

ŞEYMA EFE

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ÇEVRESEL SU ÖRNEKLERİNDE *Acanthamoeba* spp.'nin
KÜLTÜR VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE
ARAŞTIRILMASI

ŞEYMA EFE

DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZDEN BORAL

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgileriyle katkı sunan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN'a ve değerli Ana Bilim Dalı hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışma sürecimde danışmanlığımı üstlenerek çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, destek olan, her türlü bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özden BORAL'a,

Çalışma sonucunda çıkan verileri istatistiksel olarak analiz etmemizde katkıları için Sayın Prof. Dr. Halim İŞSEVER'e,

Bana destek olup yardımlarını esirgemeyen Parazitoloji Bilim Dalı çalışanlarından Biyolog Ilgın KARA ve Biyolog Hüseyin ŞAHİN'e,

Hayatım boyunca ihtiyaç duyduğum tüm zamanlarda olduğu gibi tez çalışma sürecim boyunca hep yanımda olan, bana güç veren, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen bu günlere gelmemde pay sahibi olan canım aileme, varlıklarıyla bile her zaman yanımda hissettiğim bütün dostlarıma,

Tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:38220

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Suyun Varlığı ve Önemi	2
2.2. Su Kaynaklı Protozoonlar	3
2.3. <i>Acanthamoeba</i> spp. Tarihçesi	4
2.4. <i>Acanthamoeba</i> 'nın Sınıflandırılması ve Genotipleri	5
2.4.1. <i>Acanthamoeba</i> spp. sınıflandırılması	5
2.4.2. <i>Acanthamoeba</i> Genotipleri	6
2.5. <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin Morfolojik Formları ve Yaşam Döngüsü.....	8
2.6. <i>Acanthamoeba</i> Epidemiyolojisi	12
2.7. <i>Acanthamoeba</i> Virülans Faktörleri	13
2.8. <i>Acanthamoeba</i> Enfeksiyonları	17
2.8.1. <i>Acanthamoeba</i> Keratiti	17
2.8.2. Granülatöz Amip Ensefaliti (GAE)	18
2.8.3. Kutanöz <i>Acanthamoeba</i> Enfeksiyonu	19
2.9. <i>Acanthamoeba</i> spp. Tanısı	20
2.9.1. <i>Acanthamoeba</i> spp. Tanısında Mikroskopik Yöntemler.....	20
2.9.2. <i>Acanthamoeba</i> spp. Tanısında Kültür Yöntemleri.....	20
2.9.3. <i>Acanthamoeba</i> spp. Tanısında Boyama Yöntemleri.....	21
2.9.4. <i>Acanthamoeba</i> spp. Tanısında Serolojik Yöntemler.....	21
2.9.5. <i>Acanthamoeba</i> spp. Tanısında Moleküler Yöntemler.....	22
2.10. <i>Acanthamoeba</i> spp. Korunma	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24

3.1. Çalışma Sahasının Seçilmesi ve Örneklerin Toplanması	24
3.2. Su Örneklerinin Filtrelenmesi.....	24
3.2.1. Su Örneklerinin Filtrelenmesinde Kullanılan Gereçler	24
3.2.2. Su Örneklerinin Filtrelenmesi	25
3.3. Kültür Yöntemi	26
3.3.1. Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (LABM – United Kingdom).....	26
3.3.2. Besinsiz Non-Nutrient Agar(NNA)	26
3.3.3. Buffered Charcoal – Yeast Extract Agar (BCYE) (BD BBL, France)	27
3.4. DNA İzolasyon Aşaması.....	27
3.4.1. DNA İzolasyon Aşamasında Kullanılan Gereçler	27
3.4.2. Kültür Örneklerinin DNA İzolasyonu Aşaması.....	28
3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR) Aşaması	30
3.5.1. RT-PCR Test Prosedürü.....	30
3.5.2. Sonuçların Yorumlanması.....	30
3.6. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	32
5.TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	49
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	57

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2. 1 <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin taksonomik sınıflandırılması	5
Tablo 2. 2 <i>Acanthamoeba</i> genotipleri ve insanlarda görülen hastalıklar ile ilişkisi	6
Tablo 2. 3 <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılması.....	11
Tablo 3. 1 Kültür örneklerinin izolasyon kitinin içerisindeki malzemeler	28
Tablo 3. 2 RT-PCR çalışma protokolü	30
Tablo 3. 3 RT-PCR sonuçların yorumlanması.....	30
Tablo 4. 1 NNA- <i>E.coli</i> Besiyeri ve BCYE Besiyeri <i>Acanthamoeba</i> spp. pozitiflik karşılaştırması	33
Tablo 4. 2 Örneklerin alındığı yer - tarih bilgisi ve <i>Acanthamoeba</i> spp. tanısında kullanılan yöntemlerin pozitiflik karşılaştırılması	35
Tablo 4. 3 <i>Acanthamoeba</i> spp. tespitinde NNA- <i>E.coli</i> ve RT-PCR pozitiflik karşılaştırılması.....	41
Tablo 4. 4 <i>Acanthamoeba</i> spp. tespitinde BCYE ve RT-PCR pozitiflik karşılaştırılması	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1 Su kalitesini etkileyen faktörler	3
Şekil 2. 2 <i>Acanthamoeba</i> spp. trofozoit hali	9
Şekil 2. 3 <i>Acanthamoeba</i> spp.kisti	10
Şekil 2. 4 <i>Acanthamoeba</i> spp. yaşam döngüsü ve insanlarda oluşturduğu enfeksiyonlar	12
Şekil 2. 5 1990-2018 yılları arasındaki GAE vakalarının ülke bazında dağılımı	13
Şekil 2. 6 <i>Acanthamoeba</i> keratitinin (AK) klinik evriminin temsili görüntüleri.....	17
Şekil 2. 7 Granülomatöz Amip Ensefaliti	19
Şekil 2. 8 (a) <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin neden olduğu kutanöz lezyonlar. (b) <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin trofozoitleri. Hematoksilen ve eozin boyama, ×400	20
Şekil 3. 1 Örneklerin toplandığı şehirler.....	24
Şekil 3. 2 Membran filtrasyon sistemi	25
Şekil 4. 1 a. BCYE besiyerinde <i>Acanthamoeba</i> trofozoiti (X40) b. NNA- <i>E.coli</i> besiyerinde <i>Acanthamoeba</i> kistleri (X40)	32
Şekil 4. 2 NNA- <i>E.coli</i> besiyerinde laktofenol pamuk mavisi ile boyanmış <i>Acanthamoeba</i> kistleri (X40).....	33
Şekil 4. 3 NNA- <i>E.coli</i> besiyerinde tespit edilen kist görüntüleri	34
Şekil 4. 4 Bazı <i>Acanthamoeba</i> spp. pozitif örneklerinin RT-PCR grafiği.....	34
Şekil 4. 5 <i>Acanthamoeba</i> spp. tespitinde kullanılan yöntemlerin pozitiflik karşılaştırılması.....	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**KISALTMALAR**

AK: *Acanthamoeba* keratiti

AIDS: Acquired immüne deficiency syndrome (Kazanılmış immün yetmezlik sendromu)

BCYE: Buffered charcoal yeast extract

BOS: Beyin omurilik sıvısı

BHI: Brain heart infusion

CDC: Centers for diseases control and prevention (Hastalık kontrol ve koruma merkezi)

DNA: Deoksiriboz nükleik asit

DSÖ: Dünya sağlık örgütü

FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon

GAE: Granülomatöz amebik ensefalit

HIV: Human Immunodeficiency Virus (İnsan immün yetmezlik virüsü)

IIF: İndirektimmün fluoressan

LBP: Laminin bağlayıcı protein

MBP: Mannoos bağlayıcı protein

NNA: Non-nurient agar

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SYA: Serbest yaşayan amipler

SEMBOLLER

°C: Santigrat derece

%: Yüzde

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

χ² : Ki-kare



ÖZET

EFE, Şeyma. (2023). **Çevresel Su Örneklerinde *Acanthamoeba* spp.'nin Kültür ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması**. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2023.

Serbest Yaşayan Amiplerden *Acanthamoeba* spp. çevrede suda, toprakta ve havada bulunabilmektedir. *Acanthamoeba* spp.'nin yaşam döngüsünde iki formu bulunmaktadır. Bunlar trofozoit ve dirençli kist formudur. Toprakta ve suda genellikle trofozoit formunda çevre koşulları kötüleştiğinde ise kist formunda bulunmaktadır. Trofozoitlerin çapı genellikle 12-35 µm aralığında olup farklı türler/genotipler arasında önemli ölçüde farklılık görülmektedir. Gözün kornea tabakasına yerleşerek *Acanthamoeba* keratitine (AK) beyne yerleşerek de granülomatöz amebik ensefalit (GAE) sebep olabilmektedir. Bu çalışmada amacımız *Acanthamoeba* spp.'nin çevresel su örneklerinde varlığını araştırmaktır. Bu amaçla Türkiye'nin farklı bölge ve şehirlerinden havuz, deniz, göl, baraj, nehir, kaplıca suyu olmak üzere toplam 100 su örneği toplamış NNA-*E.coli* ve BCYE besiyerlerine kültüre edilmiştir. 100 örneğin kültür sonuçları besiyeri ayırımı yapılmaksızın 27 (%27) *Acanthamoeba* spp. tespit edilmiştir. NNA-*E.coli* besiyerinde 22 (%22) BCYE besiyerinde 19 (%19) *Acanthamoeba* spp. üretilmiştir. İki besiyeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. RT-PCR yöntemi ile toplam 25 *Acanthamoeba* spp. saptanmıştır (%25). Besiyerlerinin RT-PCR ile uyumu kapa katsayısı hesaplanarak istatistiksel olarak ($p < 0.005$) anlamlı ve iki yönlü olarak kabul edilebilir bulunmuştur. *Acanthamoeba* spp. kisti saptanan örnekler morfolojik kriterlere göre değerlendirilmiştir. Kistlerin büyüklük ve şekilleri baz alınarak yapılan sınıflamada ağırlıklı olarak tespit edilen örneklerin grup II ve grup III'e ait oldukları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Acanthamoeba* spp., Çevresel Su Örnekleri, Real Time PCR, Kültür

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38220

ABSTRACT

EFE, Şeyma. (2023). **Investigation of the *Acanthamoeba* spp. by Culture and Molecular Methods in Environmental Water Samples**. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology. Master Thesis. Istanbul 2023.

The free-Living Amoeba of *Acanthamoeba* spp. can be found in water, soil and air in the environment. There are two forms in the life cycle of *Acanthamoeba* spp. which are the trophozoite and resistant cyst form. They are usually found in the form of trophozoites in soil and water, and in the form of cysts when the environmental conditions deteriorate. The diameter of the trophozoites generally range between 12-35 µm, with significant differences between different species/genotypes. They may cause *Acanthamoeba* keratitis (AK) by settling in the cornea layer of the eye, and granulomatous amebic encephalitis (GAE) by settling in the brain. The aim of the present study is to investigate the presence of *Acanthamoeba* spp. in environmental water samples. Therefore, a total of 100 different regions and cities of Türkiye were collected and cultured on NNA-*E.coli* and BCYE media. After culturing of 100 specimens. 27 (27%) *Acanthamoeba* spp. were detected 22 (22%) *Acanthamoeba* spp. were produced in NNA-*E.coli* medium and 19 (%19) were produced in BCYE medium. No significant difference was detected between the two media. A total of 25 *Acanthamoeba* spp. were detected (25%) with the RT-PCR method. The compliance of the media with RT-PCR was found to be statistically significant ($p < 0.005$) and bidirectionally acceptable by calculating the kappa coefficient. The samples which were detected to have *Acanthamoeba* spp. cysts were evaluated in accordance with the morphological criteria. The detected samples mainly belonged to the Group II, and Group III in the classification performed based on the size and shape of the cysts.

Keywords: *Acanthamoeba* spp., Environmental Water Samples, Real Time PCR, Culture

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit.
Project No: 38220

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest yaşayan amipler (SYA) doğada, toprak ve sularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu amipler kozmopolit dağılım gösterirken zorlu koşullarda hayatta kalabilmektedirler. SYA'lerden *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Sappinia* cinslerindeki bazı tür ve genotipler insalarda enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Castrillón ve Orozco, 2013; Schuster ve Visvesvara, 2004). SYA arasında doğada en yaygın olan *Acanthamoeba* türleridir. Özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Predispozan koşullar diyabet, AIDS, siroz, HIV enfeksiyonu, kronik böbrek yetmezliği, sistemik lupus, malignite, kemoterapi ve kök hücre transplantasyonu dahil olmak üzere organ transplantasyonlarını içermektedir (CDC, 2012; Satlin ve ark., 2013). *Acanthamoeba* suda (musluk, kuyu, havuz, kaplıca, baraj, göl, deniz), havada, toprakta (sahil kumları, saksı toprağı) bulunabilmektedir. Bulaşma yolları arasında, solunum yoluyla rüzgarla taşınan kistlerin solunması, doğrudan cilt teması ve hematojen yayılım yer almaktadır (Schuster ve Visvesvara, 2004). Ayrıca kontakt lens kullanan kişilerde keratit etkeni olduğu bildirilmiştir. Bugüne kadar *Acanthamoeba*'nın 23 farklı genotipi (T1-T23) tanımlanmıştır (C. Putaporntip ve ark., 2021). *Acanthamoeba* spp. çoğunlukla sessiz başlayan fakat kronik seyreden ölümcül Granülomatöz Amibik Ensefalite (GAE) neden olmaktadır. GAE'nin kuluçka süresi birkaç haftadan aylara kadar değişebilir. GAE'li hastalar ateş, baş ağrısı, kusma, nöbetler, duyu değişiklikleri ve bilinç kaybı ile hastaneye başvurmaktadır. Hastalık ilerledikçe kafa içi basınç, nöbetler, bilinç kaybı, koma ve ölüm meydana gelmektedir (Raju ve ark., 2022). *Acanthamoeba* enfeksiyonlarından bir diğeri *Acanthamoeba* keratiti (AK)'dir. Korneanın nadir görülen bir enfeksiyonudur. Kontakt lens kullanımı, AK için önde gelen risk faktörüdür. Serolojik araştırmalar, AK geçmişi olmayan bireylerin %90-%100 'ünün *Acanthamoeba* antijenlerine özgü antikörlere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu maruz kalmanın yaygın ancak hastalığın oldukça nadir olduğunu gösterir (Raju ve ark., 2022).

