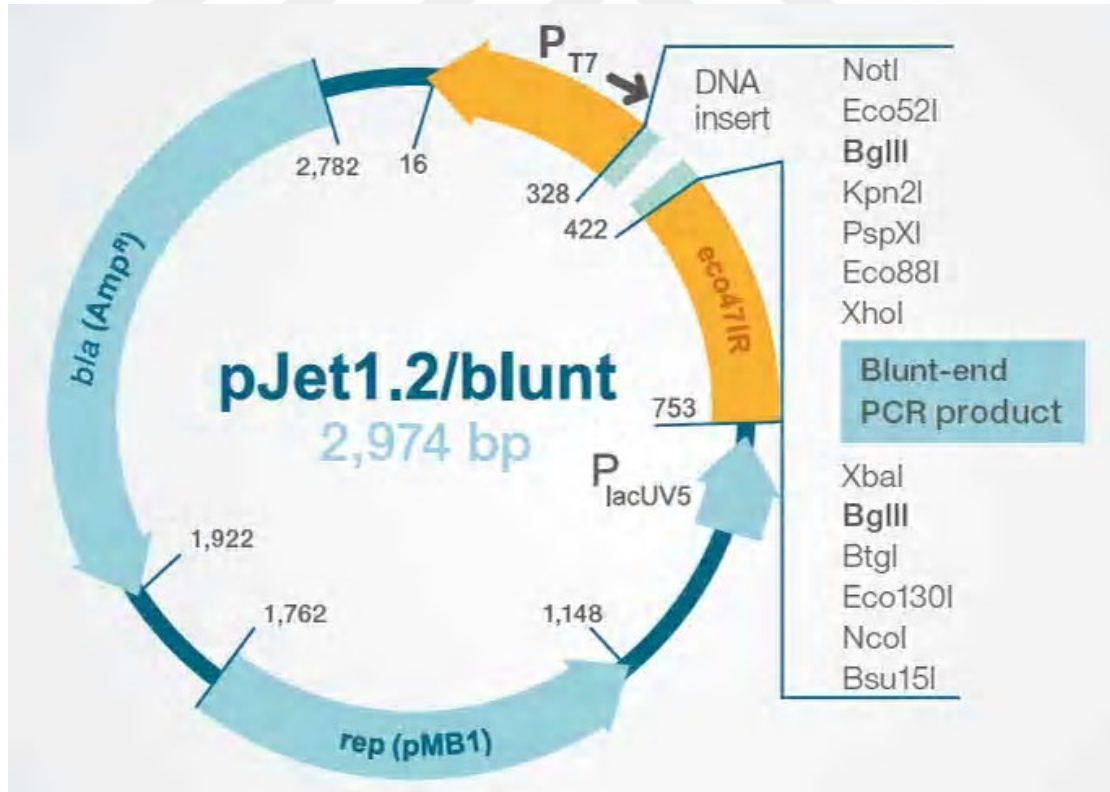
3.2.4. 18S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid İzolasyonu

18S rRNA gen bölgesi yönünden pozitif bulunan izolatlardan seçilen amplikonlar ilgili gen bölgelerinin kayıpsız sekansının elde edilebilmesi amacıyla klonlanmış ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulmuştur.

3.2.4.1. Ligasyon basamağı: PCR ürünlerinin klonlanmasında CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama basamağı üretici firmanın prosedürleri kapsamında gerçekleştirilmiştir:

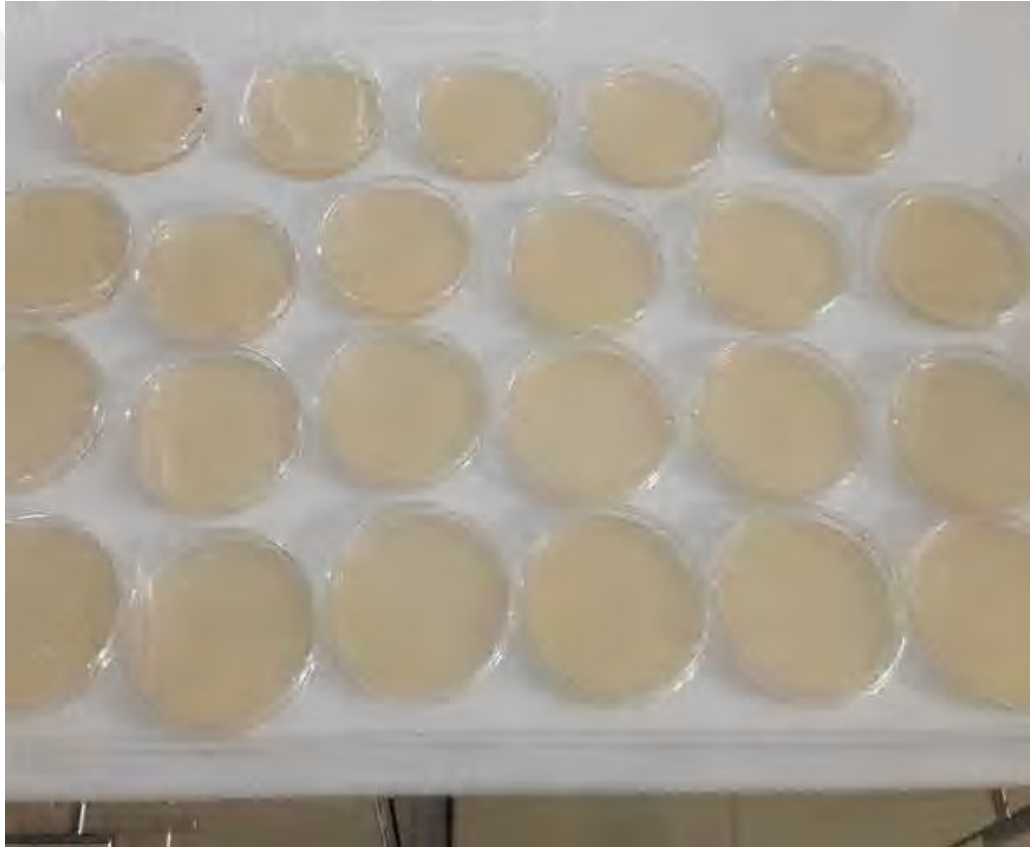
2X Reaksiyon buffer	10 µl
PCR ürünü Jel Pürifiye Örnek	2 µl
DNA Blunting enzim	1 µl
Steril Deiyonize Su	5 µl
Toplam	18 µl

Yukarıda gösterildiği miktarlarda hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 70°C’de su banyosunda 5 dk inkübe edilip hemen buz üzerine alınmıştır. Karışıma sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/µl) ve 1 µl T4 DNA ligaz eklenip son hacim 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Karışım 22°C’de 30 dk bekletilip bu karışımın 5 µl’si transformasyon basamağı için kullanılmıştır. Klonlama basamağında kullanılan pJET1.2/blunt klonlama vektör haritası Şekil 3.5’de verilmiştir.



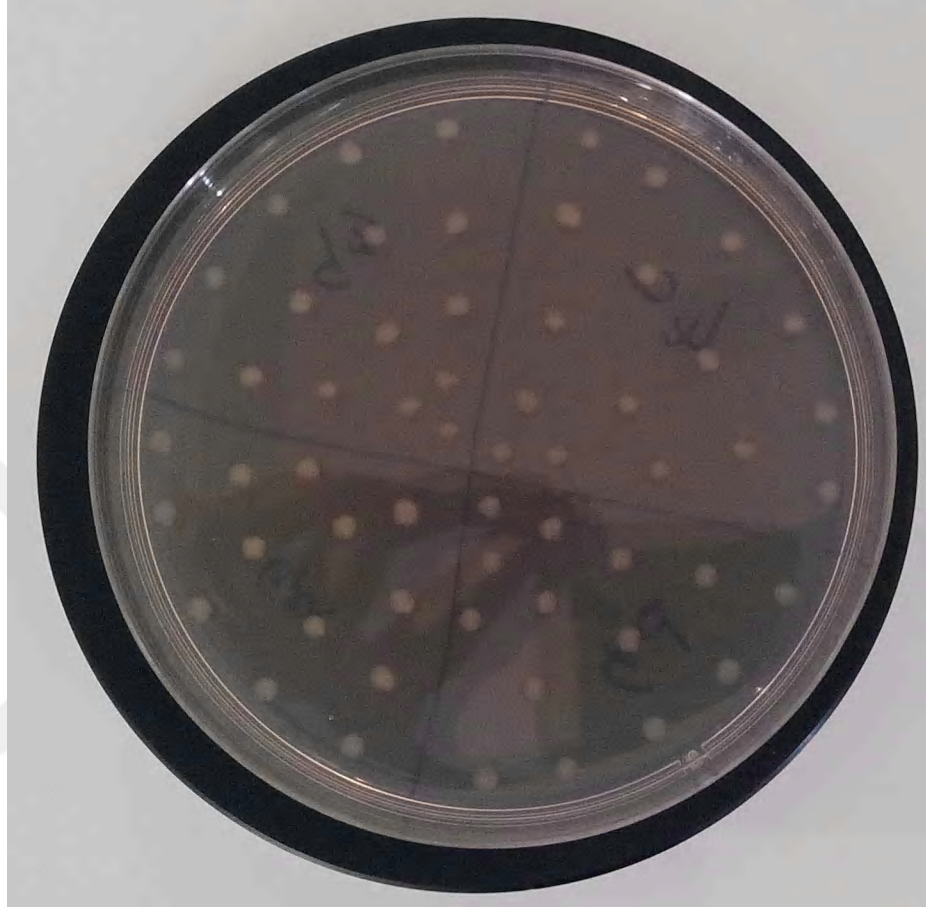
Şekil 3.5. pJET1.2/blunt klonlama vektörü

3.2.4.2. Transformasyon Basamağı: 5 µl'lik ligasyon ürünü buz üzerindeki 100 µl OneShot TOP 10 *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) eklenip 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra karışım 42°C'de 1 dk bekletilip hemen takiben buz üzerinde 3 dk bekletilmiş ve rekombinant plazmidin transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışım üzerine oda ısısında bekletilen 250 µl S.O.C. medium (%2 Tryptone, %0,5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glikoz) eklenmiştir. 37°C'de 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı daha sonra LB (lysogeny broth) katı besiyerine (Şekil 3.6) ekilip bir gece boyunca 37°C'lik çalkalıyıcılı inkubatörde inkubasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.6. LB katı besi yeri hazırlama basamağı (Orijinal)

LB katı besi yerinde koloni gelişimini (Şekil 3.7) takiben besi yerindeki koloniler yeni bir besi yerine tekrar ekilmiştir. Besi yeri 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.7. LB katı besi yerinde üreyen kolonilerin görünümü (Orijinal)

3.2.4.3. Koloni Screening PCR: LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini saptamak amacıyla koloni PCR analizi yapılmıştır. Koloni PCR için 10 µl I Taq master mix (Bio-Rad Hercules, CA, ABD), 0,4 µl pJET1.2 forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') ve pJET1.2 reverse (5'-AAGACATCGATTTTCCATGGCAG-3') primerleri ile karışım hazırlanmıştır. Bu karışımlara katı besi yerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler nakledilmiştir. Karışımlar steril deiyonize su ile toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. PCR basamağında, ön denatürasyon 95°C’de 3 dk 25 siklus, denatürasyon 94°C’de 30 s, bağlanma 60°C’de 30 s, uzama 72°C’de 1 dk ve final uzama 72°C’de 10 dk protokolü uygulanmıştır. Amplikonlar %1,5’luk agaroz jelde yürütüldükten sonra UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4.4. PCR Tarama ile Transformasyonu Doğrulanmış Kolonilerin Sıvı Besi