Çalışmamızda Türkiye'nin çeşitli şehirlerinden toplanan çevresel su örneklerinde, *Acanthamoeba* spp. varlığının farklı kültür ve moleküler yöntem ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Suyun Varlığı ve Önemi

Bütün canlılar için vazgeçilmez bir kaynak olan su, yaşamsal önem taşır. İnsanlığın suyla ilişkisi tarih boyunca artarak devam etmiş, artan nüfus, gelişen şehirleşme ve değişen yaşam standartlarıyla birlikte suya olan ihtiyaç da artmıştır. Dünya'nın 2/3'ü sularla kaplı olmasına rağmen içilebilir su kaynakları oldukça kısıtlıdır. Yeryüzünde bulunan toplam su miktarının %97.5'ni tuzlu sular, %2.5'ini tatlı sular oluşturmaktadır. Su kaynaklarının kısıtlılığı yanı sıra çeşitli nedenlerle kirlenmesi küresel bir sorun haline gelmiştir (Karaman ve Gökalp, 2010; Tombul, 2014). Dünyada su kirliliği çeşitli hastalıkların gelişimine zemin hazırlamakta ve bu nedenle her gün yaklaşık 14.000 kişi hayatını kaybetmektedir (Chaudhry ve Malik, 2017). Su kirliliğine neden olabilecek birden fazla etken bulunmaktadır. Bu kirlilik hem doğal hem de insan kaynaklı faaliyetlerden kaynaklanabilir. Su kalitesini etkileyen doğal faktörler hidrolojik, iklimsel, atmosferik, topografik ve litolojiktir. Su kalitesini olumsuz etkileyen insan faaliyetleri ise madencilik, hayvancılık, atık su yönetiminin kalitesi, arazi kullanımı değişikliği ve ağır metal kirliliği nedeniyle artan tortu akışı veya toprak erozyonudur. Kirlilik tesise ve su kullanım şekline göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin ağır sanayi bölgesine yakın su kütleleri, üretim sürecinin bir yan ürünü olarak boşaltılan ağır metallere ve tehlikeli maddelere karşı oldukça hassastır. Çevresindeki sulak alanlar ve su kaynakları tarım arazileri gübrelere ve pestisit kalıntılarına maruz kalabilir. Bu kirlenmelere ek olarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) çevresel sularda kirlenmeyi etkileyen etmenlere hastalık yapan mikroorganizmalar, radyoaktivite ve zirai ilaçları da dahil etmektedir (Şekil 2.1). İstatistiklere göre, dünya nüfusunun dörtte birinin güvenli su kaynağına erişimi bulunmadığından su ile ilgili hastalıkların yaygınlaşması kaçınılmazdır (Syeed ve ark., 2023; WHO, 2018).



Şekil 2. 1 Su kalitesini etkileyen faktörler

2.2. Su Kaynaklı Protozoonlar

Su kaynaklı bulaşabilen mikroorganizmalar, dünyada önemli bir morbidite ve mortalite sebebi olarak kabul edilmektedir ve özellikle, gastrointestinal sistemi etkileyen, birçok hastalığa neden olmaktadır. Her yıl 2,2 milyondan fazla insanın ölümünden sorumlu tutulmaktadır. 1991'den 2008'e kadar dünya çapındaki su kaynaklı salgınların %11'ine parazitlerin neden olduğu belirlenmiştir (Efstratiou ve ark., 2017). Parazitler, bakteri ve virüslerle karşılaştırıldığında genellikle gıda kaynaklı veya su kaynaklı hastalıkların etiyolojik ajanları olarak ne yazık ki göz ardı edilmektedir. Bunun nedeni enfeksiyon ile semptomlar arasında uzun bir süre olmasıdır (Almeria ve ark., 2021). İçme ve yüzme sularının patojen protozoonlar ile kontaminasyonu ve kanalizasyon suyunun tarımsal amaçlı kullanımı dünya çapında milyonlarca insan için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bazı parazit türleri içme suyu yoluyla insana bulaşabilir ve enfeksiyonlara neden olabilir. *Cryptosporidium* spp. ve *Giardia* spp. su kaynaklı salgınlarla ilişkili ana protozoonlardır (Baldursson ve Karanis, 2011). Ayrıca *Cyclospora cayatanensis*,

Toxoplasma gondii, *Cystoisospora belli*, *Balantidium coli*, *Blastocystis* spp., *Entamoeba histolytica* ve *Acanthamoeba* spp. ve *Naegleria* spp. ihmal edilen su kaynaklı protozoonlardır (Plutzer ve Karanis, 2016).

Serbest yaşayan amipler (SYA), hayatta kalmak için konak organizmaya ihtiyaç duymayan her yerde bulunabilen protozoonlardır. Su veya toprak gibi doğal ortamlarda diğer mikroorganizmalar ile etkileşime girebilecekleri musluk suyu, yüzme havuzları gibi insan yapımı ortamlarda bulunurlar. Hastane su sistemlerinde bulunan amipler, potansiyel patojen mikroorganizmalar için bir rezervuar görevi görebilir ve bu nedenle hastane enfeksiyonlarında rol oynayabilirler (Cateau ve ark., 2014).

Farklı su kaynaklarında ve toprakta yaygın bir şekilde bulunan SYA çevrede büyüme yeteneğine sahip olup insan vücudunda da rahatlıkla yayılma yeteneğine sahiptirler. *Acanthamoeba*, *Naegleria* ve *Balamuthia* en önemli serbest yaşayan amiplerendir. *Acanthamoeba* cinsi diğerlerine göre daha yaygındır. *Acanthamoeba* sağlıklı insanlarda amipli keratite (AK) neden olarak görme kaybı ve körlüğe neden olabilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde Granülomatöz Amip Ensafaliti (GAE), akciğer ve deri enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (Saburi ve ark., 2017).

2.3. *Acanthamoeba* spp. Tarihçesi

İlk defa 1930 yılında *Acanthamoeba* cinsi amipler, Sir Aldo Castellani tarafından, *Cryptococcus pararoseus* kültüründe bulunmuş ve tanımlanmıştır. *Acanthamoeba* cinsi daha sonra 1931 yılında Volkonsky tarafından sınıflandırılmıştır (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). 1958 yılında Clyde G. Culbertson ve arkadaşları çocuk felci aşısının geliştirilmesi sırasında hücre kültürlerini kontamine eden *Acanthamoeba*'lar ile farelerde oluşan ensefaliti bildirmişlerdir. İlk kez bu organizmaların patojenik potansiyeli olduğu, maymun böbrek hücre kültürleri üzerine sitopatik etkisi ve laboratuvar hayvanlarını öldürme yeteneği ile kanıtlamıştır (Khan, 2006). 1972 yılında Jager ve Stamm ilk kez insanlarda GAE tanımlamışlardır (Jager ve Stamm, 1972; Khan, 2006). İlk *Acanthamoeba* kaynaklı keratit olgusu ise Nagington ve arkadaşları tarafından 1974 yılında rapor edilmiştir (Nagington ve ark., 1974). Sawyer ve Griffin 1975 yılında *Acanthamoebidae* ailesini keşfetmiş ve Page 1988 yılında Hartmannella'yı Hartmannellidae ailesi içerisine yerleştirmiştir. Yunancada 'Acant:sivri uç' ön eki bu amiplerin yüzeyinde omurga benzeri sivri yapıların (*acanthopodia* olarak bilinen) varlığını belirtmek için eklenmiştir (Sawyer ve Griffin, 1975). *Acanthamoeba* ilk olarak

Rowbotham tarafından 1980 yılında Lejyoner hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. O zamandan bu yana *Acanthamoeba* spp.'nin tanısı, tedavisi, diğer organizmalar ile etkileşimi alanında dünya çapında araştırmalar ilgi çekici bir şekilde artış göstermiştir (Rowbotham, 1980).

2.4. *Acanthamoeba*'nın Sınıflandırılması ve Genotipleri

2.4.1. *Acanthamoeba* spp. sınıflandırılması

Tablo 2. 1 *Acanthamoeba* spp.'nin taksonomik sınıflandırılması (Khan, 2006; Taxonomy, 2022).

Alem	Protista			
Altalem	Protozoa			
Şube	Sarcomastigophora			
Altşube	Sarcodina			
Süpersınıf	Rhizopodea			
Sınıf	Lobosea			
Altsınıf	Gymnamoebia			
Takım	Amoebida			Schizopyrenida
Aile	Entamoebidae	Hartmannellidae	Acanthamoebiae	Vahlkampfiidae

Cins	<i>Entamoeba</i>	<i>Hartmonella</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Balamuthia</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Vahlkampfia</i>
------	------------------	--------------------	---------------------	-------------------	------------------	--------------------

2.4.2. *Acanthamoeba* Genotipleri

SYA'dan *Acanthamoeba* spp. çevrede kolaylıkla bulunmaları ve kistlerinin zorlu çevre koşullarına, dezenfektanlara, bazı su arıtma uygulamalarına dirençli olmasından dolayı insan sağlığı için ciddi bir tehdit olmaktadır. *Acanthamoeba* cinsinin ayrımı genel olarak Pussard ve Pons'a göre kistlerin morfolojik özelliklerine dayanmaktadır. Bununla birlikte, bu sınıflandırmanın tutarsız olduğu gösterilmiştir çünkü sınıflama ve moleküler tiplendirme arasındaki korelasyonlarda uyumsuzluk görülmüştür. Bir morfolojik tanımlanmış tür, birden fazla genotipe karşılık gelebilir ve bunun tersi de geçerli olabilmektedir (Gast ve ark., 1996; Khan ve Tareen, 2003; Magnet ve ark., 2014). Daha objektif bir sınıflandırmaya yönelik ilk girişim, izoenzim sınıflamasına dayanmaktadır fakat bu da durumu daha net bir hale getirmemiştir. Bu nedenle Gast ve arkadaşları 1996'da 18S ribozomal RNA tam gen sekansına dayanan bir *Acanthamoeba* sınıflandırması önermişlerdir ve yeni bir genotipin tanımlanması için kullanılan parametre %6'lık bir benzerlik değeri kullanılarak T1 ile T4 adlı dört farklı genotip bulmuşlardır (Gast ve ark., 1996; Magnet ve ark., 2014). PCR ve dizileme teknolojilerinin ilerlemesiyle, *Acanthamoeba* cinsi, neredeyse tamamen 18S rRNA gen dizilerine dayalı olarak 22 genotipe (T1 ile T22) yeniden sınıflandırılmıştır. Farklı genotipler, \geq %5 dizi benzerliği olan cut-off değeriyle ayırt edilebilmektedir (Fuerst ve Booton, 2020). Dünya çapındaki çoğu çalışma, çevresel ve klinik *Acanthamoeba* izolatlarının T4 genotipinin baskın olduğunu göstermiştir (Bunsuwansakul ve ark., 2019; Daniele Corsaro ve ark., 2017; Jercic ve ark., 2019).

Tablo 2. 2 *Acanthamoeba* genotipleri ve insanlarda görülen hastalıklar ile ilişkisi (D. Corsaro ve ark., 2017; Jercic ve ark., 2019)

<i>Acanthamoeba</i> Genotipleri	İnsanlarda Görülen Hastalıklar ile İlişkisi
T1	Ensefalit
T2	Keratit
T3	Keratit
T4	Ensefalit, Keratit
T5	Keratit

T6	Keratit
T7	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T8	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T9	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T10	Ensefalit
T11	Keratit
T12	Ensefalit
T13	Keratit
T14	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T15	Keratit
T16	Keratit
T17	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T18	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T19	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T20	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T21	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor
T22	Hastalıkla ilişkisi bilinmiyor

Acanthamoeba'nın dünya genelinde hastalardan ve çevreden alınan örneklerde en sık rastlanan genotipi T4'tür (Tablo 2.2). Bu nedenle T4 genotipi, *Acanthamoeba*'nın diğer genotiplerine kıyasla en patojenik genotiptir, terapötik ajanlara karşı düşük duyarlılık göstermektedir (Hajjalilo ve ark., 2019). 2021 yılında yayımlanan Tayland'da yapılan bir çalışmada T23 olarak yeni bir genotip tanımlanmıştır. Yeni genotip T23'ün 18S rRNA geni, bilinen tüm genotiplerle karşılaştırıldığında %7,82 ile %28,44 dizi farklılık sergilediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere *Acanthamoeba*'nın daha fazla genotipinin olması muhtemeldir (Chaturong Putaporntip ve ark., 2021).

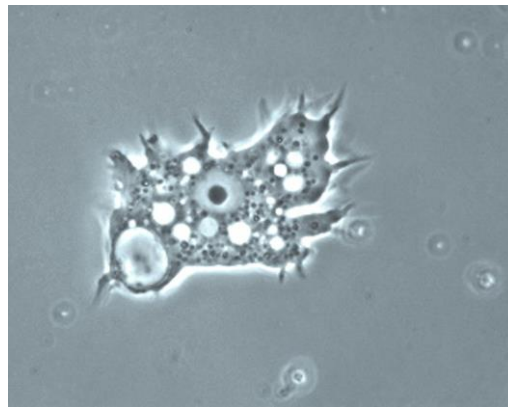
Genotiplemenin yanında kültürde üretilen izolatların fizyolojik özellikleri belirlenerek *Acanthamoeba*'nın karakterizasyonu yapılmıştır. *Acanthamoeba*'nın fizyolojik özelliklerinden bazıları, patojenite dereceleri ile ilişkilendirilerek patojenik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Örneğin enfeksiyona neden olan genotiplerin yüksek sıcaklıklara ve ozmolariteye direnç göstermesi gibi olumsuz çevre koşullarına amibin adaptasyon göstermesi ile ilişkili bulunmuştur. Fakat bazı sıcaklığa dirençli türlerin

mutlak surette enfeksiyona neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak, yüksek yapışma özelliği ve fagositoz yeteneği de genotipler arasında farklılık göstermektedir. Bu bilgilerden de yola çıkarak *Acanthamoeba* genotiplerinin birbirinden çok çeşitli ortam özelliklerinde bulunabildikleri yorumu yapılabilmektedir (Possamai ve ark., 2018).

2.5. *Acanthamoeba* spp.'nin Morfolojik Formları ve Yaşam Döngüsü

Acanthamoeba'nın yaşam döngüsünde iki formu bulunmaktadır. Bunlar trofozoit ve kist formudur. Hem kist hem trofozoit formu tek nükleusludur (Sriram ve ark., 2008). *Acanthamoeba*'nın hücrel organizasyonu elektron mikroskopu kullanılarak incelenmiştir. *Acanthamoeba* spp. trofozoitlerinde: ribozom, golgi cisimi, endoplazmik retikulum, sindirim vakuelleri ve mikrotübüller görülmüştür. Ayrıca *Acanthamoeba* trofozoitlerinde hücrenin su içeriğini kontrol eden sitoplazmada belirgin bir vakuol nükleus ve büyük merkezi yerleşimli bir nükleolus olduğu görülmüştür (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). Trofozoitlerin çapı genellikle 12-35 µm aralığındadır fakat türler ve genotipler arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Trofozoitler, yüzeylerinde acanthopodia olarak bilinen yalancı ayaklara sahiptir. Acanthopodia, besin yakalama, adezyon ve hücrel hareketleri sağlar. Trofozoit aşamasında, *Acanthamoeba* aktif olarak bakteri, maya, alg veya küçük organik partiküllerle beslenir ve hücre sitoplazmasında birçok besin vakuölü bulunur (Şekil 2.2). İkiye bölünerek çoğalır. *Acanthamoeba* spp. nötr pH'da, bol miktarda besin kaynağı, uygun sıcaklıkta (30 °C) ve 50-80 ozmolarite aralığında trofozoit formunu koruyabilir (Khan, 2006). *Acanthamoeba* beslenmesini reseptör aracılı fagositoz ve spesifik olmayan pinositoz ile gerçekleştirmektedir. Fagositoz, *Acanthamoeba* spp.'nin bakteri ile beslenmesine olanak vermektedir. SYA'nın yılda metrekare başına 900 grama kadar bakteri tükettiği bilinmektedir. Bu durum ekolojik olarak önemli olmakla birlikte *Acanthamoeba* özelinde düşünüldüğünde önemli klinik sonuçlara da sebep olabilmektedir. Hücre sindiriminde hayatta kalabilen, endosimbiyoz durumuna yol açan bakteriler ve ko-enfeksiyonlara sebep olarak doğru teşhisi geciktirip *Acanthamoeba* ile ilişkili enfeksiyonların tanısında süreci karmaşıktır. Bakteriler ile etkileşimleri özelliklerine göre 3 yönden incelenebilmektedir. İlki *Acanthamoeba* spp.'nin besin kaynağı olarak bakteriler ile beslenmesini inceleyen bakteriyel avcı

olarak sınıflandırılan gruptur. *Acanthamoeba* spp. hem Gram pozitif hem Gram negatif bakteriler ile beslenmektedir. *Acanthamoeba* spp. izolasyonunda besin kaynağı olarak sıklıkla Gram negatif bakteriler tercih edilmektedir. Bakteriler ile beslenebilme özelliği çevre şartlarına ve bakterilerin virülans özelliklerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bunlara ek olarak besin açısından fakir olan sularda patojen olmayan bakterileri besin olarak kullanmaktadır. Bu tür ortamlarda bakteriler fagositoz yolu ile alınır, ardından fagolizozomlarda parçalanır ve amibin besin ihtiyaçlarını karşılamak için kullanılmaktadır (Khan, 2006). Bakteriyel Truva atı olarak incelendiğinde ise *Acanthamoeba* patojenik bakterilerin amibi istila edip lizozomal ölümlerden kaçarak hücre içinde canlı kalıp duyarlı konakçılara taşınması durumunu içerir. ‘Truva atı’ terimi ‘taşıyıcı’ özelliğini belirtmek için kullanılmaktadır. Son çalışmalar, akciğer enfeksiyonuna neden olan *Burkholderia cepacia*’nın benzer şekilde solunum yolu hastalığına sebep olan *Chlamydomyxa pneumoniae* *Acanthamoeba* içinde kaldığını ancak çoğalmadığını göstermiştir. Son olarak *Acanthamoeba*’nın bakteri rezervuarı olarak kullanılması da önemli bir özelliktir. Burada ilişkili bakterilerin çoğunun insan patojeni olması dikkat çekmektedir. Bu, bakterilerin bir konakçıdan diğerine iletimi sırasında zorlu koşullarda dahi hayatta kalmasını sağlamasının yanında içinde çoğalmaları nedeniyle önemli bir özelliktir. *Acanthamoeba*’nın lejyoner hastalığına sebep olan *Legionella* spp., ishale sebep olan *Escherichia coli*, koleraya sebep olan *Vibrio cholerae*, mide ülserinin ana sebeplerinde olan *Helicobacter pylori* gibi bakterileri rezervuar olarak barındırabildiği bilinmektedir (Khan, 2006; R. Siddiqui ve N. A. Khan, 2012).



Şekil 2. 2 *Acanthamoeba* spp. trofozoit hali (Carnt ve Stapleton, 2016)

Bu durumların tam tersi olan zorlu koşullar yani ortamda yeterli besinin bulunmaması, artan ozmolarite veya düşük ozmolarite, sıcaklık ve pH durumlarının aşırı değişkenlik göstermesi *Acanthamoeba* spp.'nin trofozoit formdan kist formuna dönüşmesine sebep olmaktadır (Khan, 2006). *Acanthamoeba* kistleri 5-20 µm çapında olup türlere ve genotiplere göre değişkenlik gösterebilmektedir. *Acanthamoeba* kistleri ektokist ve endokist olmak üzere çift duvarlıdır. Ektokist amorf, bir tabaka olarak görünürken endokist ince taneli bir dokuya sahiptir (Şekil 2.3). Kist duvarları fiziksel bir engel oluşturulduğundan ilaçların etki etmesini zorlaştırmaktadır. Endokistin selüloz başta olmak üzere polisakkaritlerden oluştuğu, ektokistin ise proteinler ve polisakkarit karışımlarından oluştuğu bilinmektedir. Kistler hava yoluyla taşınabilir bu da *Acanthamoeba*'nın çevreye yayılmasına veya patojenlerin duyarlı konaklara taşınmasına yardımcı olmaktadır. Çalışmalar kistlerin patojenliklerini birkaç yıl koruyabildikleri ve *Acanthamoeba* spp. 'nin sebep olduğu enfeksiyonların bulaşmasında rol oynadığını bildirmektedir (Anwar ve ark., 2018; Khan, 2006). Kistler biyositlere, klorlanmaya ve antibiyotiklere dirençlidir. Kist duvarları, ilaçların duvar içine işleminde fiziksel engel sağladığından tedavi aşamaları için biyokimyasal süreçlerinin anlaşılması oldukça önemlidir. Dayanıklı dış duvarın temel yapısı anlaşıldığında kist duvarını parçalamak ve *Acanthamoeba*'nın meydana getirdiği enfeksiyonları da tedavi etmeye olanak sağlayacağı düşünülmektedir (Anwar ve ark., 2018).



Şekil 2. 3 *Acanthamoeba* spp.kisti (Carnt ve Stapleton, 2016)

Acanthamoeba cinsi toprak, hava, toz, tatlı su, yüzme havuzları, kaplıca suları, deniz suyu, lağım suları, çamur, diş tedavi üniteleri, diyaliz üniteleri, musluk suyu ve okyanus tortuları gibi insanların temasının fazla olduğu yerlerde yaşamaya adapte olmuşlardır. Son zamanlarda, tıbbi parazitologlar, cinsin çeşitli türlerinin, bağışıklığı baskılanmış bireylerde yaşamı tehdit eden GAE ve kontak lens kullanan bireylerde görmeyi tehdit

eden amebik keratite neden olduğu bilindiği için, *Acanthamoeba*'ya dikkat çekmişlerdir. *Acanthamoeba* keratit enfeksiyonu insidansı son 30 yılda katlanarak artmıştır (Awwad ve ark., 2007; Khan, 2006; Patel ve McGhee, 2009). *Acanthamoeba*'nın alt cins düzeyinde tanımlanması, morfolojik özelliklerle kolaylıkla gerçekleştirilmektedir. Pussard ve Pons *Acanthamoeba* cinsini kist boyutu ve diğer morfolojik özelliklerine göre 3 morfolojik gruba ayırmıştır (Tablo 2.3).

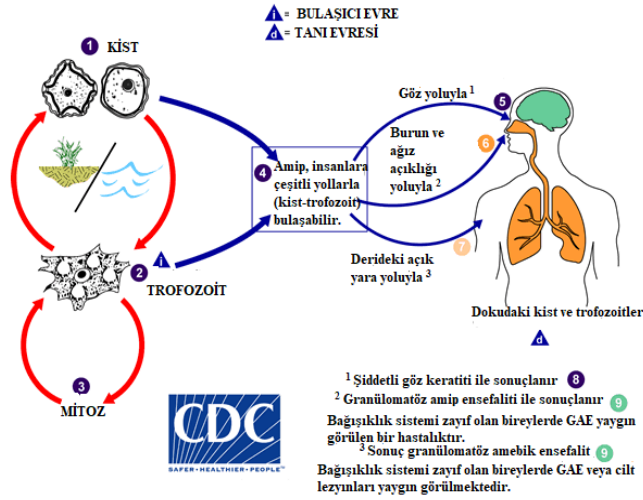
Grup I: Bu gruptaki türler, diğer gruplardaki türlere kıyasla daha büyük bir kiste sahip olmaları esas alınarak belirlenmiştir. Ortalama boyutu $\geq 18 \mu\text{m}$ olan en büyük kistlere sahiptirler. Grup I *Acanthamoeba* trofozoitleri de boyut olarak daha büyüktür ve boyutlarının 25 ile 35 μm arasında olduğu gösterilmiştir. Grup I'in belirlenmesinde kist boyutları önemli rol oynasa da endokist (iç duvar) yapıları ektokistten (dış duvar) geniş ölçüde ayrılmıştır. Bu gruptaki türler büyük ölçüde çevresel organizmalardır ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha az insan ve hayvan enfeksiyonuna neden olmaktadır.

Grup II: Bu gruptaki kist türlerin ortalama çapı $< 18 \mu\text{m}$ 'dir. Buruşuk bir ektokist ve yıldız şeklinde, çokgen, üçgen veya oval olabilen bir endokist ile karakterize edilmiştir. Grup I'de bulunan türlerden farklı olarak insan enfeksiyonlarının çoğuna bu gruptakilerin neden olduğu belirlenmiştir.

Grup III: Bu gruptaki kist türlerinin de ortalama çapı $< 18 \mu\text{m}$ 'dir, tipik olarak ince, pürüzsüz bir ektokist ve yuvarlak bir endokist ile tanımlanmıştır. Grup III'deki kistler ince, yumuşak, dalgalı ya da pürüzsüz bir ektokist ve yuvarlak bir endokist sergilerler (Chan ve ark., 2022; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003).

Tablo 2. 3 *Acanthamoeba* spp.'nin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılması (Khan, 2006).

Grup I	Grup II	Grup III	Grup III
<i>A.tubiashi</i>	<i>A.castellani</i>	<i>A.triangularis</i>	<i>A.culbertsoni</i>
<i>A.commandoni</i>	<i>A.polyphaga</i>	<i>A.lugdunensis</i>	<i>A.palestinensis</i>
<i>A.astronyxis</i>	<i>A.rhysodes</i>	<i>A.quina</i>	<i>A.pustulosa</i>
<i>A.echinulata</i>	<i>A.griffini</i>	<i>A.paradivionensis</i>	<i>A.royreba</i>
	<i>A.hatchetti</i>	<i>A.hatchetti</i>	<i>A.lenticulata</i>
	<i>A.divionensis</i>		



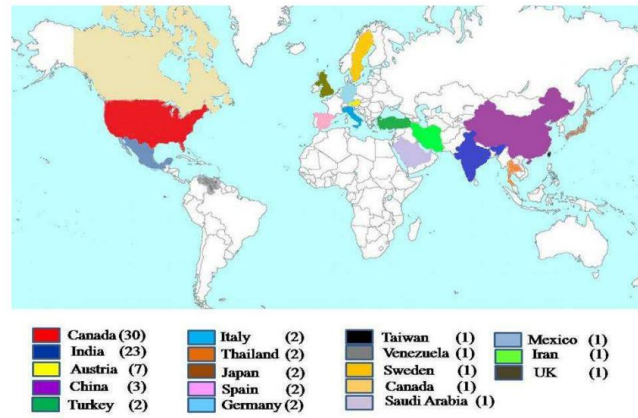
Şekil 2. 4 *Acanthamoeba* spp. yaşam döngüsü ve insanlarda oluşturduğu enfeksiyonlar (CDC, 2019)

Acanthamoeba spp. hem kist hem trofozoit formları insan vücuduna çeşitli yollarla göz, intranazal, yaralı cilt yoluyla girer (Şekil 2.4). *Acanthamoeba* spp. sağlıklı veya kontakt lens kullanan kişilerde keratite neden olabilmektedir. Bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde solunum sistemi veya deri yoluyla vücuda girdiğinde hematogen yayılım ile merkezi sinir sistemini invaze ederek GAE veya cilt lezyonlarına neden olabilmektedir (Khan, 2006; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Mungroo ve ark., 2022). *A.culbertsoni*, *A.polyphaga*, *A.castellanii*, *A. hatchetti*, *A.rhysodes*, *A.griffini*, *A.quina* ve *A.lungdunensis* dahil olmak üzere çeşitli *Acanthamoeba* türleri, insanları enfekte etmekte rol oynayan türlerdir (Yünlü ve ark., 2015).