Yerinde Çoğaltımı: LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler steril flasklar, içinde 100 µl/ml ampisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerlerine ekimi yapılarak 37°C'de 110 rpm'de çalkalayıcıda bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besiyerlerinden alınan örnekler 2 ml'lik ependorflar içerisine alınarak 6,000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp pelletler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.5. Rekombinant Plazmidlerin Saflaştırılması: Hücresel peletlerden plazmid izolasyonu amacıyla AxyPrep Plazmid Miniprep (Axygen, ABD) ve GeneJET Plazmid Miniprep (Thermo Scientific, ABD) kitleri kullanılmış ve kit prosedürü takip edilmiştir:

- i. -20°C'den alınan pelet oda sıcaklığında çözündürüldü ve içine 250 µl Buffer S1 eklenip vortekslendi.
- ii. 250 µl Buffer S2 eklenip birkaç kez hafifçe çalkalandı.
- iii. Üzerine 350 µl Buffer S3 eklenip yine hafifçe birkaç kez çalkalandı ve karışım 12,000 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- iv. Süpernatant alınıp AxyPrep Plazmid Miniprep column içine konuldu ve 12,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- v. Alttaki tüpe süzülen sıvı boşaltılıp üstteki miniprep column tekrar aynı toplama tüpü içine konuldu.
- vi. Miniprep columnlar üzerine 500 µl Buffer W1 ilave edilip 12,000 g'de 1 dk santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- vii. Altaki sıvı uzaklaştırılıp miniprep column aynı toplama tüpü içine konuldu.
- viii. Üzerine 700 µl Buffer W2 eklenip 12,000 g'de 1 dk santrifüj edilerek işlem iki kez tekrarlandı.
- ix. Süzülen sıvı tekrara uzaklaştırılıp miniprep column yeni 2 ml'lik ependorf tüp içerisine yerleştirildi. Buffer W2'yi uzaklaştırmak için 12,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

- x. Miniprep column temiz bir 1,5 ml'lik tüp içerisine yerleştirilip üzerine 60 µl eluent eklendi ve oda ısında 1 dk beklendikten sonra 12,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- xi. Santrifüj sonrası 1,5 ml'lik tüp içine süzülen sıvı plazmid DNA'sı -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.4.6. Restriksiyon Enzim ve PCR Analizleri:

Miniprep kitlerle saflaştırılan rekombinant plazmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için Aval ve XbaI (Thermo Scientific, ABD) enzimleri kullanılmıştır. Elde edilen plazmid DNA'sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

Su	14 µl
10X FastDigest® buffer	2 µl
DNA	4 µl
FastDigest® enzyme	1 µl
Toplam	20 µl

Karışım vortekslenerek ve 37°C'de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra termal inaktivasyon için 65°C'de 5 dk su banyosunda tekrar inkübe edilmiştir. Takiben, örnekler %1,5'luk agaroz jelde yürütüldükten sonra CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile UV ışın altında görüntülenip klonlanan genin varlığı yönünden analiz edilmiştir. Bunun yanında ikinci bir doğrulama analizi yapılmıştır. Bu amaçla plazmid DNA'ların amplifikasyonu pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerlerinin kullanıldığı PCR analizleri ile yapıldıktan sonra elde edilen ampikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülerek ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile UV ışın altında görüntülenmiştir.

3.2.5. Sekans ve Filogenetik Analizler

Hedef 18S rRNA gen bölgesini ihtiva eden rekombinant plazmid DNA'lar, pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious R10 (Kearse ve ark., 2012) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları yapılarak, vektör nükleotid dizisi içerisinde, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenerek izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların Geneious R10 yazılımı (Kearse ve ark., 2012) üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması ve mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılarak moleküler karakterizasyonları sağlanmıştır ve akabinde GenBank veri tabanına kayıtları yapılmıştır. Çalışmada karakterize edilen izolatlarda DNA polimorfizmi ve haplotip yapısının belirlenmesinde DnaSP 5.10.01 (Librado ve Rozas, 2009) yazılımı kullanılmıştır. Intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar Kimura two-parameter (K2P) uzaklık modeli (Kimura, 1980; Nei ve Kumar, 2005) kullanılarak MEGA 7 yazılımında (Kumar ve ark., 2016) gerçekleştirilmiştir. *Acanthamoeba* türlerinin filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun substitution modelin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) ve en düşük AIC (Akaike Information Criterion) değerine sahip belirlenen modeller filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyon Sonuçları

Sinop ve Ordu yörelerinden toplanarak kültür ortamında üretilen su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin çoğaltan JDP1-JDP2 primerleri ile yapılan amplifikasyonları sonucu yaklaşık 423-530 bp uzunluğu arasında band elde edilen örnekler pozitif olarak kabul edildi. Konvansiyonel PCR analizleriyle incelenen 80 su örneğinde tespit edilen *Acanthamoeba* türlerinin dağılımı Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. İncelenen su örneklerinde *Acanthamoeba* prevalansı

Örnekleme Bölgesi	Örnek Sayısı	Pozitif Örnekler (n/%)
Sinop/Merkez	21	2 (%9,5)
Sinop/Gerze	14	4 (%28,6)
Ordu/Fatsa	26	5 (%19,2)
Ordu/Kumru	19	4 (%21,1)
Toplam	80	15 (%18,8)

Tablo 4.1’de de görüldüğü üzere incelemesi yapılan 80 su örneğinin 15’inde (%18,8) *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Sinop yöresinden toplanan 35 örneğin 6’sında (%17,1), Ordu yöresinden toplanan 45 örneğin ise 9’unda (%20) *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Her iki bölgeden toplanan su örneklerinde toplam pozitiflik %18,8 olarak belirlenmiştir.

PCR analizleri sonucu *Acanthamoeba* pozitif belirlenen bazı izolatların 18S rRNA geninin parsiyel amplifikasyonu (450 bp) sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Acanthamoeba* izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 4, 6, 9-12, 14: Pozitif örnekler; 1-3, 5, 7, 8, 13: Negatif örnekler; 15: Pozitif kontrol; 16: No DNA

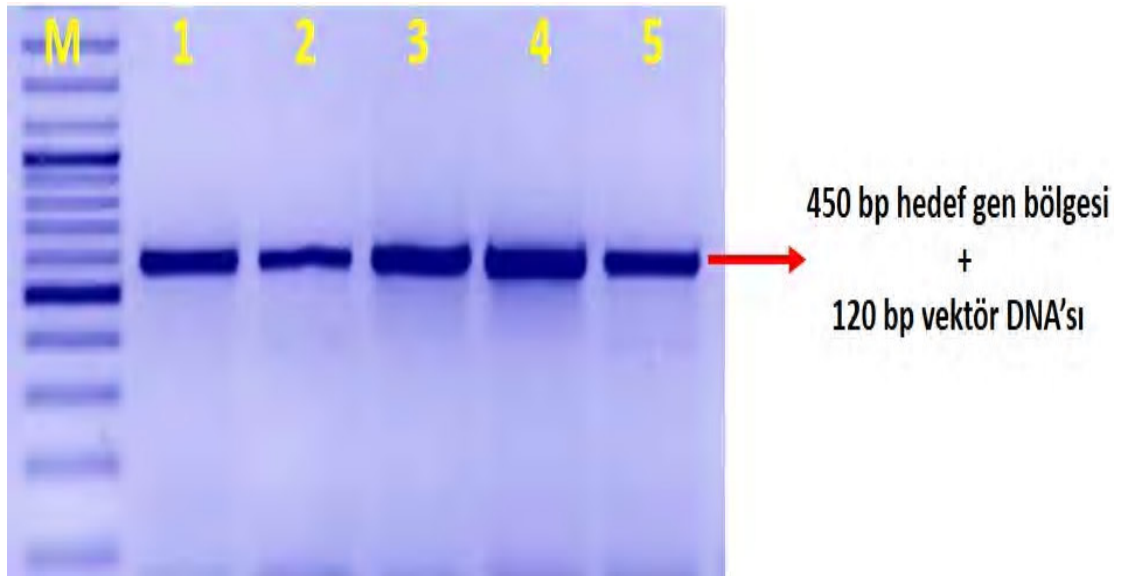
4.2. 18S Gen Bölgesinin Klonlama Sonuçları

Sekansların kayıpsız elde edilebilmesi için Sinop ve Ordu yörelerindeki su örneklerinden elde edilen 15 *Acanthamoeba* izolatı klonlanmıştır. Bu amaçla ilgili izolatların PCR'ı sonucu elde edilen amplikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak pürifiye edilmiştir. Pürifiye örnekler CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne insertü sağlanarak ligasyon ürünü *E. coli* TOP 10 kompetan hücrelere transforme edilmiştir. Bir gece inkubasyon sonrası ampisilinli LB besi yerinde oluşan koloniler Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler

LB katı besi yerinde üreme gösteren kolonilerden tek koloni seçilmiş ve transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla tekrar LB katı besi yerine ekilmiştir. Tekrar üreyen bu kolonilerde hedef gen bölgesinin vektöre insert olduğu ve transformasyon etkinliği vektör spesifik primerler kullanılarak yapılan koloni PCR sonucu teyit edilmiştir. 18S rRNA gen bölgesinin koloni PCR sonuçları Şekil 4.3’de gösterilmiş olup bu gen bölgesine ait DNA’ların vektörlere başarılı bir şekilde insert olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3. Transforme hücrelerde 18S gen bölgesinin koloni PCR’ı sonucu ampliconların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1-5: İnsert 18S gen bölgesi

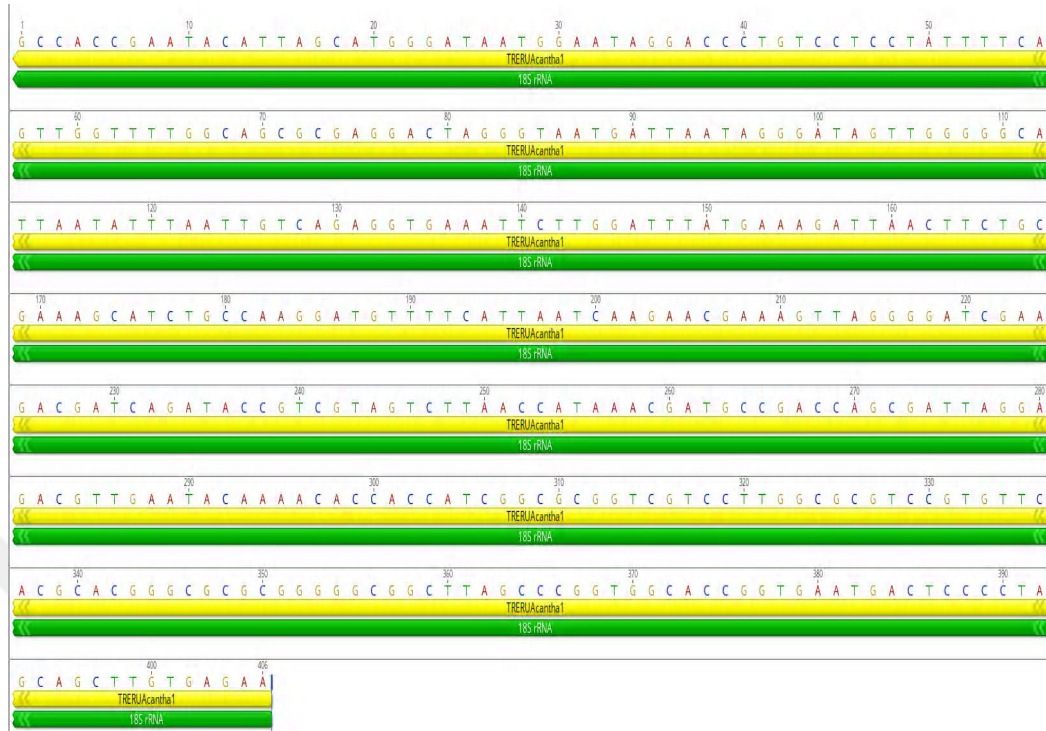
Koloni PCR sonuçlarını takiben pozitif belirlenen tek bir koloni seçilip sıvı besiyeri yerine aktarılmıştır. Bir gece 37°C’de inkubasyonu takiben üreyen transforme hücreler santrifüj ile çöktürülüp bu hücrelerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmidler, *Aval* ve *XbaI* (Thermo Scientific) restriksiyon enzimleri ile kesilip klonlanan genin varlığı yönünden teyit edilmiştir.