2.6. *Acanthamoeba* Epidemiyolojisi

Acanthamoeba spp. hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelere görülmektedir. *Acanthamoeba* insidansı ülkelere göre büyük farklılık göstermektedir. *Acanthamoeba* insidansındaki bu farklılık, *Acanthamoeba*'nın çevresel olarak su, toprak, hava gibi farklı ortamlarda geniş bir yayılım göstermesi, dezenfektan ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gösterip kist formu ile zorlu çevre koşullarında hayatta kalabilmesi gibi birçok faktör ile ilişkilendirilmektedir (İbrahim ve ark., 2007). Naginton ve ark. 1974, Jin ve ark. ise 1992 yılında Çin'de ilk AK vakasını bildirmişlerdir. Türkiye'de ise ilk

AK vakası 1996 yılında ikinci vaka 1999 yılında bildirilmiştir. İlk tanıdan bu yana kontakt lensler ve travma AK için başlıca risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde AK ile ilgili en önemli risk faktörleri kontakt lens hijyeni ve suyun hijyeni olarak belirlenmiştir. Kontakt lensin ilk kez piyasaya sürüldüğü 1980'lerde Amerika Birleşik Devletlerin'de AK'de önemli bir artış görülmüştür. Gelişmekte olan ülkelerde ise oküler travma ve toz, çamur, su kontaminasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin Hindistan'daki AK vakalarının %53.1'i travma, %5'inden azı kontakt lens kullanıcıları olarak belirlenmiştir. AK dünya çapında nadir görülen bir hastalıktır. Bildirilen çalışmalarda çoğunlukla vaka serilerine yer verilip ulusal ölçekte epidemiyoloji hakkında daha az araştırmaya rastlanmaktadır (Akyol ve ark., 1996; Zhang ve ark., 2023). Özellikle immün sistemi baskılanmış ve zayıflamış hastalarda görülen ölümcül seyreden GAE bağışıklığı yeterli hastalarda da bildirilmiştir. GAE'nin ölüm oranı %97-98 civarındadır. Şekil 2.5'de 1990-2018 yılları arasında *Acanthamoeba*'nın neden olduğu GAE vakalarının dünya çapındaki dağılımını göstermektedir (Kalra ve ark., 2020).



Şekil 2. 5 1990-2018 yılları arasındaki GAE vakalarının ülke bazında dağılımı (Kalra ve ark., 2020)

2.7. *Acanthamoeba* Virülans Faktörleri

Acanthamoeba spp.'ye bağlı enfeksiyonların klinik belirtileri iyi belirlenmiş olmasına rağmen patogenezi ile ilişkili mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Patojenitenin moleküler olarak temelini anlamak terapötik müdahalelerin gerçekleşmesi için oldukça önemlidir. Patojenitenin hem parazit hem de konakçı tarafından birden çok faktörü

içeren karmaşık bir süreç olduğu ve bu parazitlerin insanlarda hastalık üretmesine neden olan veya buna izin veren tek bir belirleyici olmadığı bilinmektedir (Khan, 2003).

Acanthamoeba patojenitesine doğrudan katkıda bulunan faktörler:

- **Adezyon:** *Acanthamoeba* spp.'nin epitel hücrelerine bağlanabilme yeteneği enfeksiyonların temelini oluşturmaktadır. Akantopod ve yüzeye yapışma faktörleri farklı izolatların patojenitesi ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Son yapılan çalışmalar ile akantopod sayısının yapışma oranı ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. *Acanthamoeba* spp.'nin yüzeye yapışmasına temel olarak mannoz bağlayıcı protein (MBP) ve laminin bağlayıcı protein (LBP) adhezinleri aracılık etmektedir (Wang ve ark., 2023).
- **Fagositoz:** *Acanthamoeba* spp. fagositozdaki birincil rolü gıda parçacıklarını içine alarak beslenmektir. Fagositoz yoluyla aldığı patojenik bakterileri olumsuz çevre şartlarından koruyarak bünyesinde barındırmaktadır. Bünyesinde patojen bakterileri bulundurarak terapötik ajanlara karşı direnç geliştirebilmektedir. *Acanthamoeba* spp.'nin fagositik yollarıyla ilişkili mekanizmaların açıklanması, terapötik müdahalelerin geliştirilmesinde önemli katkılar sunacaktır (Lorenzo-Morales ve ark., 2015).
- **Ekto -ATPazlar:** Ekto-ATPazlar, plazma zarında bulunan glikoproteinlerdir. Ekto-ATPazlar hücre dışı ATP'yi ve diğer nükleosid trifosfatları hidrolize etmektedirler. Hidroliz sonrası ortaya çıkan ADP, konakçı hücreler üzerinde toksik etkiler oluşturabilmektedir. *Acanthamoeba* tarafından salınan ADP'nin, konakçı hücreler üzerindeki pürineerjik (P2Y2) reseptörlerine bağlanarak hücre içi Ca^{+2} 'da bir artışa neden olup kaspaz-3 aktivasyonunu indüklediğini ve sonunda apoptozla sonuçlanmaktadır (Khan, 2006).
- **Nöraminidaz:** *Acanthamoeba* reseptörleri, mannoza tepki ile nöraminidaz enzimi salgılamaktadır. Kornea hücrelerinden sialik asit salınımını desteklediği için nöraminidaz bu hücreler için tehlikelidir (Lorenzo-Morales ve ark., 2015).
- **Süperoksit dismutaz:** Süperoksit dismutazlar (SOD), patojenlerin enfeksiyonu sırasında reaktif oksijen türlerinden (ROS) ile savaşarak hücreleri korumada önemli rol almaktadır. *Acanthamoeba*, farklı oksidatif koşullarda hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir. *Acanthamoeba* spp.'de demir süperoksit dismutaz

(Fe-SOD) ve bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZn-SOD) olduğu bilinmektedir (de Obeso Fernandez del Valle ve Scheckhuber, 2022).

- **Plazminojen aktivasyonu:** *Acanthamoeba* spp. metalloproteazlar gibi konakçı proteolitik enzimleri aktive edebilen plazmin oluşturmak için konakçı plazminojenin bölünmesini katalize ederek plazminojen aktivatörü olarak görev almaktadır (Lorenzo-Morales ve ark., 2015).
- **Elastaz:** Elastazların elastin, lif, fibrinojen, kollajen ve proteoglikanlar gibi bağ doku proteinini bozduğu bilinmektedir. Geniş özgüllükte elastaz ürettiği bilinen *Acanthamoeba*'ların patogenezinde ve patofizyolojisinde rol almaktadır (Lorenzo-Morales ve ark., 2015)
- **Proteaz:** *Acanthamoeba* spp.'nin hem klinik hem de klinik olmayan izolatları proteaz aktiviteleri sergilemektedir. Ancak klinik izolatlarında daha büyük miktarlarda gözlenmektedir. Bu proteazların temel fizyolojik rolü, substratı beslenme amacıyla parçalamaktır. *Acanthamoeba*'nın sistein, serin ve metaloprotez ürettiği bilinmektedir (Khan, 2006).
- **Fosfolipaz:** Fosfolipazlar, gliserofosfolipidlerdeki ester bağına hidrolize eden ve membran bozulmalarına neden olabilen bir enzim grubudur. Fosfolipazların temel görevleri fosfolipitleri parçalamaktır. Fosfolipazlar fosfolipidleri parçaladıklarından, membran bozulmalarına neden olup konakçı hücre penetrasyonu ve hücre lizisine neden olduğu düşünülmektedir (Matin ve Jung, 2011).
- **Glikozidaz:** Glikozidazlar glikozidik bağına hidrolizini katalize etmektedir. Glikozidazlar doğada her yerde bulunmaktadır. *Acanthamoeba*, beta-glikozidaz, alfa-glikozidaz, beta-galaktozidaz, beta-N-asetil-glikozidaz, beta-N-asetil-galaktozaminidaz ve alfa-mannosidaz dahil olmak üzere glikozidaz aktiviteleri göstermektedir. *Acanthamoeba*'da bulunan glikozidazlar bakteri türlerinin hücre duvarlarının enzimatik parçalanmasında görev almaktadır (Lorenzo-Morales ve ark., 2015).
- **Acanthaporin:** Yapılan bir çalışma ile patojenik *Acanthamoeba culbertsoni* acanthaporin olarak adlandırılan gözenek oluşturucu bir protein tanımlanmıştır.

Tanımlanan bu proteinin insan nöron hücreleri için sitotoksik olduğu bulunmuştur. Bu etkisi ile patojeniteye katkı sağlamaktadır (Michalek ve ark., 2013).

Patojeniteye dolaylı yoldan katkı sağlayan özellikler ise:

- **Morfolojik özellikler:** Morfolojik özellikler bakımından incelendiğinde *Acanthamoeba* spp.'nin enfektif ve enfektif olmayan formları arasında morfolojik olarak belirgin bir farklılık bulunmamaktadır.
- **Fiziksel tolerans (osmotolerans, sıcaklık toleransı, farklı pH'larda büyüme):** Yüksek sıcaklık ve yüksek ozmolaritede büyüme özelliği enfektif formlarında görülmektedir.
- **Hücrel farklılaşma:** Çevresel koşullara göre kist veya trofozoit formuna dönüşerek hücrel farklılaşma ile hayatta kalarak patojenliğini koruyabilmektedir.
- **Kemotaksi:** Kemotaksis ile yüksek konsantrasyonda bulunan besinlere yönelik toksin özelliği bulunan ortamlardan kaçabilmektedir.
- **Biyofilm:** *Acanthamoeba* keratitinin patogeneğinde önemli bir rol oynayan biyofilmler intravenöz kataterler, kontakt lensler gibi ortamlarda oluşabilmektedir. Biyofilmler kuruduktan sonra dezenfektanlara karşı direnç sağlamaktadır.
- **İlaç direnci:** *Acanthamoeba* spp.'nin kist formunda endokist ve ektokist içeren çift duvarlı yapısı ile kemoterapötik ajanlara karşı fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır.
- **Her yerde bulunma:** *Acanthamoeba* spp. her yerde bulunması ile maruziyeti arttırmaktadır.

Bu özelliklerin tümü *Acanthamoeba* spp.'nin patojenitesine katkı sağlasa dahi hastalık üretme süreci patojenite ile sınırlı olmayıp konakçının özelliklerine göre de değişkenlik göstermektedir. (Khan, 2003, 2006; Lorenzo-Morales ve ark., 2015).

2.8. *Acanthamoeba* Enfeksiyonları

Acanthamoeba enfeksiyonlarının kuluçka süresi bilinmemekle beraber, klinik belirtilerinin ortaya çıkması için birkaç hafta veya birkaç ay gerekebilmektedir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). *Acanthamoeba* türleri başlıca 2 önemli hastalığa sebep olmaktadır. Bunlardan ilki görmeyi tehdit eden AK ve merkezi sinir sistemini enfekte eden GAE 'dir (Mungroo ve ark., 2022). *Acanthamoeba* türleri GAE ve AK'nin yanı sıra kutanöz lezyonlara da neden olmaktadır.

2.8.1. *Acanthamoeba* Keratiti

Acanthamoeba keratiti genel olarak kişisel hijyen eksikliği, uzun süre kontakt lens kullanımı, kontakt lenslerin uygun olmayan şekilde temizlenmesi, kontakt lenslerde biyofilm oluşumu ve buna maruz kalınmayı içeren çok faktörlü bir süreçtir. Hastalık genellikle kontakt lens kullanımı ile ilişki olsa da lens kullanmayan kişilerde de ortaya çıkabilmektedir. AK, epitelyal bariyerin yıkılması, amip tarafından stromal istila, yoğun bir inflamatuvar yanıt indüklenmesi, fotofobi ve son olarak kör edici sonuçları olan stromal nekrozu içermektedir (Şekil 2.6) (Ruqaiyyah Siddiqui ve Naveed Ahmed Khan, 2012). *Acanthamoeba* keratitinde sıklıkla sekiz tür izole edilmiştir. Bunlar: *A.castellanii*, *A.culbertsoni*, *A.rhysodes*, *A.lungdunensis*, *A.polyphaga*, *A.hatchetti*, *A.quina* ve *A.rhysodes*'tir. AK'nin klinik görünümü sıklıkla Herpes Simpleks Virüsü (HSV) keratiti ile karıştırılsa da, AK'deki kornea lezyonları sıklıkla karakteristik halka benzeri bir infiltrat sergilemektedir (Nieder Korn, 2021).



Şekil 2. 6 *Acanthamoeba* keratitinin (AK) klinik evriminin temsili görüntüleri

(Varacalli ve ark., 2021) Epitelyal keratopati (A, evre I), stromal tutulum (B , evre II) , epitelyal defekt ve

halka stromal infiltrat (C , D , evre III) ve derin ve yüzeysel neovaskülarizasyon ve kornea skarlaşması

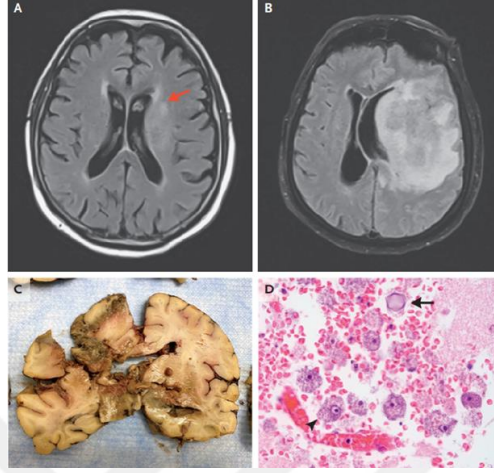
(E , F).

AK vakalarının büyük çoğunluğu kontakt lens kullanıcılarında meydana gelir ve ancak kontakt lens hijyenin sağlanması ile önlenir. Amipler musluk suyu veya hava yoluyla lens kutusuna erişebilmektedir. Lens kutuları dikkatli ve düzenli bir şekilde temizlenmez ise lens kutusu içerisinde hızla yüksek yoğunluklara ulaşır daha sonra lenslere yapışır oradan da göze bulaşabilir (Walochnik ve ark., 2015). AK'nin teşhisinin zor olmasının yanında mevcut olan tedaviler uzundur ve tüm suşlara karşı tam olarak etkili olmadığı bilinmektedir. Ayrıca AK'nin patogenezi hala araştırılmaya devam etmekte bu sürece dahil olan faktörlerin belirlenmesi, etkili tedavilerin geliştirilmesi için yardımcı olmaktadır. Tedavi sürecindeki zorlayıcı faktörlerin başında *Acanthamoeba*'nın dirençli kist evresi gelmektedir. AK hala nadir görülen bir hastalık kabul edilip Orphanet veri tabanına (ORPHA67043) dahil edilmektedir ve tahmini prevalansı 1-9/100.000'dir. Diğer amiplerin aksine *Acanthamoeba* türleri doku içerisinde kistler oluşturabilmektedir. Korneada yaşayan tek bir kist yeniden enfeksiyona yol açabileceğinden, tedavinin ilerleyişi düzenli olarak kontrol edilmelidir (Lorenzo-Morales ve ark., 2015).

2.8.2. Granülatöz Amip Ensefaliti (GAE)

GAE sıklıkla diyabet hastaları, sistemik lupus eritematozus (SLE), organ nakli hastaları, kanser tedavisi gören hastalar, HIV veya AIDS hastaları dahil olmak üzere bağışıklığı baskılanmış bireyler arasında görülen ilerleyici bir merkezi sinir sistemi enfeksiyonudur. GAE, dünya çapında nadir olarak karşılaşılsa da sıklıkla ölüme sonuçlanmaktadır. GAE'nin patogenezi ile ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Semptomlar genellikle baş ağrısı, bulantı, sinirlilik, baş dönmesi ve düşük dereceli ateş ile başladığından GAE bakteriyel menenjit, tüberküloz veya viral menenjit ile karıştırılabilmektedir. Diğer ilerleyici nörolojik semptomlar arasında mental durum değişikliği, nöbetler, konfüzyon, halüsinasyon, fokal nörolojik belirtiler, diplopi, kraniyal sinir felçleri, ataksi, sağ alt ekstremitede yüksek dereceli paralizisi, letarji, boyun tutulması yer almaktadır. GAE, artan kafa içi basıncı nedeniyle semptomların başlamasından bir ile iki ay sonra ölüme yol açan ilerleyici bir hastalıktır (Kalra ve ark., 2020). GAE teşhisi yaygın olarak *Acanthamoeba*'nın trofozoit ve kist formlarının mikroskopik olarak görülmesi ile yapılır. Beyin omurilik sıvısı (BOS), deri/sinüs/akciğer biyopsisi ve beyin doku biyopsisi (cerrahi işlem sonrası rezeksiyon ya da ölüm sonrası elde edilen) GAE teşhisi için tercih edilen örneklerdir. Deri lezyonları

genellikle yüzeyde veya ekstremitelerde eritematöz plaklar/ülserler şeklinde bulunabilmektedir. GAE vakalarında yüksek protein ve düşük/normal glikoz seviyeleri ile spesifik olmayan lenfosittik pleositoz gözlemlenir (Şekil 2.7) (Parija ve ark., 2015).



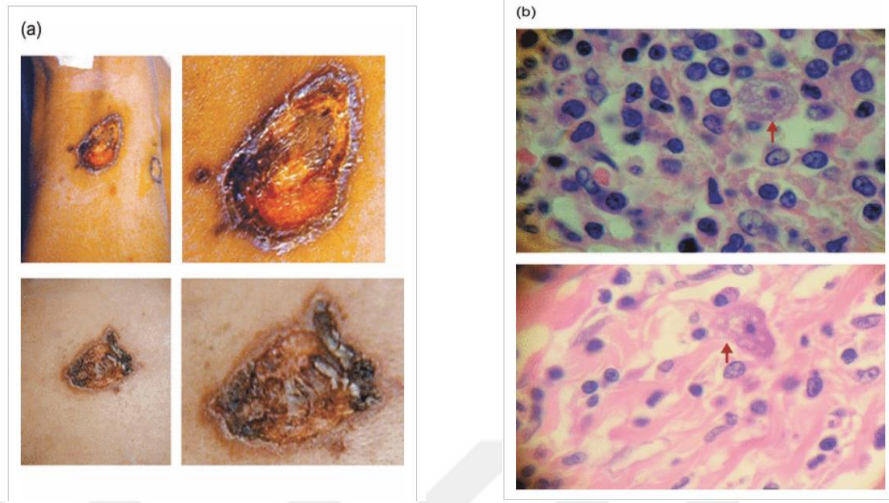
Şekil 2. 7 Granüloamatöz Amip Ensefaliti (Schimmel ve Mehta, 2020)

Şiddetli akut solunum sendromu Koronavirüs 2 (SARS CoV-2) hastaları immün düzensizlik ve kortikosteroid kullanımı gibi tedaviyle ilgili faktörler dahil olmak üzere, çeşitli şekillerde ikincil enfeksiyonlara yatkın hale getirmektedir. SARS CoV-2, tip I interferon sinyal yolunu inhibe ederek doğuştan gelen bağışıklık tepkisini azaltmaktadır. COVID-19 ayrıca işlevsiz olgun nötrofillerin ve nötrofil öncülerinin varlığı ve CD4 ve CD8 T hücrelerinin tükenmesi ile de karakterizedir. GAE, standart bir tedavi protokolü olmayan nadir olarak görülen ve ölümcül bir hastalıktır. Covid-19 hastalığı, bağışıklık sisteminin bozulmasına sebep olduğundan hastaları bu enfeksiyona yatkın hale getirebilmektedir. Bu sebeplerden ötürü COVID-19 hastalarının bu enfeksiyona yatkınlığındaki rolü göz ardı edilmemeli ve değerlendirilmelidir (Siripurapu ve ark., 2021).

2.8.3. Kutanöz *Acanthamoeba* Enfeksiyonu

İmmün yetmezliği olan hastalar, merkezi sinir sistemi tutulumu olmaksızın ve tedaviye iyi yanıt veren çoklu subakut kutanöz lezyonlara sahip olma eğilimindedirler. Buna karşılık, bağışıklığı yeterli hastalarda, sinsi bir kutanöz lezyon başlangıcı ardından merkezi sinir sistemi bozukluğu ve ölüm görülebilmektedir. Genel olarak kutanöz lezyonlar, özellikle GAE'li hastaların geç belirtileridir. Kutanöz lezyonlar tipik olarak papülönodülerdir. Cerahatli olan bu nodüller, iyileşemeyen ülserlere dönüşebilir.

Papüller, püstüller ve kas içi apseler de tanımlanmıştır (Şekil 2.8) (Galarza ve ark., 2009).



Şekil 2. 8 (a) *Acanthamoeba* spp.'nin neden olduğu kutanöz lezyonlar. (b) *Acanthamoeba* spp.'nin trofozoitleri. Hematoksilen ve eozin boyama, ×400 (Galarza ve ark., 2009).

2.9. *Acanthamoeba* spp. Tanısı

Acanthamoeba spp.'lerin tanısı için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler: direkt mikroskopi, kültür yöntemleri, PCR, Floresan In Situ Hibridizasyonu (FISH), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve sitolojik testlerdir.

2.9.1. *Acanthamoeba* spp. Tanısında Mikroskobik Yöntemler

Çevresel örneklerden, BOS'dan veya dokulardan izole edilen *Acanthamoeba* spp.'lerin tanımlanması kist ve trofozoit morfolojisine bakılarak yapılmaktadır. GAE'nin kesin tanısı, amipin dokudaki tespiti veya amipin izolasyonudur. Hem *Acanthamoeba* trofozoitlerinin hem de beyin dokusundaki, deri lezyonlarındaki veya beyin omurilik sıvısındaki (BOS) kist/trofozoit formları görsel olarak saptanması için hem ışık hem de elektron mikroskobu kullanılabilir (da Rocha-Azevedo ve ark., 2009; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003).

2.9.2. *Acanthamoeba* spp. Tanısında Kültür Yöntemleri

Acanthamoeba spp. tanımlamasında kültür yöntemleri amibin in vitro olarak üretilmesine, izole edilmesine imkan sağladığı için tanıda büyük bir öneme sahiptir. *Acanthamoeba* spp. için kullanılan temel besiyeri ortamları pepton, maya özeti ve glikoz içermektedir. *Acanthamoeba* spp. canlı veya öldürülmüş bakterilerin varlığında, besleyici olmayan agar veya düşük konsantrasyonlarda besin içeren agar besiyerinde

kolaylıkla üremektedir. Genel olarak tercih edilen bakteriler: *K.pneumoniae*, *E.aerogenes* ve *E.coli* 'dir. *Acanthamoeba* spp. doğal ortam dışında en iyi şekilde üretilmesi için yapılan besiyerlerinde doğal ortamın beslenme ve çevre koşulları ile uyumlu olmasına özen gösterilmelidir (Eroğlu ve ark., 2015). Tavşan kanı veya at kanı içeren Tryptic Soy Agar (TSA), Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) ve canlı *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* veya *S. maltophilia* ile hazırlanan besleyici olmayan agar, *Acanthamoeba* spp.'nin optimal geri kazanımını sağlayan besiyerleri arasında bulunmaktadır (Penland ve Wilhelmus, 1997).

2.9.3. *Acanthamoeba* spp. Tanısında Boyama Yöntemleri

Acanthamoeba spp.'nin hem kültür sonrası hem de klinik örneklerden trofozoit /kist aşamasının morfolojik tanısı yapılmaktadır. *Acanthamoeba* spp.'nin boyanmamış halinin tespit edilmesi kimi zaman zordur ve bazen tanımlanamamaktadır çünkü bu aşamalar şeffaftır ve agar yüzeyinde birlikte büyüyen bakteri veya diğer organizmalar (örneğin mantarlar) ile çevrilidirler. Bu nedenle, hücresel organellerin ayrıntılı yapılarını gözlemlemek için boyamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Kistlerde temel hedef kist duvarını boyamak olmakla birlikte *Acanthamoeba* 'nın boyanmasında Gimenez boyası, Giemsa boyası, Heidenhain'in demirli hematoksilen boyası, demir hematoksilin-eozin, laktofenol pamuk mavisi, kalkoflor beyazı ve akridin turuncusu, Masson'un trikomu, Field's boyası kullanılmaktadır. Bu boyama tekniklerinden bazıları zaman alıcıdır bu yüzden rutin laboratuvar çalışmalarında kısa boyama prosedürleri tercih edilmektedir (El-Sayed ve Hikal, 2015; Polat ve ark., 2007).

2.9.4. *Acanthamoeba* spp. Tanısında Serolojik Yöntemler

Acanthamoeba enfeksiyonlarını saptamak için antikor titresindeki bir artış, enfeksiyonun bir göstergesi olabilir. Bu değerlendirme için, hasta olduğundan şüphelenilen bir kişiden alınan serumun seri dilüsyonları kullanılarak indirekt immünfloresan (IIF) uygulanır. Ve floresan mikroskopta değerlendirilir. *Acanthamoeba* ile enfekte olmuş bireyler serumda yüksek antikor titrelerine sahipken, *Acanthamoeba*'ya maruz kalmış sağlıklı bireylerde serumda düşük antikor titreleri bulunur. Bu nedenle IIF, *Acanthamoeba* ile enfekte olduğundan şüphelenilen hastalarda enfeksiyonu doğrulamak için yararlı bir araç olabilir. Western immünoblot analizi de insan serumunda *Acanthamoeba*'ya karşı antikorları göstermek için kullanılmıştır (da Rocha-Azevedo ve ark., 2009).

2.9.5. *Acanthamoeba* spp. Tanısında Moleküler Yöntemler

Acanthamoeba tespiti moleküler yöntemler kullanılarak hızla gerçekleştirilebilmektedir. Tanı amaçlı olarak, *Acanthamoeba*'nın cins düzeyinde tespiti, bir bireyin enfekte olup olmadığını anlamak için yeterlidir. *Acanthamoeba*'nın moleküler tanımlaması, polimeraz zincir reaksiyon deneyleri ile gerçekleştirilebilmektedir. 18S ribozomal RNA geninin (18S rDNA) tam DNA gen dizisi, JDP1 ve JDP2 olarak adlandırılan *Acanthamoeba* cinsine özgü primer çifti kullanılarak yapılır. Bu PCR testinin bir avantajı, bilinen tüm *Acanthamoeba* alt gruplarını saptamasıdır. Gerçek zamanlı PCR, SYA'yı farklı şekilde tanımlamak ve *Acanthamoeba*'yı *N. fowleri* ve *B. mandrillaris*'ten ayırt etmek için hızlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (da Rocha-Azevedo ve ark., 2009).

2.10. *Acanthamoeba* spp. Korunma

Serbest yaşayan amiplerden olan *Acanthamoeba* çevrede yaygın olarak bulunabileceğinden ve oluşturduğu enfeksiyonlar ölümcül olabileceğinden halk bilgilendirilmelidir. AK için ana risk faktörü kontakt lens kullanımında yetersiz hijyendir. Örneğin, AK genç erkeklerle sıklıkla ilişkilendirilmiştir, bu durum onların kötü kişisel hijyeni, lenslerinin veya lens saklama kutularının kötü kullanımı, bakımı, dezenfeksiyon prosedürlerine uymamalarından kaynaklanabilmektedir. Bunlara ek olarak kontakt lensle yüzmek veya yüzü yıkamak da AK sebep olabilmektedir.

Tüm kontakt lens kullanıcıları, *Acanthamoeba* keratiti dahil olmak üzere göz enfeksiyonları riskini azaltmaya yardımcı olmak için aşağıdaki maddelere dikkat etmelidir.

- Düzenli göz muayeneleri için göz doktoruna gidilmelidir.
- Kontakt lensler hekimin önerdiği programa göre takılmalı ve değiştirmelidir.
- Duş almak, spa küveti kullanmak veya yüzmek dahil suyla teması içeren herhangi bir aktiviteden önce kontakt lensler çıkarılmalıdır.
- Kontakt lenslere dokunmadan önce eller sabun ve suyla yıkanmalıdır.
- Kontakt lensler, önerilen talimatlarına ve üreticinin yönergelerine göre temizlenmelidir. Lensler her temizlendiğinde ve saklandığında yeni temizleme veya dezenfeksiyon solüsyonu kullanılmalıdır.

- Yanlış kullanım sonucu çizilmiş veya parçalamış kontakt lensler kullanılmamalıdır.
- Lensleri ovalamak ve durulamak, zararlı mikropların ve kalıntıların giderilmesi sağlanmalıdır.
- Yeniden kullanılabilir lensler uygun saklama kutusunda saklanmalıdır.
- Saklama kutuları steril kontakt lens solüsyonu ile ovalanmalı ve durulanmalı (asla musluk suyu kullanılmamalıdır) ve her kullanımdan sonra kurumaya bırakılmalıdır.
- Saklama kutularını en az üç ayda bir değiştirilmelidir (CDC, 2012; Khan, 2006).