4.3. 18S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analizleri

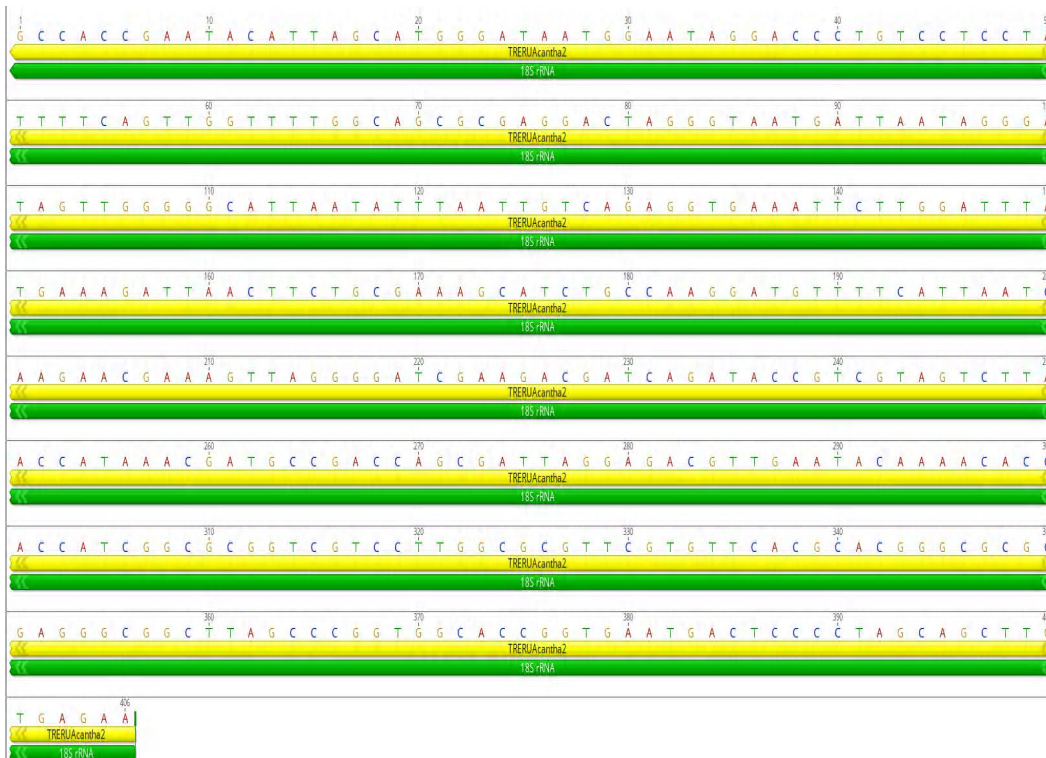
Elde edilen plazmidler vektör spesifik primerlerle çift yönlü sekanslanmıştır. Nükleotid dizileri vektör sekansı ile alignment yapılmış ve 18S rRNA gen bölgesinin sekansları elde edilmiştir. *Acanthamoeba* izolatlarından %100 identik olanlardan sadece bir tanesinin GenBank kaydı gerçekleştirilmiştir. İlgili sekanslar GenBank veri tabanında Blastn analizlerine tabii tutularak moleküler identifikasyonları sağlanmış ve filogenetik analizler için elde edilen izolatlara ait sekansla birlikte Türkiye ve Dünyanın farklı bölgelerinden GenBank veri tabanına kaydedilmiş izolatları içeren ve toplam 31 sekanstan oluşan 18S rRNA data seti oluşturulmuştur. Data set içerisinde yer alan izolatlara ait, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.2’de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.4-4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Sinop ve Ordu yörelerinden toplanmış su örneklerinde belirlenen *Acanthamoeba* izolatlarının gen bölgesi, izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Gen bölgesi	İzolasyon Kaynağı	Genotip	GenBank Aksesyon Numarası
TRERUAcantha1	18S rRNA	Su	T4	MN648628
TRERUAcantha2	18S rRNA	Su	T4	MN648629



Şekil 4.4. TRERUAcantha1 izolatının parsiyel 18S rRNA gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (MN648628)



Şekil 4.5. TRERUAcantha2 izolatının parsiyel 18S rRNA gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (MN648629)

Sinop ve Ordu yörelerinden toplanan su örneklerinde saptanan *Acanthamoeba* izolatlarıyla, Türkiye’den ve dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden izole edilip GenBank veri tabanına kaydedilmiş diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılmış olup bu izolatlara ait bilgiler ve aksesyon numaraları Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Dünyadan ve Türkiye’den filogenetik kıyaslaması yapılan diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

Tür	İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Gen Bölgesi	Genotip	Aksesyon Numarası
<i>Acanthamoeba</i> sp.	ERC-B3	Türkiye	Su	18S rRNA	-	JN793398
<i>Acanthamoeba</i> sp.	3	Brezilya	Burun mukozası	18S rRNA	T5	KF962049
<i>Acanthamoeba</i> sp.	AcaP24	İtalya	Klinik örnekler	18S rRNA	T15	KJ094660
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	mersin	Türkiye	Su	18S rRNA	T4	KJ446977
<i>Acanthamoeba</i> sp.	KaBo	Almanya	Lens	18S rRNA	T13	KJ476522
<i>Acanthamoeba</i> sp.	MN-ISP128	İran	Hasta kişiler	18S rRNA	T4	KJ786519
<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	-	Türkiye	Su	18S rRNA	T15	KR872646
<i>Acanthamoeba</i> sp.	CHI57S-11	İspanya	Toprak	18S rRNA	T4	KT892765
<i>Acanthamoeba</i> sp.	CHI280W-11	İspanya	Su	18S rRNA	T2	KT892772
<i>Acanthamoeba</i> sp.	CHI13V-10	Şili	Sebze	18S rRNA	T15	KT892777
<i>Acanthamoeba</i> sp.	CHI30V-10	Şili	Sebze	18S rRNA	T5	KT892782
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Maz 7	İran	-	18S rRNA	T4	KU872068
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Dog:2	Türkiye	Köpek gözü	18S rRNA	T4	KX018021
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Dog:47	Türkiye	Köpek gözü	18S rRNA	T5	KX018023
<i>Acanthamoeba</i> sp.	ZW-AC7	İran	Su	18S rRNA	T4	KX698431
<i>Acanthamoeba</i> sp.	aabb6	İran	-	18S rRNA	T4	KY587118
<i>Acanthamoeba</i> sp.	22	İran	Su	18S rRNA	T4	LC085894
<i>Acanthamoeba</i> sp.	CHI4004	Şili	İnsan	18S rRNA	T4	MH100822
<i>Acanthamoeba</i> sp.	SKA5-SK35	Malezya	Su	18S rRNA	T3	MH791005
<i>Acanthamoeba</i> sp.	CL126	Malezya	Lens	18S rRNA	T4	MH791024
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Itiba14	Brezilya	Hastane	18S rRNA	-	MK192685

<i>Acanthamoeba</i> sp.	MEH10	İran	Toz	18S rRNA	T4	MK192795
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Egy6	Mısır	Su	18S rRNA	T3	MK217503
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Egy10	Mısır	Su	18S rRNA	T15	MK217507
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Egy	Mısır	Su	18S rRNA	T9	MK217519
<i>Acanthamoeba</i> sp.	QAS-K81	İran	Su	18S rRNA	T4	MK347331
<i>Acanthamoeba</i> <i>stevensoni</i>	AEH_3612_T 11	Hindistan	İnsan gözü	18S rRNA	T11	MK713912
<i>Acanthamoeba</i> <i>healyi</i>	AEH_6468_T 12	Hindistan	İnsan gözü	18S rRNA	T12	MK713914
<i>Acanthamoeba</i> sp.	RS1N2.SAR	Arjantin	-	18S rRNA	-	MN071403

Sinop ve Ordu yörelerindeki çeşitli su kaynaklarından izole edilen *Acanthamoeba* izolatları ile Türkiye’den ve dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki su, toprak, kontak lens vb. organik yapılardan izole edilmiş diğer bazı izolatların çoklu hizalama analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucu, 18S rRNA gen bölgesi için elde edilen nükleotid kompozisyonları Tablo 4.4’de verilmiş olup tüm izolatlar arasındaki genetik farklılıklar Şekil 4.6’da ve her izolata ait sekans farklılıklarının kıyaslamalı görüntüsü ise Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Çoklu hizalamaları yapılan *Acanthamoeba* pozitif izolatlar ve Dünyadan ve Türkiye’den diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının nükleotid kompozisyonları