- Filtrasyon kısıkaçı (Merck Millipore, Almanya)
- 1000 ml erlen (Merck Millipore, Almanya)
- 0.45 µm gözenek büyüklüğü 47 mm çaplı membran filtre (AISIMO, İngiltere)
- Vorteks cihazı (IKA, Almanya)
- Pens
- Bek alevi
- Steril bisturi



Şekil 3. 2 Membran filtrasyon sistemi

3.2.2. Su Örneklerinin Filtrelenmesi

Steril plastik şişelerde olacak şekilde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvara getirilen su örnekleri kültür yöntemi ve DNA izolasyonu için 0.45 µm çapında selüloz nitrat membran filtreden (AISIMO, İngiltere) yaklaşık 30 saniyede 100 ml geçecek şekilde vakum cihazı ile filtrelenmiştir. Filtre yüzeyinin kuru kalmaması amacıyla yüzeyinde 3-5 ml su kalıncaya kadar filtreleme işlemine devam edilmiştir. Filtre membranın yüzeyi steril bistüri ile eşit parçalara bölünmüş bir kısmı - 20 C°'ye DNA izolasyonu için kaldırılmıştır. Kalan kısım eşit iki parçaya bölünüp bir yarısı Besinsiz Non-Nutrient Agar (NNA)'a bir yarısı Buffered Charcoal – Yeast Extract Agar (BCYE)'e üzerine ters çevrilerek kapatılmıştır. Petrilerin kenarları kurumayı önlemek için parafilm ile kaplanmıştır. Daha sonra NNA-*E.coli* 30 °C'de, BCYE ise 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bakteri ile kaplanmış alanlarda yüzeyde erime ya da açılma

şeklindeki görüntüler şüpheli kabul edilerek steril bistüri ile yüzey kazınarak yaklaşık 2 ml Page Salin içerisine süspansedilip vortekslenip santrifüjlenmiş daha sonra mikroskopik olarak incelenmiştir. Pozitif olarak kabul edilen örnekler -20 °C'ye DNA izolasyonu için kaldırılmıştır.

3.3. Kültür Yöntemi

Bu çalışmada 3 farklı besiyeri kullanılmıştır. *Escherichia coli*'nin üretilmesi için Brain heart infusion agar (BHI), çevresel su örneklerinin kültür işlemi için ise Nonnutrient agar (NNA) ve Buffered charcoal – yeast extract agar (BCYE) kullanılmıştır.

3.3.1. Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (LABM – United Kingdom)

Toz Brain Heart Infusion Agardan 49 g, 1000 ml distile suya eklenip iyice karıştırılmıştır. pH 7.4 ± 0.2 ye ayarlandıktan sonra hazırlanan karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 47 °C'ye kadar soğutulup petrilere dökülerek kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra etrafı parafilm ile kapatılıp 4 °C'ye kaldırılmıştır.

3.3.2. Besinsiz Non-Nutrient Agar(NNA)

Page's Saline

• NaCl.....	0.12 g
• MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0.004 g
• CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	0.004 g
• Na ₂ HPO ₄	0.142 g
• KH ₂ PO ₄	0.136 g
• Distile su.....	1000 ml

pH 6.8 ± 0.1 at 25 ° C

Non-nutrient agar

- Agar..... 15.0 g
- Page's saline..... 1000 ml

pH 7.0 ±0.2

Hazırlanan karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra petrilere dökülerek 4 °C'de saklanmıştır. Örnek ekimi yapılacağı zaman daha önceden Brain Heart Infusion Agarda (BHI) üretilmiş olan 18-24 saatlik *E.coli* (ATCC 25922) 5 ml page salin solüsyonu içerisinde yoğun şekilde süspanse edilmiştir sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavmış ve süspanسیون steril pipet ile 1 ml alınıp NNA yüzeyine bir eküvyon yardımı ile yayılmıştır. Daha sonra kuruması için 24 saat 30 °C'de etüve kaldırılmıştır.

3.3.3. Buffered Charcoal – Yeast Extract Agar (BCYE) (BD BBL, France)

Buffered Charcoal Yeast Extract Agarı hazırlamak için 1000 ml distile suya 2.4 gram KOH eklenip çözünmesi için karıştırılmıştır. Daha sonra 38.3 gram toz BCYE'den eklenip karıştırılmaya devam edilmiştir. Tozun tamamen çözünmesi için ısıtma ve karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. pH'ı 6.8 ± 0.1 olacak şekilde ayarlanıp hazırlanan karışım 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra 45-50 °C'ye kadar soğutulmuş ve üzerine 4 ml %10'luk filtre ile sterilize edilmiş L-Sistein HCl çözeltisi eklenmiştir. Sonra karıştırılarak pH 6.8±0.2 olarak ayarlanmıştır. Son olarak petrilere dökülerek kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra etrafı parafilm ile kapatılıp 4 °C'ye kaldırılmıştır.

3.4. DNA İzolasyon Aşaması

3.4.1. DNA İzolasyon Aşamasında Kullanılan Gereçler

- QIAamp Mini DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)
- Mini santrifüj (Eppendorf MiniSpin®plus, Sigma, Almanya)
- Vorteks (IKA)
- Eppendorf tüpü (2 mL)

- Eppendorf tüpü (1.5 mL)
- Pipet ucu (20, 200, 1000 µl)
- Buzdolabı
- Kuru ısı bloğu (Biosan, Almanya)

3.4.2. Kültür Örneklerinin DNA İzolasyonu Aşaması

Kit içerisinde konsantre halde bulunan Buffer APW1 ve Buffer APW2 kitte tarif edilen şekilde %96-100 etanol eklenerek hazırlanmıştır.

Tablo 3. 1 Kültür örneklerinin izolasyon kitinin içerisindeki malzemeler

Kit İçerisindeki Malzemeler	Ürün Miktarları
QIAamp Mini Sütunlar	50
Toplama Tüpleri (2 ml)	50
Elüsyon Tüpleri (1.5 ml)	50
Tampon ATL	38 ml
Buffer AW1 (konsantre)	18 ml
Buffer AW2 (konsantre)	15 ml
Buffer APL2	14 ml
Buffer AVE	8 şişe
Proteinaz K	2.5 ml

NNA besiyeri ve BCYE besiyerine kültür yapılarak çoğaltılmış olan amiplerin izolasyonu QIAamp ® DNA Minikit QIAGEN’de belirtilen prosedür basamaklarına göre yapılmıştır.

Ön aşama olarak:

1. 2 ml’lik bir eppendorf tüpe 1,5 ml’ye kadar numune eklenip 14.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
2. Süpernatant atılmıştır.
3. 400 µl Tampon ATL eklenip pellet yeniden süspanse edilmiştir.

Daha sonra spin protokol örnek hazırlama adımına geçilmiştir:

1. Ön işleme tabi tutulmuş numunelere 40 µl Proteinaz K eklenip 10 saniye vortekslenmiştir.
2. Numune 56 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
3. Numuneye 200 µl Buffer APL2 eklenip kapağı kapatılıp 30 saniye vortekslenmiştir.
4. 70 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
5. Lizata 300 µl etanol (%96-100) eklenip kapağı kapatılıp 15-30 saniye vortekslenmiştir.
6. Karışımın 600 µl'si QIAamp Mini filtreli tüpe aktarılmıştır ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra QIAamp Mini filtreli tüp yeni 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Süzüntü içeren tüp atılmıştır.
7. Kalan karışım (6.adımdan) QIAamp Mini filtreli tüpe aktarılmıştır. Ve 7. Adım tekrarlanmıştır. Bir sonraki adım için 2 ml'lik yeni toplama tüpüne aktarılmıştır.
8. QIAamp Mini filtreli tüpe 600 µl Buffer AW1 eklenmiştir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. QIAamp Mini filtreli tüpü yeni 2 ml'lik toplama tüpüne aktarılmıştır.
9. QIAamp Mini filtreli tüpe 750 µl Buffer AW2 eklenmiştir. 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir.
10. QIAamp Mini filtre kolonu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilip süzüntü içeren eski toplama tüpü atılmıştır. 1 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
11. QIAamp Mini filtreyi 2 ml'lik yeni toplama tüpüne yerleştirilip kapağı açılıp 56 °C'de 3 dakika inkübe edilmiştir.
12. QIAamp Mini filtreli tüpü 1,5 ml'lik temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirilip, filtreli tüpün merkezine 20-100 µl Buffer AVE eklenip kapağı kapatılıp 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
13. DNA'yı ayrıştırmak için 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. 13. ve 14. adım tekrarlanmıştır.

İzolasyon işlemi gerçekleştirilen numuneler, PCR yöntemi uygulayınca kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR) Aşaması

Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR), *Acanthamoeba* ssp. 18S ribozomal RNA (18S) gen Genesig® Standart Kit kullanılmıştır.

3.5.1. RT-PCR Test Prosedürü

Tablo 3. 2 RT-PCR çalışma protokolü

	Aşama	Süre	Sıcaklık (°C)
Döngü X 50	Enzim aktivitesi	2 dakika	95 °C
	Denatürasyon	10 saniye	95 °C
	Primer bağlanma ve sentez	60 saniye	60 °C

3.5.2. Sonuçların Yorumlanması

Tablo 3. 3 RT-PCR sonuçların yorumlanması

FAM	Internal Kontrol (VIC)	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Yorumlama
≤30	+/-	+	-	Pozitif sayısal sonuç. Kopya sayısı hesaplanır.
>30	+	+	-	Pozitif nicel sonuç. Kopya sayısı hesaplanır.
>30	-	+	-	Pozitif nitel sonuç.
-	+	+	-	Negatif sonuç.
+/-	+/-	+	≤35	Deney, kontaminasyondan dolayı olumsuz sonuçlanmıştır.
+/-	+/-	+	>35	*
-	-	+	-	Yeterli numune hazırlanmıştır.
+/-	+/-	-	+	Deney başarısız olmuştur.

3.6. İstatistiksel Analiz

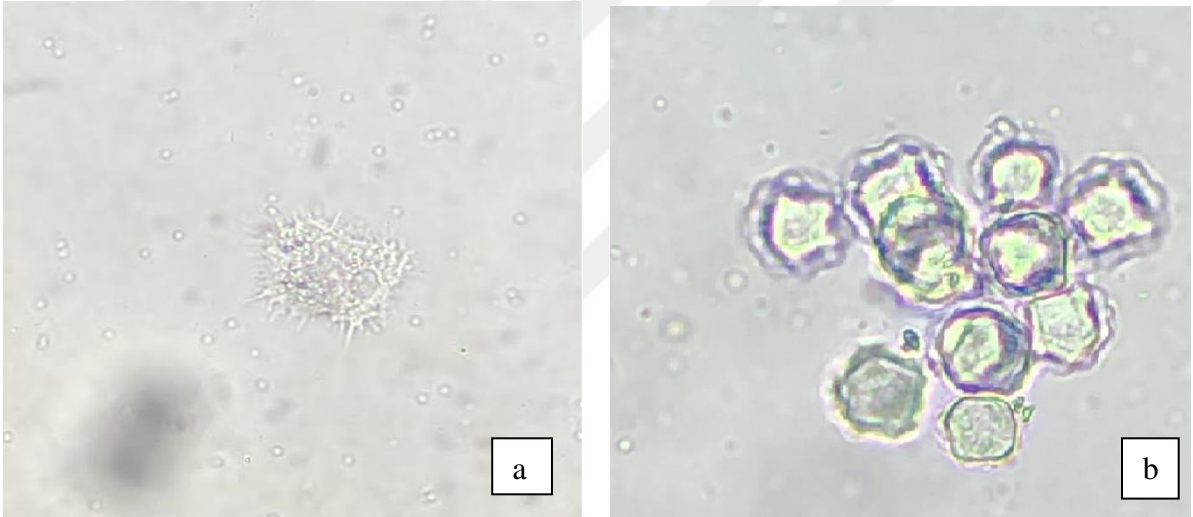
Elde edilen veriler SPSS 22.0 versiyonu (SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Besiyerlerinin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. Besiyerleri arasında, üretilen *Acanthamoeba* spp. tespitinde uyum, kapa

katsayısı hesaplanarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için %95 güven aralığında 0,05'in altındaki p değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

İstanbul Tıp Fakültesi Parazitoloji laboratuvarına uygun koşullarda getirilen su örnekleri kültür yöntemi için vakum cihazı ile filtrelendikten sonra filtrenin bir yarısı NNA-*E.coli*'ye bir yarısı BCYE besiyeri üzerine ters çevrilerek kapatılmıştır. NNA-*E.coli* 30 °C'de, BCYE ise 37 °C'de inkübe edilmiştir. NNA-*E.coli* besiyerleri 14 güne kadar inkübe edilip, belirli aralıklar ile üreme kontrol edilmiştir. BCYE besiyeri en iyi üreme sonuçlarını 66-72 saat aralığında verdiği ve 10. günden sonra kurumaya başladığından petripler 10 gün saklanmıştır. Mikroskop incelemeleri sonucu kist ve trofozoit şekilleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 a. BCYE besiyerinde *Acanthamoeba* trofozoiti (X40) b. NNA-*E.coli* besiyerinde *Acanthamoeba* kistleri (X40)

100 örneğin kültür sonuçları incelendiğinde besiyeri ayrımı yapmaksızın toplamda 27 su örneğinde *Acanthamoeba* spp. belirlenmiştir. NNA-*E.coli* besiyerinde *Acanthamoeba* spp.'ye ait 15 kist 7 trofozoit gözlemlenirken, BCYE besiyerinde 9 kist ve 10 trofozoit saptanmıştır. Her iki besiyerinde ise ortak olarak 14 örnekte kist / trofozoit belirlenmiştir. 8 örnek sadece NNA-*E.coli* besiyerinde belirlenirken, BCYE besiyerinde 5 örnekte kist/ trofozoit gözlemlenmiştir. Trofozoit üretiminde BCYE besiyeri daha başarılı bulunmuştur (Tablo 4.1).

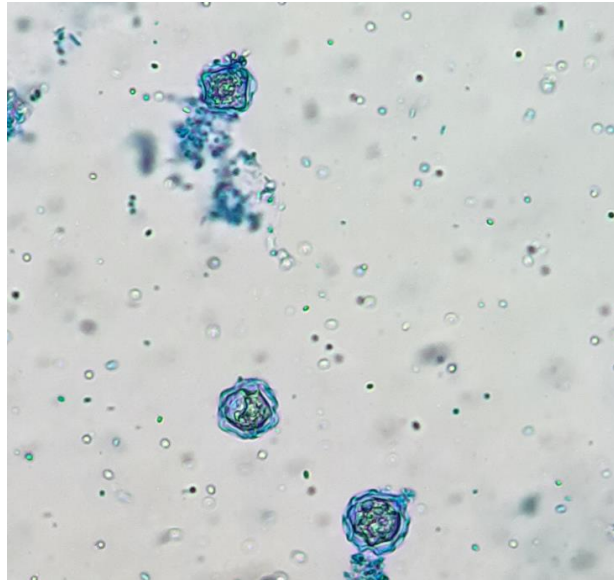
Tablo 4. 1 NNA-*E.coli* Besiyeri ve BCYE Besiyeri *Acanthamoeba* spp. pozitiflik karşılaştırması

NNA Besiyeri/ <i>E.coli</i>	BCYE Besiyeri				χ^2	P
	Yok		Var			
	n	%	n	%		
Yok	73	93,6	5	6,4	36,515	p<0,001
Var	8	36,4	14	63,6		

Kappa=0.602 ; p<0,001 ; %95% GA : 0.407 ile 0.797

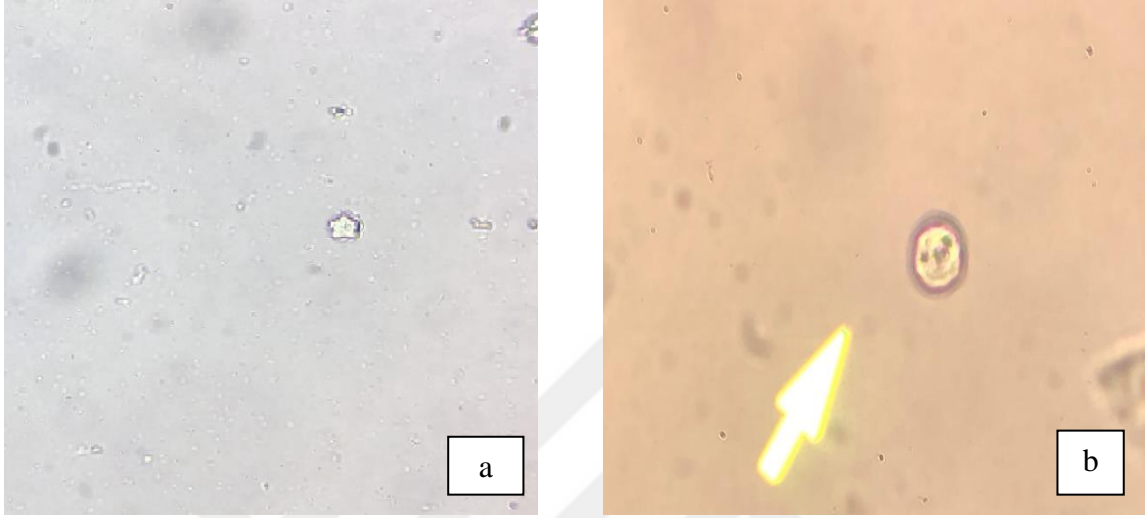
NNA-*E.coli* besiyeri ve BCYE besiyerinde üreyen *Acanthamoeba* spp. istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. İki besiyerinde üreyen örnek sayısı ki-kare hesaplanarak ve NNA-*E.coli* besiyeri ve BCYE besiyeri arasında önemli derece uyum anlamlı bulunmuştur.

Acanthamoeba spp. kist/trofozoit besiyerinde tanımlandıktan sonra NNA-*E.coli* besiyerine pasaj alınmıştır. Pasaj sonrası tekrar *Acanthamoeba* kist/trofozoitleri gözlemlenen örnekte kistlere Laktofenol pamuk mavisi ile boyama yapılmıştır (Şekil 4.2). Boyama sonrası aşağıdaki şekilde de görüleceği üzere amibin kist duvarı açığa çıkıp diğer alanlara göre daha koyu maviye boyanmıştır.



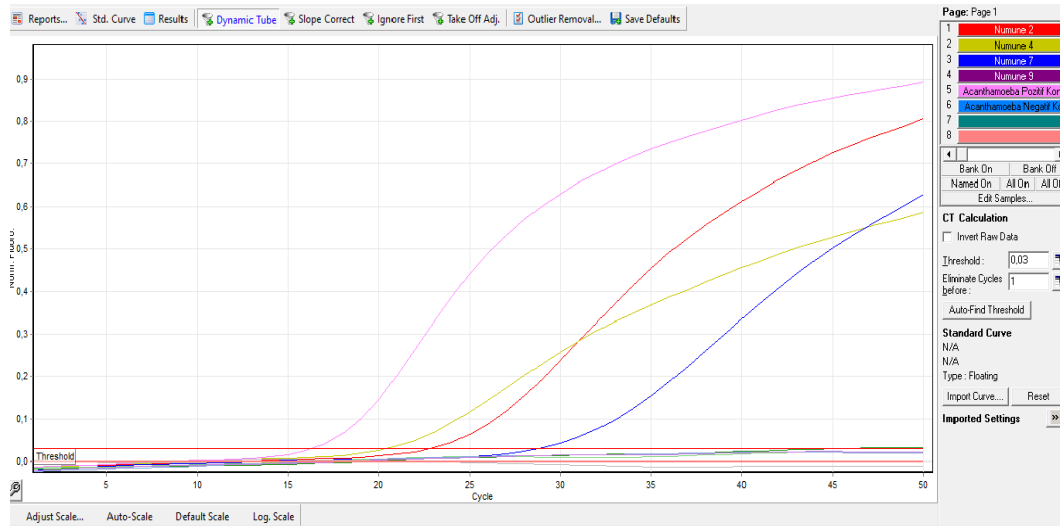
Şekil 4. 2 NNA-*E.coli* besiyerinde laktofenol pamuk mavisi ile boyanmış *Acanthamoeba* kistleri (X40)

NNA-*E.coli* ve BCYE besiyerlerinin incelenmesi sonucu *Acanthamoeba* spp. kist saptanan örnekler morfolojik kriterlere göre değerlendirilmiştir. Kistlerin büyüklük ve şekilleri baz alınarak yapılan sınıflamada ağırlıklı olarak tespit edilen örneklerin grup II ve grup III'e ait oldukları görülmüştür.



Şekil 4. 3 NNA-*E.coli* besiyerinde tespit edilen kist görüntüleri
a)Kist şekil ve büyüklüğüne göre Grup II b)Kist şekil ve büyüklüğüne göre Grup III

Besiyeri sonuçları gözlemlenen örneklerin DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) analizi gerçekleştirilmiştir. 100 örnekten toplam 25 örneğin RT-PCR sonucu pozitif bulunmuştur.



Şekil 4. 4 Bazı *Acanthamoeba* spp. pozitif örneklerinin RT-PCR grafiği

Tablo 4. 2 Örneklerin alındığı yer - tarih bilgisi ve *Acanthamoeba* spp. tanısında kullanılan yöntemlerin pozitiflik karşılaştırılması

Örnek No	Örneğin Alındığı Yer	Örneğin Türü	Alınan Tarih	Alınan Mevsim	NNA Besiyeri <i>/E.coli</i>	BCYE Besiyeri	RT-PCR (C)
1	Mardin	Kuyu Suyu	27.08.2021	Yaz	-	-	-
2	Mardin	Doğal Kaynak Suyu	27.08.2021	Yaz	+	-	+ 23,45
3	Mardin	Çeşme Suyu	27.08.2021	Yaz	+	+	+ 21,34
4	Şanlıurfa	Göl Suyu	28.08.2021	Yaz	+	+	+ 21,12
5	Şanlıurfa	Çeşme Suyu	28.08.2021	Yaz	-	-	-
6	Şanlıurfa	Kuyu Suyu	28.08.2021	Yaz	+	+	+ 26,99
7	Şanlıurfa	Baraj Suyu	28.08.2021	Yaz	+	+	+ 29,32
8	Diyarbakır	Kaplıca Suyu	29.08.2021	Yaz	+	-	+ 32,21
9	Diyarbakır	Kaplıca Suyu	29.08.2021	Yaz	+	+	-
10	Diyarbakır	Doğal Şelale	29.08.2021	Yaz	+	+	-
11	Diyarbakır	Çeşme Suyu	29.08.2021	Yaz	-	-	-
12	Diyarbakır	Çay	29.08.2021	Yaz	+	+	-
13	Diyarbakır	Nehir Suyu	29.08.2021	Yaz	-	-	-
14	Diyarbakır	Nehir Suyu	30.08.2021	Yaz	-	-	-
15	Diyarbakır	Nehir Suyu	30.08.2021	Yaz	+	+	-

16	Diyarbakır	Doğal Kaynak Su	30.08.2021	Yaz	-	-	-
17	Diyarbakır	Baraj Suyu	30.08.2021	Yaz	-	-	-
18	Diyarbakır	Çeşme Suyu	31.08.2021	Yaz	-	-	-
19	Diyarbakır	Çeşme Suyu	31.08.2021	Yaz	-	-	-
20	Diyarbakır	Sıcak Su	31.08.2021	Yaz	-	-	-
21	Diyarbakır	Yüzme Havuzu	31.08.2021	Yaz	-	-	-
22	Diyarbakır	Musluk Suyu	31.08.2021	Yaz	-	-	-
23	Eskişehir	Çeşme Suyu	25.09.2021	Sonbahar	-	-	-
24	Eskişehir	Çeşme Suyu	25.09.2021	Sonbahar	-	-	-
25	Eskişehir	Çay	25.09.2021	Sonbahar	-	-	-
26	Eskişehir	Hamam Suyu	25.09.2021	Sonbahar	-	+	-
27	Antalya	Deniz Suyu	27.06.2022	Yaz	+	+	-
28	Tokat	Musluk Suyu	22.08.2022	Yaz	-	-	-
29	Tokat	Çeşme Suyu	22.08.2022	Yaz	-	-	-
30	Tokat	Doğal Kayak Su	22.08.2022	Yaz	-	-	-
31	Afyonkarahisar	Kaplıca Suyu	02.04.2022	İlkbahar	-	-	-
32	Manisa	Musluk Suyu	03.04.22	İlkbahar	-	-	-

33	Zonguldak	Doğal Kaynak Suyu	26.08.2022	Yaz	-	-	-
34	Zonguldak	Topraklı Su	26.08.2022	Yaz	-	-	-
35	Diyarbakır	Topraklı Su	30.08.2021	Yaz	-	+	-
36	Bolu	Musluk Suyu	08.09.2022	Sonbahar	-	-	-
37	Bolu	Çeşme Suyu	08.09.2022	Sonbahar	-	-	-
38	Bursa	Çeşme Suyu	18.09.2021	Sonbahar	-	-	-
39	İstanbul	Hastane Musluk Suyu	22.09.2022	Sonbahar	-	-	-
40	İstanbul	Çeşme Suyu	07.10.2022	Sonbahar	-	-	-
41	İstanbul	Hastane Musluk Suyu	10.10.2022	Sonbahar	-	-	-
42	İstanbul	Hastane Depo Suyu	10.10.2022	Sonbahar	+	-	-
43	İstanbul	Hastane Depo Suyu	10.10.2022	Sonbahar	-	-	-
44	İstanbul	Atık Su	10.10.2022	Sonbahar	-	-	-
45	İstanbul	Saksı Altı Suyu	13.10.2022	Sonbahar	+	+	+ 32,39
46	İstanbul	Saksı Altı Suyu	13.10.2022	Sonbahar	+	-	+ 20,86
47	İstanbul	Hamam Suyu	25.10.2022	Sonbahar	+	+	-

48	İstanbul	Hamam Suyu	25.10.2022	Sonbahar	+	-	+ 38,45
49	İstanbul	Çeşme Suyu	25.10.2022	Sonbahar	-	-	-
50	Van	Göl Suyu	10.08.2022	Yaz	-	-	-
51	Bitlis	Doğal Kaynak Su	14.08.2022	Yaz	-	-	-
52	Siirt	Çeşme Suyu	14.08.2022	Yaz	-	-	-
53	Diyarbakır	Çeşme Suyu	02.09.2022	Sonbahar	-	-	-
54	Diyarbakır	Doğal Kaynak Su	02.09.2022	Sonbahar	-	-	-
55	Elazığ	Doğal Kaynak Su	06.11.2022	Sonbahar	-	-	-
56	Elazığ	Göl Suyu	06.11.2022	Sonbahar	-	-	-
57	Malatya	Musluk Suyu	06.11.2022	Sonbahar	-	-	-
58	Malatya	Çeşme Suyu	06.11.2022	Sonbahar	-	-	-
59	İstanbul	Yapay Şelale	26.10.2022	Sonbahar	-	-	+ 27,65
60	İstanbul	Yapay Şelale	19.11.2022	Sonbahar	+	+	+ 17,10
61	İstanbul	Saksı Altı Suyu	20.12.2022	Kış	+	+	+ 30,79
62	İstanbul	Sebil Suyu	20.12.2022	Kış	+	-	+ 29,22
63	İstanbul	Sebil Suyu	20.12.2022	Kış	-	-	+ 33,77

64	Denizli	Çeşme Suyu	20.12.2022	Kış	-	-	+ 29,67
65	İstanbul	Yapay Göl	04.01.2023	Kış	-	-	+ 30,82
66	İstanbul	Yapay Dere	04.01.2023	Kış	-	-	+ 31,73
67	İstanbul	Yüzme Havuzu	04.01.2023	Kış	-	-	+ 30,36
68	İstanbul	Kuyu Suyu	09.01.2023	Kış	-	-	-
69	İstanbul	Kuyu Suyu	09.01.2023	Kış	-	-	-
70	İstanbul	Depo Suyu	10.01.2023	Kış	-	-	-
71	İstanbul	Saksı Altı Suyu	23.01.2023	Kış	-	-	-
72	İstanbul	Hamam Suyu	23.01.2023	Kış	-	-	-
73	İstanbul	Hamam Suyu	23.01.2023	Kış	-	-	-
74	İstanbul	Deniz Suyu	24.01.2023	Kış	-	-	+ 29,76
75	Ankara	Kaplıca Suyu	28.01.2023	Kış	-	-	-
76	Ankara	Kaplıca Suyu	28.01.2023	Kış	-	-	-
77	Ankara	Kaplıca Suyu	28.01.2023	Kış	-	-	-
78	Ankara	Musluk Suyu	28.01.2023	Kış	-	-	-
79	İstanbul	Deniz Suyu	26.02.2023	Kış	-	-	-
80	İstanbul	Deniz Suyu	26.02.2023	Kış	-	-	-