Aksesyon No	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
JN793398	25,6	19,9	26,6	27,9	52,2	47,8	387,0
KF962049	28,9	16,2	29,1	25,8	58,0	42,0	395,0
KJ094660	24,9	21,0	26,2	27,9	51,1	48,9	466,0
KJ446977	25,7	19,5	29,0	25,9	54,6	45,4	421,0
KJ476522	26,0	18,9	28,9	26,2	54,9	45,1	412,0
KJ786519	26,5	19,9	26,5	27,0	53,1	46,9	437,0
KR872646	24,0	22,7	25,6	27,7	49,7	50,3	441,0
KT892765	24,3	19,8	27,0	28,8	51,4	48,6	333,0
KT892772	28,7	17,2	30,4	23,7	59,2	40,8	355,0
KT892777	24,9	21,8	25,1	28,2	50,0	50,0	394,0
KT892782	30,3	15,9	29,7	24,2	59,9	40,1	347,0
KU872068	24,5	19,7	27,2	28,7	51,6	48,4	335,0
KX018021	24,9	20,5	27,2	27,4	52,1	47,9	453,0
KX018023	29,6	16,8	29,0	24,7	58,5	41,5	328,0
KX698431	24,3	19,8	27,0	28,8	51,4	48,6	333,0
KY587118	24,3	19,8	27,0	28,8	51,4	48,6	333,0
LC085894	24,3	19,8	27,0	28,8	51,4	48,6	333,0
MH100822	24,6	19,5	27,0	28,8	51,7	48,3	333,0
MH791005	26,1	20,0	28,0	25,8	54,1	45,9	414,0
MH791024	25,6	19,9	26,8	27,8	52,4	47,6	403,0
MK192685	26,4	18,7	30,1	24,9	56,5	43,5	386,0
MK192795	24,6	19,5	27,0	28,8	51,7	48,3	333,0
MK217503	25,4	20,2	27,9	26,5	53,3	46,7	366,0
MK217507	24,2	21,5	24,8	29,5	49,0	51,0	363,0
MK217519	27,4	18,6	27,1	26,8	54,6	45,4	328,0
MK347331	25,4	20,5	26,2	28,0	51,6	48,4	347,0
MK713912	26,7	19,4	28,4	25,6	55,0	45,0	469,0
MK713914	28,5	17,6	29,9	24,0	58,4	41,6	471,0
MN071403	24,3	19,8	27,0	28,8	51,4	48,6	333,0
MN648628 TRERUAcantha1	24,4	20,9	26,8	27,8	51,2	48,8	406,0
MN648629 TRERUAcantha2	24,6	20,7	27,1	27,6	51,7	48,3	406,0
Ortalama	25,8	19,6	27,5	27,1	53,3	46,7	382,6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1. JN793398 <i>Acanthamoeba</i> sp. ERC-B3 Türkiye		0.02	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
2. KF962049 <i>Acanthamoeba</i> genotype T5 isolate 3 Brezilya	0.06		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
3. KJ094660 <i>Acanthamoeba</i> genotype T15 isolate AcaP24 İtalya	0.02	0.06		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
4. KJ446977 <i>Acanthamoeba</i> castellanii isolate mersin Türkiye	0.00	0.06	0.02		0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
5. KJ476522 <i>Acanthamoeba</i> genotype T13 strain KaBo Almanya	0.01	0.06	0.03	0.01		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
6. KJ786519 <i>Acanthamoeba</i> sp. MN-ISP128-T4 İran	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01		0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
7. KR872646 <i>Acanthamoeba</i> jacobsoni Türkiye	0.04	0.09	0.02	0.04	0.04	0.04		0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
8. KT892765 <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 isolate CHI57S-11 İs	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04		0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
9. KT892772 <i>Acanthamoeba</i> genotype T2 isolate CHI280W-11	0.03	0.06	0.05	0.03	0.03	0.03	0.06	0.03		0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
10. KT892777 <i>Acanthamoeba</i> genotype T15 isolate CHI13V-10	0.02	0.06	0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.05		0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
11. KT892782 <i>Acanthamoeba</i> genotype T5 isolate CHI30V-10 S	0.05	0.02	0.07	0.05	0.05	0.05	0.09	0.05	0.05	0.07		0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
12. KU872068 <i>Acanthamoeba</i> sp. isolate Maz 7 İran	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
13. KX018021 <i>Acanthamoeba</i> castellanii isolate Dog.2 Türkiye	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00		0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
14. KX018023 <i>Acanthamoeba</i> lenticulata isolate Dog.47 Türkiy	0.05	0.02	0.06	0.05	0.05	0.05	0.08	0.05	0.05	0.06	0.00	0.05	0.05		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
15. KX698431 <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 isolate ZWAC7 İra	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05		0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
16. KY587118 <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 isolate aabb6 İran	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00		0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
17. LC085894 <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 isolate: 22 İran	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
18. MH100822 <i>Acanthamoeba</i> sp. isolate CHI4004 Sili	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00		0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
19. MH791005 <i>Acanthamoeba</i> genotype T3 isolate SKA5-SK3	0.02	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	0.05	0.02	0.02	0.04	0.04	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02		0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
20. MH791024 <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 isolate CL126 Mali	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02		0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
21. MK192685 <i>Acanthamoeba</i> sp. isolate Itiba14 Brezilya	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00		0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
22. MK192795 <i>Acanthamoeba</i> sp. isolate MEH10 İran	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00		0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
23. MK217503 <i>Acanthamoeba</i> genotype T3 isolate Egy6 Misir	0.02	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	0.05	0.02	0.02	0.04	0.04	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.02		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
24. MK217507 <i>Acanthamoeba</i> genotype T15 isolate Egy10 Mi	0.02	0.06	0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.05	0.00	0.07	0.02	0.02	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02	0.04		0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
25. MK217519 <i>Acanthamoeba</i> genotype T9 isolate Egy 1Misir	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04		0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
26. MK347331 <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 isolate QAS-K81 İ	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.03		0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
27. MK713912 <i>Acanthamoeba</i> stenosoni strain AEH 3612 T11	0.02	0.06	0.04	0.02	0.02	0.02	0.05	0.02	0.04	0.04	0.06	0.02	0.02	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.02		0.02	0.01	0.01	0.01
28. MK713914 <i>Acanthamoeba</i> healyi strain AEH 6468 T12 Hin	0.05	0.08	0.06	0.05	0.04	0.05	0.07	0.05	0.06	0.06	0.08	0.05	0.05	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.06	0.04	0.05	0.05		0.01	0.01	0.01
29. MN071403 <i>Acanthamoeba</i> sp. isolate RS1N2.SAR Arjantin	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02	0.05		0.00	0.00
30. <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 TRERUAcantha1 Türkiye	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02	0.05	0.00		0.00
31. <i>Acanthamoeba</i> genotype T4 TRERUAcantha2 Türkiye	0.00	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.02	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02	0.05	0.00	0.00	

Şekil 4.6. Su örneklerinde pozitif belirlenen *Acanthamoeba* izolatları ile Dünya’dan ve Türkiye’den analizleri yapılan diğer bazı izolatların 18S rRNA gen dizilimlerinin pairwise analizleri

	1	10	20	30	40	50	60	70
IN793398								
KF962049								
KJ094660								
KJ446977								
KJ476522								
KJ786519								
KR872646								
KT892765								
KT892772								
KT892777								
KT892782								
KJ872068								
KX018021								
KX018023								
KX698431								
KY587118								
LC085894								
MH100822								
MH791005								
MH791024								
MK192685								
MK192795								
MK217503								
MK217507								
MK217519								
MK347331								
MK713912								
MK713914								
MN071403								
TRERUAcantha1								
TRERUAcantha2								

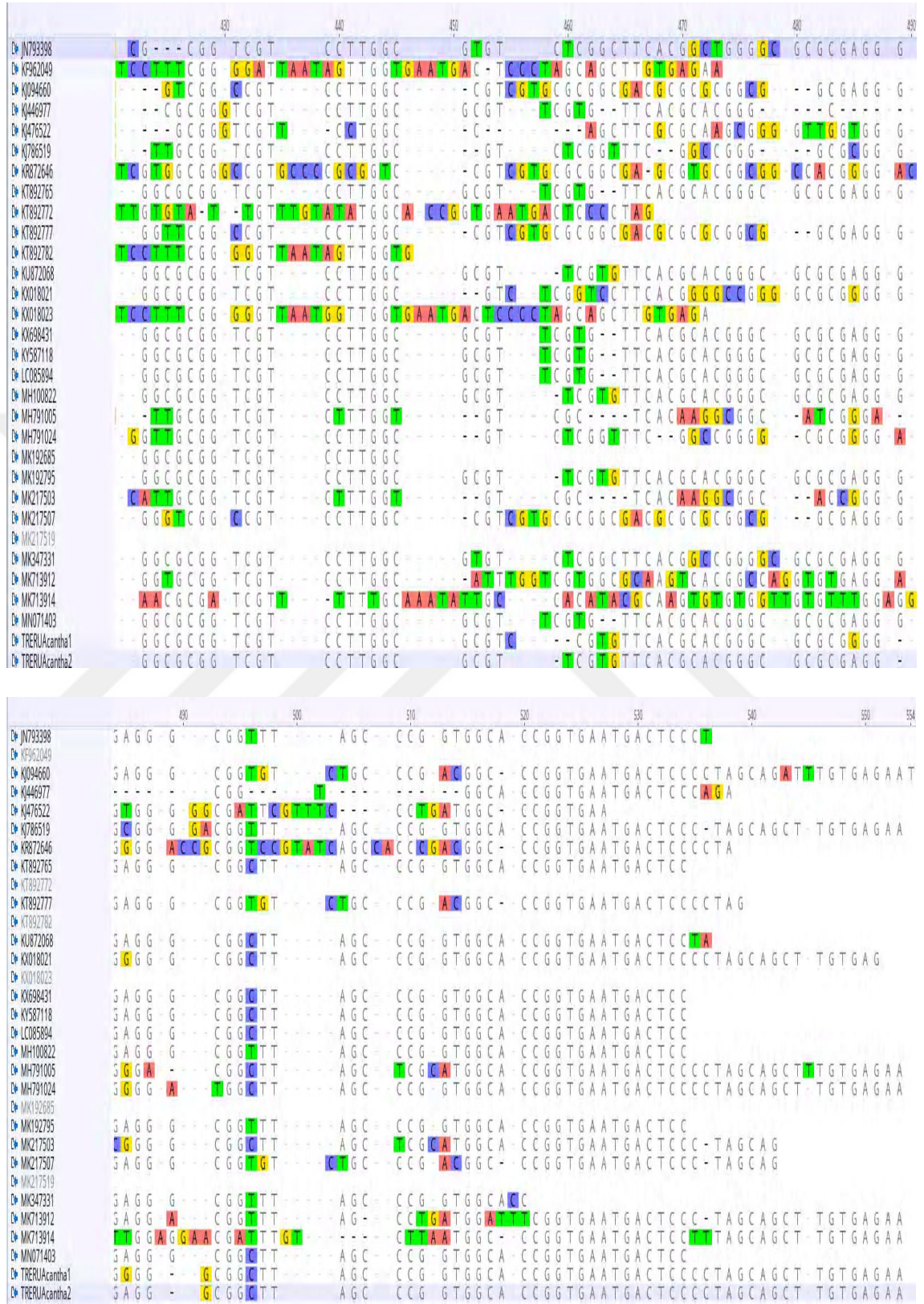
	80	90	100	110	120	130	140
IN793398							
KF962049							
KJ094660							
KJ446977							
KJ476522							
KJ786519							
KR872646							
KT892765							
KT892772							
KT892777							
KT892782							
KJ872068							
KX018021							
KX018023							
KX698431							
KY587118							
LC085894							
MH100822							
MH791005							
MH791024							
MK192685							
MK192795							
MK217503							
MK217507							
MK217519							
MK347331							
MK713912							
MK713914							
MN071403							
TRERUAcantha1							
TRERUAcantha2							

	40	150	160	170	180	190	200	210
DJN793398		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DKF962049		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G	G	CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DJ094660		TT	C		AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DJ446977		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DJ476522		TT	C		AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DJ786519		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DK872646		TT	C		AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DK892765		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DK892772		AA	C	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DK892777		TT	C		AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DK892782		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DKU872068		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DKX018021		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DKX018023		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DKX698431		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
DKY587118		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
LLC085894		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MH100822		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MH791005		T	G	C	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MH791024		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK192685		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK192795		TT	G	GC	AGCGCGAGG	G		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK217503		T	G	C	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK217507		TT	C		AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK217519		TCGCGCGG	TCGCGCGG	TCGCGCGG	TCGCGCGG	TCGCGCGG	TCGCGCGG	CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK347331				TCGCGCGG	TCGCGCGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK713912				TCGCGCGG	TCGCGCGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MK713914				TCGCGCGG	TCGCGCGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
MN071403		TT	G	GC	AGCGCGAGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
TRERUAcantha1				TCGCGCGG	TCGCGCGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG
TRERUAcantha2				TCGCGCGG	TCGCGCGG	A		CTAGGGTAATGATTAATAGGG

	210	220	231	240	250	260	270	280
DJN793398	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DKF962049	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DJ094660	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DJ446977	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DJ476522	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DJ786519	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DK872646	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DK892765	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DK892772	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DK892777	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DK892782	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DKU872068	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DKX018021	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DKX018023	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DKX698431	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
DKY587118	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
LLC085894	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MH100822	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MH791005	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MH791024	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK192685	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK192795	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK217503	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK217507	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK217519	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK347331	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK713912	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MK713914	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
MN071403	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
TRERUAcantha1	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					
TRERUAcantha2	GATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGT	CAGAGGTGAAATTCCTTG	GATTTATGAAAGATTAACTTCTGCG					

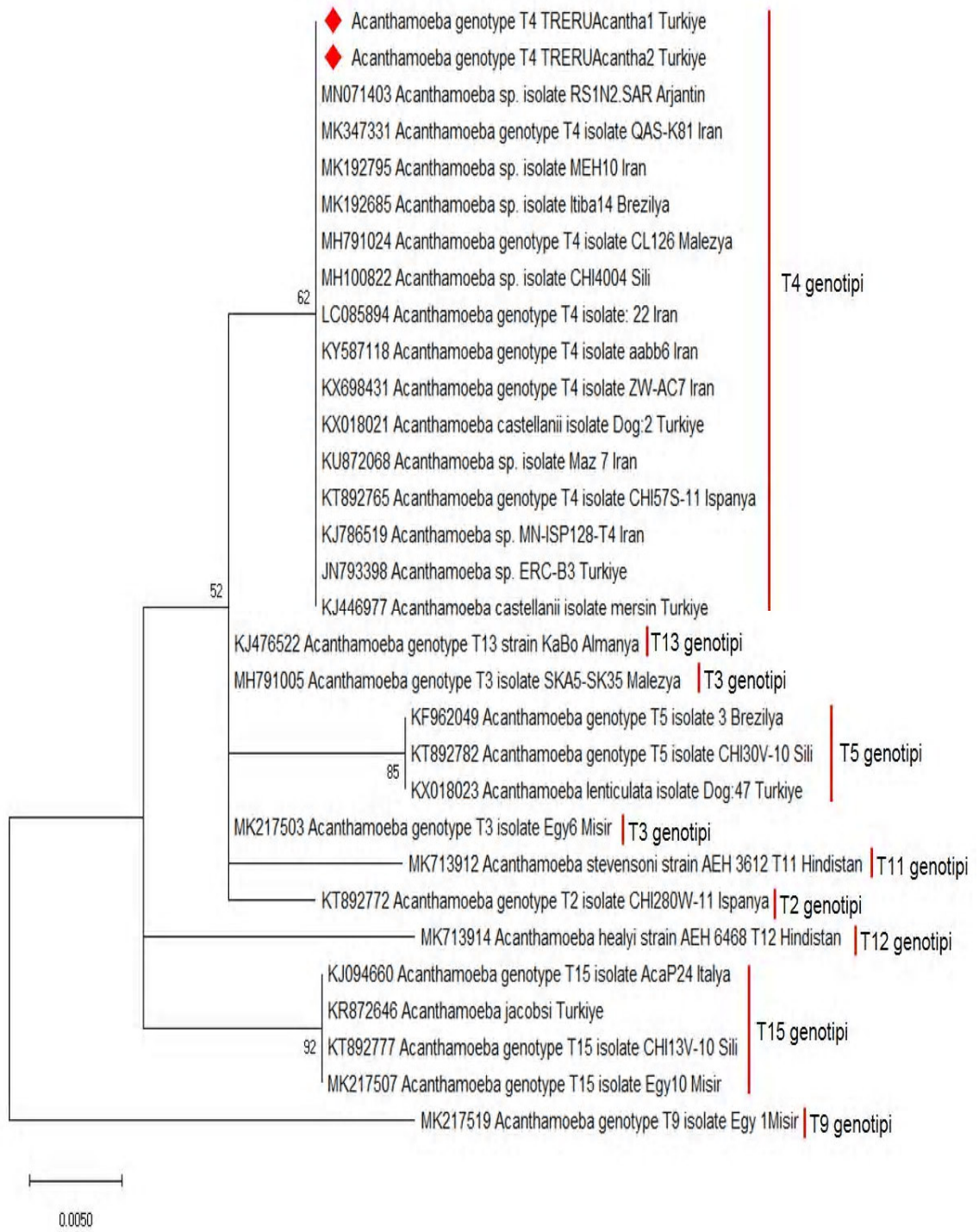
	30	290	300	310	320	330	340	350
DN793398	G	A	A	G	C	A	T	C
DN946049	G	A	A	G	C	A	T	C
DN94660	G	A	A	G	C	A	T	C
DN446977	G	A	A	G	C	A	T	C
DN476522	G	A	A	G	C	A	T	C
DN786519	G	A	A	G	C	A	T	C
DN872646	G	A	A	G	C	A	T	C
DN892765	G	A	A	G	C	A	T	C
DN892772	G	A	A	G	C	A	T	C
DN892777	G	A	A	G	C	A	T	C
DN892782	G	A	A	G	C	A	T	C
DN872068	G	A	A	G	C	A	T	C
DN018021	G	A	A	G	C	A	T	C
DN018023	G	A	A	G	C	A	T	C
DN698431	G	A	A	G	C	A	T	C
DN587118	G	A	A	G	C	A	T	C
DN085894	G	A	A	G	C	A	T	C
DN100822	G	A	A	G	C	A	T	C
DN791005	G	A	A	G	C	A	T	C
DN791024	G	A	A	G	C	A	T	C
DN192685	G	A	A	G	C	A	T	C
DN192795	G	A	A	G	C	A	T	C
DN217503	G	A	A	G	C	A	T	C
DN217507	G	A	A	G	C	A	T	C
DN217519	G	A	A	G	C	A	T	C
DN347331	G	A	A	G	C	A	T	C
DN713912	G	A	A	G	C	A	T	C
DN713914	G	A	A	G	C	A	T	C
DN071403	G	A	A	G	C	A	T	C
DNTRUAcantha1	G	A	A	G	C	A	T	C
DNTRUAcantha2	G	A	A	G	C	A	T	C

	360	370	380	390	400	410	420
DN793398	T	C	G	T	A	G	T
DN946049	T	C	G	T	A	G	T
DN94660	T	C	G	T	A	G	T
DN446977	T	C	G	T	A	G	T
DN476522	T	C	G	T	A	G	T
DN786519	T	C	G	T	A	G	T
DN872646	T	C	G	T	A	G	T
DN892765	T	C	G	T	A	G	T
DN892772	T	C	G	T	A	G	T
DN892777	T	C	G	T	A	G	T
DN892782	T	C	G	T	A	G	T
DN872068	T	C	G	T	A	G	T
DN018021	T	C	G	T	A	G	T
DN018023	T	C	G	T	A	G	T
DN698431	T	C	G	T	A	G	T
DN587118	T	C	G	T	A	G	T
DN085894	T	C	G	T	A	G	T
DN100822	T	C	G	T	A	G	T
DN791005	T	C	G	T	A	G	T
DN791024	T	C	G	T	A	G	T
DN192685	T	C	G	T	A	G	T
DN192795	T	C	G	T	A	G	T
DN217503	T	C	G	T	A	G	T
DN217507	T	C	G	T	A	G	T
DN217519	T	C	G	T	A	G	T
DN347331	T	C	G	T	A	G	T
DN713912	T	C	G	T	A	G	T
DN713914	T	C	G	T	A	G	T
DN071403	T	C	G	T	A	G	T
DNTRUAcantha1	T	C	G	T	A	G	T
DNTRUAcantha2	T	C	G	T	A	G	T



Şekil 4.7. Su örneklerinde belirlenen *Acanthamoeba* izolatları ile Dünyadaki ve Türkiye’deki diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının partial 18S rRNA gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi 18S rRNA gen bölgesine göre çalışmamızda elde ettiğimiz *Acanthamoeba* izolatları ile farklı coğrafik bölgelerden ve farklı kaynaklardan (toprak, su, lens vb.) izole edilen *Acanthamoeba* suşları arasında birçok nükleotid varyasyonu saptanmıştır. *Acanthamoeba* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre Maximum Likelihood metodu ve General Time Reversible modeli (1000 bootstrap) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Şekil 4.8’de Sinop ve Ordu yörelerinden toplanmış su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* izolatlarının Türkiye’den ve dünyadan bildirilen T4 genotipine ait izolatlarla aynı kümede yer aldıkları görülmektedir. İlgili türlere ait elde edilen 18S rRNA barkod gen bölgesi sekanslarının GenBank veri tabanındaki referans sekanslarla birlikte analizlerinde 15 pozitif *Acanthamoeba* izolatları arasında TRERUAcantha1 (Sinop) ve TRERUAcantha2 (Ordu) olmak üzere 2 haplotip tespit edilmiş ve ortalama haplotip diversitesi 0.682 ± 0.084 olarak belirlenmiştir. 18S rRNA data set içerisinde TRERUAcantha1 ve TRERUAcantha2 izolatlarının da yer aldığı T4 genotipi içerisindeki tüm izolatların %100 identik oldukları belirlenmiştir. Genotip bazında gruplama yapıldığında ise T4 genotipindeki izolatlarla T5, T15, T13, T2, T3, T9, T11 ve T12 genotipleri arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla 0.051 ± 0.015 , 0.029 ± 0.011 , 0.012 ± 0.007 , 0.033 ± 0.012 , 0.020 ± 0.009 , 0.034 ± 0.013 , 0.020 ± 0.009 ve 0.047 ± 0.015 olarak tespit edilmiştir. 18S rRNA data setinin ML analizlerinde T4 genotipindeki izolatların monofiletik yapılanma gösterdiği tespit edilmiştir. Filogenetik analizlerde, çalışmamızda elde ettiğimiz iki izolatımızın da yer aldığı T4 genotipindeki izolatların en yakın benzerliği %99,9 ile T13 genotipinde bulunan ve Almanya’da kontakt lensten izole edilen KaBo (KJ476522) izolatıyla gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.8. Su örneklerinde saptanan *Acanthamoeba* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Maximum Likelihood metodu, General Time Reversible modeli, 1000 bootstrap). Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir. ◆: Ordu ve Sinop izolatları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Acanthamoeba türleri özellikle toprak ve her türlü su kaynağında serbest halde yaşayabilen bir parazit olması sebebiyle insan sağlığını yakından tehdit etmektedir. İnsanların bu parazitle karşılaşma oranı oldukça yüksek olup enfeksiyona yakalanan kişilerde granüloamatöz amibik ensefalit ve *Acanthamoeba* keratiti tablosu gelişebilmektedir. İnsanlarda *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların prevalansında özellikle son yıllarda önemli artış görülmektedir. Bu enfeksiyonların teşhisinde hızlı ve erken tanı oldukça önemlidir (Khan, 2006). *Acanthamoeba* türlerinin teşhisinde mikroskopik inceleme ve kültürün yanısıra son yıllarda moleküler yöntemlerde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Mikroskopik inceleme yöntemi diğer teşhis yöntemlerine göre duyarlılığı düşük olmasına rağmen gerek çabuk sonuç vermesi gerekse diğerlerine nazaran daha ucuz maliyetli olması sebebiyle tamda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak mikroskopi yönteminin gerek uzmanlık gerektirmesi gerekse yanlış pozitiflikler saptanabilmesi dolayısıyla bu yöntemin yerini genellikle kültür metodu almaktadır. Ancak her iki yöntemin de spesifite ve sensitiviteleri moleküler yöntemlere göre daha düşük bulunmuştur. Bu kapsamda son yıllarda *Acanthamoeba* türlerinin tür ve genotip tayinlerinin yapılabilmesi için DNA barkodlanmasına dayalı teşhis yöntemleri geliştirilmiştir. Dünyada *Acanthamoeba* türlerinin DNA barkodlaması amacıyla en sık kullanılan referans gen bölgelerinin başında 18SrRNA gen bölgesi gelmektedir. Yapılan moleküler çalışmalarda *Acanthamoeba* türlerine ait 22 farklı genotip (T1-T22) ve 20'nin üzerinde *Acanthamoeba* türü tespit edilmiştir (Schuster ve Visvesvara, 2004; Corsaro ve ark, 2015; Dodangeh ve ark., 2018).

Türkiye’de ve dünyada *Acanthamoeba* türlerinin prevalansı ve genotiplendirilmeleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Kilic ve ark. (2004), Ankara yöresinde Askeri Tıp Fakültesindeki iki su örneği ile bitki saksılarından topladıkları 28 toprak örneğinden 18’inde PCR ile *Acanthamoeba* pozitifliği saptamışlardır. 18S rRNA sekans analizleri sonucu pozitif belirledikleri izolatların farklı genotiplerde (T2, T3, T4 ve T7) yer aldıklarını belirlemişlerdir. Ertabaklar ve ark. (2007) İzmir’de bir hastanın göz korneasından kazıdıkları örneği kültüre ederek *Acanthamoeba* pozitifliği saptamışlar ve bu izolatın T4 genotipine ait olduğunu belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar (Ertabaklar ve ark., 2007) toprak, lens kutusu ve sudan aldıkları örneklerde de T9 ve T4 genotiplerini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Özkoç ve ark. (2008) yine İzmir yöresindeki bir hastadan izol ettikleri izolatın T4 genotipindeki *Acanthamoeba castellanii* türü olduklarını bildirmişlerdir. Aydın yöresinde Ertabaklar ve ark. (2009) tarafından *Acanthamoeba keratiti* teşhisi konulan bir hastadan izole edilen suşun da *Acanthamoeba castellanii* T4 genotipine ait olduğu rapor edilmiştir. Kayseri yöresinde yapılan çalışmada Doğan ve ark. (2013), 20 toprak örneğinde %40 oranında *Acanthamoeba* pozitifliği belirlemişler ve bu suşlardan seçilen üç (ERC-S1-S2-S3) izolatın 18S rRNA gen bölgesinin sekans analizleri sonucu T4 genotipinde olduklarını saptamışlardır. Benzer şekilde Kayseri yöresinde yapılan bir diğer çalışmada Kuk ve ark., (2013), eriyen kar suları, yağmur suları ve çeşme sularından topladıkları 26 örnekte %19,23 *Acanthamoeba* pozitifliği belirlediklerini ve sekans analizleri sonucu bu izolatların T4 genotipine ait olduklarını bildirmişlerdir. Sivas yöresindeki göz rahatsızlığı bulunan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada toplam 500 hastadan sadece 1’inde (%0,2) *Acanthamoeba* spp. pozitifliği rapor edilmiştir (Yünlü ve ark., 2015). Ege Bölgesi’nde ölmüş yabani kuşlarda yapılan bir çalışmada (Karakavuk ve ark., 2017) kuşların kornealarından elde edilen izolatların PCR ve sekans analizleri sonucu T4 ve T5 genotiplerine ait oldukları bildirilmiştir. Özçelik ve ark. (2017) tarafından Sivas’ta yapılan bir çalışmada, hastane ortamındaki klimalardan toplanan örneklerde %17 *Acanthamoeba* spp. pozitifliği bildirilmiştir. Yazar ve ark. (2019), Türkiye’nin farklı bölgelerinde (Kayseri, Bingöl, Erzurum, Elazığ, Kocaeli, Diyarbakır, İzmir) bulunan gölet, akarsu, çay ve kuyulardan alınan toplam 664 su örneğinden 143’ünü monoksenik kültürde, bu örneklerin de 41’ini aksenik kültürde pozitif bulmuşlardır. 18S rRNA gen bölgesine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda ise dokuz örneğin *Acanthamoeba* sp. olduğunu saptamışlar ve sekans analizlerinde pozitif izolatlarının *Acanthamoeba* sp.

(AB425948) ve *A. hatchetti* (AF019060) izolatlarıyla %98, *A. hatchetti* (AF260722) izolatıyla ise %99 identiklik gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Acanthamoeba türlerinin su ve toprak gibi çevresel örneklerde prevalansları ve moleküler karakterizasyonlarıyla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında bu konuda çok sayıda çalışmanın olduğu dikkati çekmiştir. 2012 yılında Tayvan'da yapılan bir çalışmada (Kao ve ark., 2012), nehirden örnekleme yapılan toplam 211 su örneğinin PCR ile yapılan analizlerinde farklı genotiplerde (T4, T5 ve T15) %16,1 *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Benzer şekilde PCR ile yapılan moleküler çalışmalarda; İran'da (Mahmoudi ve ark., 2012) 27 su örneğinde %70,3, İspanya'da (Reyes Batlle ve ark., 2014) 24 toprak örneğinde %64,5, Uganda'da (Sente ve ark., 2016) 324 çevre ve 84 musluk suyunda sırasıyla %33 ve %42,9 ve yine İran'da (Fallah ve ark., 2017) 22 farklı istasyonlardan toplanan 50 su örneğinde %68 oranlarında *Acanthamoeba* pozitiflikleri rapor edilmiştir. Benzer şekilde nehir ve çeşme sularından alınan örneklerde Amerika Birleşik Devletleri'nde %7, Jamaika'da %26,4, Almanya'da %79 ve Bulgaristan'da %94, İspanya'da %21, Nikaragua'da %22,5, Japonya'da %26,3, Brezilya'da %36,1 ve Meksika'da %59,5 oranlarında *Acanthamoeba* pozitifliği bildirilmiştir (Lorenzo-Morales ve ark., 2005; Leiva ve ark., 2008; Edagawa ve ark., 2009; Magliano ve ark., 2009; Bonilla-Lemus ve ark., 2010; Kao ve ark., 2014; Aghajani ve ark., 2016). Bunun yanında; Geisen ve ark. (2014) Hollanda, Tibet ve Sardunya'da toprak örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* türlerinin T2, T4, T13 ve T14 genotiplerinde, Valladares ark. (2015) İspanya'da köpeklerden elde ettikleri izolatların T4 genotipinde, Mahmoudi ve ark. (2015) İran'da su örneklerinden elde ettikleri izolatların T4 ve T5 genotiplerinde, benzer şekilde Aghajani ve ark. (2016) İran'da su örneklerindeki izolatların T3, T4 ve T5 genotiplerinde, Al-Herrawy ve ark. (2017) Mısır'da su örneklerindeki *Acanthamoeba* izolatların T3, T4, T5, T11 ve T15 genotiplerinde yer aldıklarını rapor etmişlerdir.

Mevcut çalışmamızda, Sinop ve Ordu yörelerindeki farklı su kaynaklarından toplanan su örnekleri incelenmiştir. Bu bölgelerin tercih edilmesindeki sebep *Acanthamoeba* türlerinin gerek varlığı gerekse moleküler karakterleri ile ilgili olarak bu yörelerden bildirilen bir rapora rastlanmamış olmasıdır. Çalışmamızda incelenen 80 su örneğinin 15'inde (%18,8) *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Sinop yöresinde pozitiflik %17,1, Ordu yöresinde ise %20 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarının genel olarak

Türkiye ve dünyadan bildirilen oranlarla yakınlık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda filogenetik analizlerde 18S rRNA gen bölgesine göre *Acanthamoeba* izolatları arasında nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sinop ve Ordu yörelerinden toplanmış su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* izolatlarının Türkiye’den ve dünyadan bildirilen T4 genotipine ait izolatlarla aynı kümede yer aldıkları görülmüştür. İlgili türlere ait elde edilen 18S rRNA barkod gen bölgesi sekanslarının GenBank veri tabanındaki referans sekanslarla birlikte analizlerinde 15 pozitif *Acanthamoeba* izolatları arasında TRERUAcantha1 (Sinop) ve TRERUAcantha2 (Ordu) olmak üzere 2 haplotip tespit edilmiş ve ortalama haplotip diversitesi $0,682 \pm 0,084$ olarak belirlenmiştir. 18S rRNA data set içerisinde TRERUAcantha1 ve TRERUAcantha2 izolatlarının da yer aldığı T4 genotipi içerisindeki tüm izolatların %100 identik oldukları saptanmıştır. Genotip bazında gruplama yapıldığında ise T4 genotipindeki izolatlarla T5, T15, T13, T2, T3, T9, T11 ve T12 genotipleri arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla $0,051 \pm 0,015$, $0,029 \pm 0,011$, $0,012 \pm 0,007$, $0,033 \pm 0,012$, $0,020 \pm 0,009$, $0,034 \pm 0,013$, $0,020 \pm 0,009$ ve $0,047 \pm 0,015$ olarak tespit edilmiştir. 18S rRNA data setinin ML analizlerinde T4 genotipindeki izolatların monofiletik yapılanma gösterdiği tespit edilmiştir. Filogenetik analizlerde, çalışmamızda elde ettiğimiz iki izolatımızın da yer aldığı T4 genotipindeki izolatların en yakın benzerliği %99,9 ile T13 genotipinde bulunan ve Almanya’da kontakt lensten izole edilen KaBo (KJ476522) izolatıyla gösterdiği görülmüştür. Türkiye’de toprak ve farklı su kaynaklarından izole edilen *Acanthamoeba* türleri arasında T4 genotipinin en sık görülen genotip olduğu, bu genotipin yanısıra nadir de olsa T2, T3, T7 ve T9 genotiplerinin de bildirildiği göz önüne alındığında, mevcut çalışmamızda elde ettiğimiz filogenetik analiz sonuçlarının Türkiye’den bildirilen genotip sonuçlarını destekler nitelikte olduğu kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmayla;

- Sinop ve Ordu yörelerindeki farklı su kaynaklarında ilk kez *Acanthamoeba* prevalansı bildirilmiş,
- Pozitif izolatların 18S rRNA gen bölgesinin moleküler karakterleri ortaya çıkarılarak genotipleri belirlenmiş,
- Dünyadan benzer izolatlarla filogenetik yakınlıkları saptanmış,
- Türkiye’nin biyolojik varlıkları olarak Genbank kayıtları gerçekleştirilmiş,

- 18S rRNA gen bölgesinin *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesinde önemli ve belirleyici bir marker olduğu teyit edilmiş,
- Çalışmada örnekleme yapılan çeşme suyu, havuz suları, kaplıca ve göller ile temas halindeki bölge insanları için gerek *Acanthamoeba* keratiti gerekse granülomatöz amibik ensefalit gibi enfeksiyonlar yönünden risk potansiyelleri ortaya konulmuştur.



6. KAYNAKLAR

- Aghajani A, Dabirzadeh M, Maroufi Y, Hooshyar H. Identification of *Acanthamoeba* genotypes in pools and stagnant water in ponds in sisthan region in Southeast Iran. Türkiye Parazitol Derg, 2016; 40: 132-6.
- Al-Herrawy AZ, Heshmat M, Abu Kabsha SH, Gad MA, Lotfy WN. Occurrence of *Acanthamoeba* species in the damanhour drinking water treatment plant, Behera Governorate (Egypt). Reports in Parasitology, 2017; 4:15-21,
- Alsam S, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood–brainbarrier. J Infect, 2005; 51: 150-156.
- Alvord L, Court J, Davis T, Morgan CF, Schindhelm K, Vogt J, Winterton L. Oxygen permeability of a new type of high risk soft contact lens material. Optom Vis Sci, 1998; 75: 30-6.
- Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. Eye Contact Lens, 2007; 33: 1-8.
- Barr J. The 1997 report on contact lenses. Cont Lens Spec, 1998; 1:23-33.
- Beattie TK, Tomlinson A, Seal DV. Anti-*Acanthamoeba* efficacy in contact-lens disinfecting systems. Br J Ophthalmol, 2002; 86: 1319-20.
- Beattie TK, Tomlinson A, McFadyen AK, Seal DV, GrimasonAM. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: A new riskfactor for infection? Ophthalmol, 2003; 110: 765-71.

- Bhattacharya S, Som I, Bhattacharya A. The ribosomal DNA plasmids of *Entamoeba*. *Parasitol Today*, 1998; 14: 181-5.
- Bogler SA, Zarley CD, Burianek LL, Fuerst PA, Byers TJ. Interstrain mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. *Mol Biochem Parasitol*, 1983; 8: 145-63.
- Bonilla-Lemus P, Ramírez-Bautista GA, Zamora-Munoz C, Ibarra-Montes R, Ramírez-Flores E, Hernández-Martínez MD. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp Parasitol*, 2010;126: 54-8.
- Bottone EJ, Perez AA, Gordon RE, Qureshi MN. Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *JMed Microbiol*, 1994; 40: 148-54.
- Bowers B, Korn ED. Localization of lipophosphoglycan on both sides of *Acanthamoeba* plasma membrane. *J Cell Biol*, 1974; 62: 533-40.
- Bowers B, Olszewski TE. *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *J CellBiol*, 1983; 97: 317-22.
- Brennan NA. Is there a question of safety with continuouswear? *Clin Exp Optom*, 2002; 85: 127-40.
- Byers TJ, Hugo ER, Stewart VJ. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (A review). *J Protozool*, 1990; 37:17S-25S.
- CarterWW, Gompf SG, Toney JF, Greene JN & Cutolo EP. Disseminated *Acanthamoeba sinusitis* in a patient with AIDS: A possible role for early antiretroviral therapy. *AIDS Read*, 2004; 14:41-9.
- Castellani A. An amoeba found in culture of yeast: Preliminary note. *J Trop Med Hyg*, 1930; 33: 160.
- Chang PC, Soong HK. *Acanthamoeba* keratitis in noncontact lens wearers. *Arch Ophthalmol*, 1991; 109: 463-4.
- Chappell CL, Wright JA, Coletta M, Newsome AL. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001; 8: 724-30.
- Cheng KH, Leung SL, Hoekman HW, Beekhuis WH, MulderPGH, Geerards AJM, Kijlstra A. Incidence of contactlens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *Lancet*, 1999; 354: 181-5.

- Chung DI, Yu HS, Hwang MY, Kim TH, Kim TO, Yun HC, Kong HH. Subgenus classification of *Acanthamoeba* by riboprinting. Korean J Parasitol, 1998; 36: 69-80.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. Infect Immun, 1997; 65: 3759-67.
- Cordingley JS, Wills RA, Villemez CL. Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. J Cell Biochem, 1996; 61: 167-71.
- Corsaro D, Walochnik J, Venditti D, Müller KD, Hauröder B, Michel R. Rediscovery of *Nucleophaga amoebae*, a novel member of the Rozellomycota. Parasitol Res, 2014; 113: 4491-8.
- Costas M, Griffiths AJ. Enzyme composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. J Protozool, 1985; 32: 604-7.
- Costas M, Griffiths AJ. The suitability of starch gel electrophoresis of esterases and acid phosphatases for the study of *Acanthamoeba* taxonomy. Arch Protistenk, 1980; 123: 272-9.
- Culbertson CG, Smith JW, Miner JR. *Acanthamoeba* observation on animal pathogenicity. Science, 1958; 127: 1506.
- Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK, Miner JR. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. Am J Pathol, 1959; 35: 185-97.
- Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: Role of humoral antibody. Infect Immun, 1980; 29: 401-7.
- Dart JKG, Stapleton F, Minassian D. Contact lenses and other risk factors in microbial keratitis. Lancet, 1991; 338: 650-3.
- De Jonckheere JF. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. J Protozool 1983; 30: 701-6.
- Dodangeh S, Kialashaki E, Daryani A, Sharif M, Sarvi S, Moghaddam YD, Hosseini SA. Isolation and molecular identification of *Acanthamoeba* spp. from hot springs in Mazandaran province, northern Iran. J Water Health, 2018; 16(5): 807-13.
- Doğan S, Yazar S, Kuk S. Toprakta serbest yaşayan ve insanda parazitlenebilen bazı amiplerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Sağlık Bil Derg, 2013; 23: 187-91.

- Drozanski W. Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol Pol*, 1956; 5: 315-7.
- Dudley R, Matin A, Alsam S, Sissons J, Mahsood AH, Khan NA. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Tropica*, 2005; 95:100-8.
- Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuha Y, Karanis P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Res*, 2009; 105: 1109-17.
- Epstein RJ, Wilson LA, Visvesvara GS, Plourde EG Jr. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. *Arch Ophthalmol*, 1986; 104: 1318-21.
- Ertabaklar H, Dayanır V, Apaydın P, Ertuğ S, Walochnik J. *Acanthamoeba* keratiti. *Türkiye Parazitol Derg*, 2009; 33: 283-85.
- Ertabaklar H, Türk M, Dayanır V, Ertug S, Walochnik J. *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res*, 2007; 100: 241-6.
- Essig A, Heinemann M, Simnacher U, Marre R. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*, 1997; 63: 1396-99.
- Fallah E, Jafarpour Z, Mahami-Oskouei M, Haghighi A, Niyatti M, Spotin A, Khesri A. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolates from surface resting waters in Northwest Iran. *Iran J Parasitol*, 2017, 12(3): 355-63.
- Ferrante A, Allison AC. Alternative pathway activation of complement by African trypanosomes lacking a glycoprotein coat. *Parasite Immunol*, 1983; 5: 491-8.
- Gautam RK, Lory S, Seyedirashti S, Bergeron DL, Fritsche TR. Mitochondrial DNA fingerprinting of *Acanthamoeba* spp. isolated from clinical and environmental sources. *J Clin Microbiol*, 1994; 32: 1070-3.
- Geisen S, Fiore-Donno AM, Walochnik J, Bonkowski M. *Acanthamoeba* everywhere: High diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitol Res*, 2014; 113: 3151-8.
- Giese MJ, Weissman BA. Contact lens associated corneal infections. Where do we go from here? *Clin Exp Optom*, 2002; 85:141-8.
- Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17: 413-3.

- Gudmundsson OG, Woodward DF, Fowler SA, Allansmith MR. Identification of proteins in contact lens surface deposits by immunofluorescence microscopy. *Arch Ophthalmol*, 1985;103: 196-7.
- Heath KV, Frank O, Montaner JS, O'Shaughnessy MV, Schechter MT, Hogg RS. Human immunodeficiency virus (HIV)/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) mortality in industrialized nations, 1987-1991. *Int J Epidemiol*, 1998;27: 685-90.
- Ito S, Chang RS, Pollard TD. Cytoplasmic distribution of DNA in a strain of hartmannellid amoeba. *J Protozool*, 1969;16:638-45.
- Jager BV, Stamm WP. Brain abscesses caused by free living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet*, 1972; 1343-5.
- Jaison PL, Cao Z, Panjwani N. Binding of *Acanthamoeba* to mannose-glycoproteins of corneal epithelium: Effect of injury. *Curr Eye Res*, 1998;17: 770-6.
- Kahane S, Dvoskin B, Mathias M, Friedman MG. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkanianegevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Appl Environ Microbiol*, 2001;67: 4789-95.
- Kao PM, Hsu BM, Chen CT, Huang SW, Kao ES, Chen JL, Wu NM, Ji WT. Identification and quantification of the *Acanthamoeba* species and genotypes from reservoirs in Taiwan by molecular techniques. *Acta tropica*, 2014; 132: 45-50.
- Kao PM, Hsu BM, Chen NH, Huang KH, Huang CC, Ji DD, Chen JS, Lin WC, Huang SW, Chiu YC. Molecular detection and comparison of *Acanthamoeba* genotypes in different functions of watersheds in Taiwan. *Environ Monit Assess*, 2012; 184, 4335-44.
- Karakavuk M, Akyurt M, Şahar EA, Karakuş M, Aldemir D, Döndüren Ö, Özdemir HG, Can H, Gürüz AY, Dağcı H, Döşkaya M. (). First time identification of *Acanthamoeba* genotypes in the cornea samples of wild birds; Is *Acanthamoeba* keratitis making the predatory birds a target. *Exp Parasitol*, 2017; 183, 137-42.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software

- platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 2012; 28: 1647-9.
- Khan NA, Paget TA. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol*, 2002; 44:444-9.
- Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathogen*, 2003; 34: 277-85.
- Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr Microbiol*, 2001; 43: 204-8.
- Khan NA, Paget TA. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol*, 2002; 44: 444-9.
- Khan NA. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*, 2006;30(4):564-95.
- Kilic A, Tanyuksel M, Sissons J. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4, and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol*, 2004; 49: 246-52.
- Kilvington S, Beeching JR, White DG. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 310-4.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980; 16: 111-20.
- Klotz SI, Misra RP, Butrus SI. Carbohydrate deposits on the surfaces of worn extended-wear soft contact lenses. *Arch Ophthalmol*, 1987; 105: 974-77.
- Kong HH, Park JH, Chung DI. Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. *Korean J Parasitol*, 1995; 33: 331-40.
- Korn ED, Dearborn DG, Wright PL. Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Isolation from whole amoebae and identification of the water-soluble products of acid hydrolysis. *J Biol Chem*, 1974;249: 3335-41.
- Kotting J, Berger MR, Unger C, Eibl H. Alkylphosphocholines: Influence of structural variations on biodistribution of antineoplastically active concentrations. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1992; 30: 105-12.

- Krishna-Prasad BN, Gupta SK. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr Sci*, 1978; 47: 245-7.
- Kuk S, Yazar S, Doğan S, Çetinkaya Ü, Şakalar Ç. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water. *Turk J Med Sci*, 2013; 43(1): 12-7.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016; 33: 1870-4.
- Lam DSC, Houang E, Fan SP, Lyon D, Seal D, Wong E, Hong Kong Microbial Keratitis Study Group. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: Comparison with Europe and North America. *Eye*, 2002; 16: 608-18.
- Ledee DR, Booton GC, Awwad MH, Sharma S, Aggarwal RK, Niszl A, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003; 44: 1142-9.
- Lee SJ, Jeong HJ, Lee JE, Lee JS, Xuan YH, Kong HH, Chung DI, Ock MS, Yu HS. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from amebic keratitis related to orthokeratology lens overnight wear. *Korean J Parasitol*, 2006; 44: 313-20.
- Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, Kilvington S, Keys MF, Matheson MM, Dart JK, McGill JI, Watt PJ. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 1261-5.
- Leiva B, Clasdötter E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of León, Nicaragua. *Rev Biol Trop*, 2008; 56: 439-46.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009; 25: 1451-2.
- Lorenzo-Morales J, Lindo JF, Martinez E, Calder D, Figueruelo E, Valladares B, Ortega-Rivas A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann Trop Med Parasit*, 2005; 99: 751-8.
- Ly TM, Muller HE. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol*, 1990; 33:51-4.

- Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol*, 2005; 54: 755-9.
- Magliano AC, da Silva FM, Teixeira MM, Alfieri SC. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol*, 2009; 123: 231-35.
- Mahmoudi MR, Rahmati B, Seyedpour SH, Karanis P. Occurrence and molecular characterization of free-living amoeba species (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, and *Saccamoeba limax*) in various surface water resources of Iran. *Parasitol Research*, 2015;114: 4669-74.
- Mahmoudi MR, Taghipour N, Eftekhar M, Haghighi A, Karanis P. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitol Res*, 2012; 110: 473-7.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*, 2003; 16: 273-307.
- Martinez AJ, Visvesvara GS. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. *Clin Lab Med*, 1991; 11: 861-72.
- Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*, 1997; 7: 583-98.
- Martinez AJ. Free-living amebas: Natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1985.
- Martinez AJ. Infections of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*, 1991; 13: S399-S402.
- Mathews HM, Moss DM, Healy GR, Visvesvara GS. Polyacrylamidegel electrophoresis of isoenzymes from *Entamoeba* species. *J Clin Microbiol*, 1983; 17: 1009-12.
- McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Effect of steroids on *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001; 42: 2885-93.
- Nagington J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infections of the eye. *Lancet*, 1974;1537-40.
- Neff RJ, Neff RH. () The biochemistry of amoebic encystment. *Symp Soc Exp Biol*, 1969; 23: 51-81.

- Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford: Oxford University; 2005.
- Nieder Korn JY, Alizadeh H, Leher H, McCulley JP. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes Infect*, 1999; 437-43.
- Nilsson SEG, Montan PG. The annualized incidence of contact lens induced keratitis in Sweden and its relation to lens type and wear schedule: Results of a three-month prospectivestudy. *CLAO J*, 1994; 20: 225-30.
- Özçelik S, Coşkun KA, Yünlü Ö, Alim A, Malatyali E. The prevalence, isolation and morfotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. *Türkiye Parazitolo Derg*, 2017; 36: 198-203.
- Özkoç S, Tuncay S, Delibaş SB, Akısu C, Özbek Z, Durak I, Walochnik J. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* spp. from two clinical samples. *J Med Microbiol*, 2008;57, 392-6.
- Page FC. Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J Protozool*, 1967a; 14: 499-521.
- Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool*, 1967b; 14: 709-24.
- Page FC. A new key to fresh water and soil amoebae. *Freshwater Biological Association Scientific Publications*, Cumbria, UK. 1988.
- Patel DV, McGhee CN. *Acanthamoeba* keratitis: A comprehensive photographic reference of common and uncommon signs. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2009; 37: 232-8.
- Perez-Santonja JJ, Kilvington S, Hughes R, Tufail A, Metheson M, Dart JKG. Persistently culture positive *Acanthamoeba* keratitis; in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmol*, 2003; 110: 1593-1600.
- Poggio EC, Glynn RJ, Schein OD, Seddon JM, Shannon MJ, Scardino VA, Kenyon KR. The incidence of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear softcontact lenses. *N Engl J Med*, 1989; 321: 779-83.
- Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, 2008; 25: 1253-6.
- Preston TM, Richard H, Wotton RS. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Letters*, 2001; 194: 143-7.

- Proca-Ciobanu M, Lupascu GH, Petrovici A, Ionescu MD. Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: The presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol*, 1975;5: 49-56.
- Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 1977; 8: 557-98.
- Radford CF, Bacon AS, Dart JK, Minassian DC. Risk factors for *Acanthamoeba* keratitis in contact lens users: A case control study. *Br Med J*, 1995;310: 1567-70.
- Radford CF, Lehmann OJ, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis: Multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. *Br J Ophthalmol*, 1998;82:1387-92.
- Radford CF, Minassian DC, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: Incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol*, 2002; 86: 536-42.
- Reyes-Batlle M, Cheridah D, Carmen M, López-Arencibia A, Cabello-Vilchez AF, Ana CG, Córdoba-Lanús E, John FL, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morale J. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res*, 2014;113: 1383-8,
- Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*, 1980;33: 1179-83.
- Sawyer T. *Acanthamoeba griffini* a new species of marine amoeba. *J Protozool*, 1971;18: 650-4.
- Sawyer TK, Griffin JL. A proposed new family, Acanthamoebidae (order Amoebida), for certain cyst-forming filose amoebae. *Trans Am Microsc Soc*, 1975; 94: 93-8.
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*, 2001; 39: 1903-11.
- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of human and animals. *Int J Parasitol*, 2004; 34: 1-27.
- Seal DV, Kirkness CM, Bennett HGB. Population-based cohort study of microbial keratitis in Scotland: Incidence and features. *Cont Lens Ant Eye*, 1999;22: 49-57.

- Sente C, Erume J, Naigaga I, Magambo PK, Ochwo S, Mulindwa J, Namara BG, Charles DK, Sebyatika G, Muwonge K, Ocaido M. Occurrence and genetic characterization of *Acanthamoeba* spp. from environmental and domestic water sources in Queen Elizabeth Protected Area, Uganda. *Parasites&Vectors*, 2016; 9, 127.
- Sharma S, Srinivasan M, George C. *Acanthamoeba* keratitis in noncontact lens wearers. *Arch Ophthalmol*, 1990; 108: 676-8.
- Simmons PA, Tomlinson A, Seal DV. The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. *Optom Vis Sci*, 1998;75: 860-6.
- Singh BN, Das SR. Studies on pathogenic and nonpathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order Amoebida. *Phil Trans R Soc Lond*, 1970; 259: 435-76.
- Singh BN. Nuclear division in nine species of small freeliving amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. *Phil Trans R Soc Lond*, 1950; 236: 405-61.
- Stehr-Green JK, Baily TM, Visvesvara GS. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol*, 1989;107: 331-6.
- Steinert M, Birkness KK, White E, Fields B, Quinn F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*, 1998;64: 2256-61.
- Tomlinson A, Simmons PA, Seal DV, McFadyen AK. Salicylate inhibition of *Acanthamoeba* attachment to contactlenses: A model to reduce risk of infection. *Ophthalmol*, 2000;107:112-7.
- Tomlinson G, Jones EA. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochim Biophys Acta*, 1962;63: 194-200.
- Tripathi RC, Tripathi BJ. Lens spoilage. *Contact Lenses: The Contact Lens Assoc. Ophth. Guide to Basic Science and Clinical Practice* (Diabetes O, ed.), Grune and Stratton, Orlando, FL, 1984; 45.1-45.33.
- Valladares M, Batlle MR, Carmen M, Atteneri MN, Alexis LA, Carolina DG, Martínez WE, Carretero JE, Basilio P, Valladares J, Lorenzo M. Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Archive Microbiol*, 2015;197(5): 639-43.

- Visvesvara GS. Classification of *Acanthamoeba*. Rev Infect Dis, 1991;13 (suppl 5): S369-S372.
- Volkonsky M. *Hartmanella castellanii* Douglas, et classification des hartmannelles. Arch Zool Exp Gen, 1931;72:317-39.
- Walochnik J, Duchene M, Seifert K, Obwaller A, Hottkowitz T, Wiedermann G, Eibl H, Aspöck H. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. Antimicrob Agents Chemother, 2002;46:695-701.
- Weisman RA. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. Annu Rev Microbiol 1976;30: 189-219.
- Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, Daley TE. Diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in vivo with confocal microscopy. Cornea, 1995;14: 10-7.
- Yagita K, Endo T. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. J Protozool, 1990; 37: 570-5.
- Yazar S, Gürbüz E, Sönmez FM, Çetinkaya Ü, Kuk S, 2019. Türkiye’deki sularda serbest yaşayan potansiyel patojen amipler ve patojenitelerinin in vivo olarak araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2019; 50(3): 449-59.
- Yu HS, Hwang MY, Kim TO, Yun HC, Kim TH, Kong HH, Chung DI. Phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* spp. based on PCR-RFLP analyses of mitochondrial small subunit rRNA gene. Korean J Parasitol, 1999; 37: 181-8.
- Yu HS, Kong HH, Kim SY, Hahn YH, Hahn TW, Chung DI. Laboratory investigation of *Acanthamoeba lugdunensis* from patients with keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004; 45: 1418-26.
- Yünlü Ö, Özçelik S, Arıcı, MK. Göz kapaklarından ve konjunktivadan alınan sürüntü örneklerinde *Acanthamoeba* ve diğer serbest yaşayan amiplerin araştırılması. Türkiye Parazit Derg, 2015;39, 194-9.

Farklı Su Kaynaklarından İzole Edilen Acanthamoeba Türlerinin Moleküler Prevalansı ve Genotiplerinin Belirlenmesi

ORIJINALLIK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET
KAYNAKLARI

%4

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

- | | | |
|---|--|-----|
| 1 | taxonomicon.taxonomy.nl
İnternet Kaynağı | %1 |
| 2 | www.turkiyeparazitolderg.org
İnternet Kaynağı | %1 |
| 3 | cms.galenos.com.tr
İnternet Kaynağı | <%1 |
| 4 | docplayer.biz.tr
İnternet Kaynağı | <%1 |
| 5 | DOĞAN, Süheyla, YAZAR, Süleyman and KUK, Salih. "Toprakta serbest yaşayan ve insanda parazitlenebilen bazı amiplerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu", Fırat Üniversitesi, 2013.
Yayın | <%1 |
| 6 | femsre.oxfordjournals.org
İnternet Kaynağı | <%1 |
| 7 | YAZAR, Süleyman, GÜRBÜZ, Esra, SÖNMEZ, | <%1 |

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Burcu CENİKLİOĞLU

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 18.04.1990/Samsun

Medeni Durumu: Bekar

Tel: 05546200813

Email: burcu_cenikli@hotmail.com

Yazışma Adresi: Demircili Mahallesi Şehit Yüksel Batır Caddesi Hükümet Konağı İlçe Tarım
Müdürlüğü Kat:2 Kumru/Ordu

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Samsun Anadolu Lisesi	2003-2007
Lisans	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2007-2015
Yüksek Lisans	Erciyes Üni. Veteriner Fak. Parazitoloji Anabilim Dalı	2017-2019

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017-Halen	Kumru İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce, orta