81	Bolu	Musluk Suyu	29.01.2023	Kış	-	-	-
82	İstanbul	Göl Suyu	26.02.2023	Kış	-	-	-
83	İstanbul	Göl Suyu	26.02.2023	Kış	-	-	-
84	İstanbul	Deniz Suyu	26.02.2023	Kış	-	+	-
85	İstanbul	Deniz Suyu	26.02.2023	Kış	-	+	+ 38,81
86	İstanbul	Saksı Altı Suyu	01.03.2023	İlkbahar	-	+	+ 34,82
87	İstanbul	Saksı Altı Suyu	01.03.2023	İlkbahar	-	-	+ 31,48
88	İstanbul	Saksı Altı Suyu	01.03.2023	İlkbahar	+	-	+ 29,89
89	İstanbul	Dere Suyu	01.03.2023	İlkbahar	+	-	-
90	İstanbul	Süs Havuzu	01.03.2023	İlkbahar	-	-	-
91	İstanbul	Yüzme Havuzu	14.03.2023	İlkbahar	-	-	-
92	İstanbul	Yüzme Havuzu	14.03.2023	İlkbahar	+	+	+ 20,91
93	İstanbul	Süs Havuzu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	+ 36,01
94	İstanbul	Çeşme Suyu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	-
95	İstanbul	Çeşme Suyu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	-
96	İstanbul	Hamam Suyu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	-

97	İstanbul	Hamam Suyu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	-
98	İstanbul	Hamam Suyu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	-
99	İstanbul	Süs Havuzu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	-
100	İstanbul	Musluk Suyu	15.03.2023	İlkbahar	-	-	-

Çalışmanın başında NNA besiyerinde *E.coli* ATCC® 25922™ dışında *P.aeruginosa* ATCC® 27853™ ve *S.aureus* ATCC® 25923™ bakterileri ile deneme yapılmıştır. Fakat hem malzemelerin hem de imkanların kısıtlı olması sebebi ile denemeler sonucunda yoğunluklu olarak NNA-*E.coli* ile pozitif sonuç alınca çalışmaya *E.coli* ile devam edilmiştir. *Acanthamoeba* spp. kültürü için çalışmada kullanılan iki farklı besiyerinden NNA-*E.coli* 'de 22 pozitif sonuç bulunurken BCYE'de ise 19 pozitif sonuç tespit edilmiştir. Çalışılan 100 örnekten 27'si kültürde pozitif sonuç verirken 25'i RT-PCR ile pozitif bulunmuştur. Kültürde hiç üretilmeyen 73 örneğin 9'u ise RT-PCR'de pozitif bulunmuştur.

Tablo 4. 3 *Acanthamoeba* spp. tespitinde NNA-*E.coli* ve RT-PCR pozitiflik karşılaştırılması

RT-PCR	NNA- <i>E.coli</i>		χ^2	p
	Yok	Var		
Yok	67	11	22,4	p<0,001
Var	8	14		
Toplam	75	25		

Kappa= 0.472; p<0,001; %95 % GA 0.270 ile 0.675

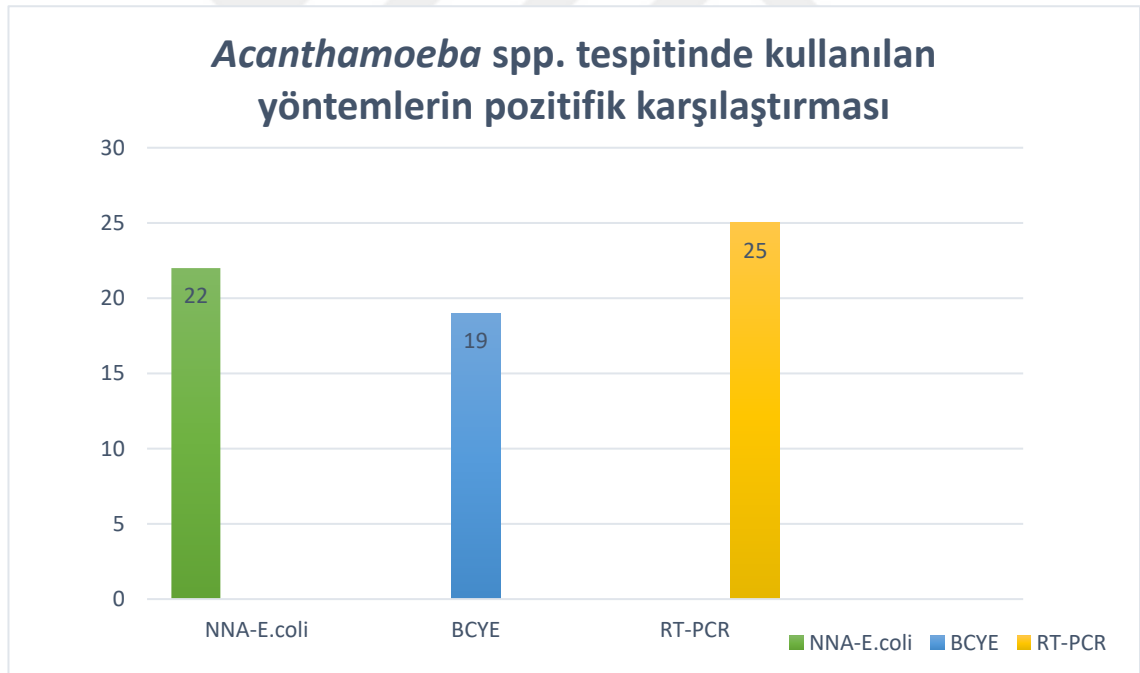
NNA-*E.coli* ve RT-PCR arasında çoğunluk ile uyum anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4. 4 *Acanthamoeba* spp. tespitinde BCYE ve RT-PCR pozitiflik karşılaştırılması

RT-PCR	BCYE		χ^2	p
	Yok	Var		
Yok	66	9	9,5	p<0,002
Var	15	10		
Toplam	81	19		

Kappa=0.304 ; p<0,001 ; %95% GA 0.089 ile 0.519

BCYE ve RT-PCR arasında orta güçte uyum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. NNA-*E.coli* ve BCYE besiyerlerinin RT-PCR ile uyumu kappa katsayısı hesaplanarak değerlendirilmiştir. Bulunan katsayılar bakıldığında; 0,30 ile 0,60 arasında değişen orta güçte ve önemli olabilecek düzeyde uyumlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001).



Şekil 4. 5 *Acanthamoeba* spp. tespitinde kullanılan yöntemlerin pozitiflik karşılaştırılması Türkiye'nin çeşitli illerinden toplanan 100 örneğin 17 tanesi ilkbahar, 32 tanesi yaz, 26 tanesi sonbahar, 25 tanesi kış mevsiminde olmak üzere farklı mevsimlerde toplanmıştır. Yaz mevsiminde toplanan 32 örnekten 12 tanesi kültürde pozitif saptanmıştır. Diğer mevsimlere kıyasla *Acanthamoeba* spp. yaz aylarında daha sık tespit edilmiştir.

5.TARTIŞMA

SYA'dan *Acanthamoeba* çevrede yüzme havuzlarında, şişelenmiş sulara, deniz sularında, göllerde, durgun sulara, nehir suyunda, havalandırma kanallarında, klima ünitelerinde, lağım suyu, toprak, diyaliz üniteleri, göz yıkama üniteleri gibi çok çeşitli yerlerde bulunabilmektedir. *Acanthamoeba* spp.'ye bağlı enfeksiyonlar düşük morbitiditeye rağmen yüksek ölüm ile karakterize olup ciddi klinik problemler oluşturmaktadır. *Acanthamoeba*; bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde GAE'ye, akciğer ve deri enfeksiyonlarına, sağlıklı bireylerde ve kontakt lens kullanıcılarında AK'ye neden olmaktadır. *Acanthamoeba*'nın yaşam döngüsünde iki aşama bulunmaktadır. Vejetatif büyüme sergileyen aktif bir trofozoit aşaması ve minimum metabolik aktiviteye sahip dirençli kist aşamasıdır. Aktif olarak bakteri, alg, maya veya küçük organik parçacıklarla beslenir ve hücrenin sitoplazmasında birçok besin vakuolü görülebilmektedir (CDC, 2019; Khan, 2006; Król-Turmińska ve Olender, 2017). Besin vakuolünde kullandığı besinlerden herhangi biri, labortuvarda *Acanthamoeba* için büyüme substratı olarak kullanılabilir ancak bunlardan bazıları kullanıldığında önemli problemlere neden olabilmektedir. Örneğin, mayaların büyüme substratı olarak kullanıldığı durumlarda, mayaların aşırı büyümeleri ve saf *Acanthamoeba* kültürleri elde etmek için mayayı yok etmenin zorluğu nedeniyle sorunludur. Bu sorunların üstesinden gelmek ve *Acanthamoeba* tespitinde yüksek verim elde etmek için çevresel ve klinik örneklerin izolasyonunda dünyada besleyici olmayan agar petriyelerine ekilen Gram negatif bakterilerin kullanılması tercih edilmektedir. NNA, minimum düzeyde besin içermektedir ve bu nedenle istenmeyen organizmaların üremesini engellemektedir (Khan, 2006). *Acanthamoeba* kültürü konakçı-parazit arası bilgilerimizi geliştirmek, teşhis, uygun miktarda parazit elde etmek, konakçı parazit arası ilişkileri hakkındaki bilgilerimizi geliştirmek, parazitin moleküler, biyolojik ve immünolojik özelliklerini belirlemek, aşı ve ilaç geliştirmek için önemli bir adımdır (Eroğlu ve ark., 2015). *Acanthamoeba* türlerini tespit etmek ve miktarını belirlemek önemlidir. Bunun için kullanılan kültür yönteminde tanın uzun zaman alması sebebi ile moleküler yöntemler daha çok tercih edilmektedir.

Çevresel su örneklerinde *Acanthamoeba* spp.'yi belirlemek amacıyla yaptığımız bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli şehirlerinden ve insan temasının yoğun olduğu toplam 100 su örneği ile çalışılmıştır. NNA-*E.coli* ve BCYE kültürlerine alınan su örneklerinde ortalama 5 günde *Acanthamoeba* spp. üremiştir. Her iki kültür yönteminde su örneklerinin %27'sinde *Acanthamoeba* spp. belirlenmiştir. *Acanthamoeba* üretilmesinde NNA-*E.coli* besiyeri (22/100) BCYE besiyerine (19/100) ile benzer sonuçlar göstermiştir. Penland ve Wilhelmus'un yaptığı çalışmada daha önceden laboratuvara başvurmuş olup *Acanthamoeba* spp. pozitif olan hasta örneklerini BCYE ve TSA (tavşan kanlı, koyun kanlı, at kanlı, insan kanlı) ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E.aerogenes* ATCC 13048, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637, *E.coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Serratia marcescens* B1523 bakterilerini canlı ve ölü olarak besleyici olmayan agarda üretmişlerdir ve BCYE besiyerinin diğerlerine göre trofozoitlerin üretiminde çalışmamıza benzer şekilde daha başarılı sonuç verdiğini belirlemişlerdir (Penland ve Wilhelmus, 1997). Çalışmamızda kullanılan BCYE besiyerinde *Acanthamoeba* spp.'ye ait 10 trofozoit ve 9 kist gözlemlenirken, ısı ile öldürülmüş NNA-*E.coli* besiyerinde 15 kist ve 7 trofozoit gözlemlenmiştir. *Acanthamoeba* büyümesini farklı kültür ortamlarında karşılaştıran az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu amip için daha yeni ve daha erişilebilir kültür ortamları keşfedilebilir.

Tawfeek ve ark. Kahire, Mısır'da çevreden izole edilen potansiyel patojenik *Acanthamoeba*'nın genotipik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu amaçladıkları çalışmada 75 çevresel örneğin toplanması sonucu NNA-*E.coli* besiyerine kültür işlemi uygulamışlardır. Yapılan bu çalışmada toplanan 35 su örneğinin 11'inde (%31,4) *Acanthamoeba* spp. tespit etmişlerdir (Tawfeek ve ark., 2016). Çalışmamızda ise benzer şekilde toplam %27 kültür pozitif sonuç elde edilmiştir. İran' da Mahmudi ve arkadaşlarının Mayıs-Haziran 2019 tarihleri arasında Guilan eyaletinin ilçelerinde halka açık parklardan rastgele 80 su örneği ve 20 toprak örneği toplamışlardır. Ve topladıkları 80 su örneğinin 40'ında (%50) *Acanthamoeba* tespit etmişlerdir (Mahmoudi ve ark., 2022). Koyun ve arkadaşlarının Samsun'daki su kaynaklarında (nehir ve musluk sularında) SYA'nın varlığını tespit etmek için 32 farklı noktadan (Samsun merkez, Terme, Çarşamba, Tekkeköy, Bafra) 222 su örneği almışlardır. Aldıkları bu örneklerin toplam %44'ü pozitif bulunmuştur. *Acanthamoeba* spp. Samsun'da 15/36 (%41,7) , Terme'de 58/90, Çarşamba'da 12/30 (%40), Tekkeköy'de 7/18 (%38,9) ve Bafra'da

6/18 (%33,3) nehir örneğinde tespit etmişlerdir. Musluk suyu örneklerinde *Acanthamoeba* spp. tespit etmemişlerdir (Koyun ve ark., 2020). Çalışmamızda İran ve İzmir’de yapılan çalışmalara kıyasla daha düşük pozitiflik saptanmıştır. Aykur ve Dağcı’nın ise çeşitli su kaynaklarında *Acanthamoeba* ve *Naegleria fowleri*’nin belirlenmesi amacıyla İzmir’de gerçekleştirdikleri çalışmada, musluk, havuz, kuyu, göl , baraj, akarsu, deniz suyu ve termal kaynak suyu olmak üzere toplam 148 su örneği ile çalışmışlardır. 148 örnekten 18 (%12,16)’sini *Acanthamoeba* spp. için pozitif bulmuşlardır (Aykur ve Dagci, 2021). Çevresel kaynaklar, insan enfeksiyonu için önemli bir potansiyel risk sebebi olduğundan *Acanthamoeba*’nın farklı ortamlarda yaygınlığının incelenmesi, insanlarda hastalığın kontrolü ve önlenmesi için yardımcı olabilmektedir. Çevrede birçok yerde bulunan *Acanthamoeba* spp.’nin prevalansında farklılıklar görülmektedir. Bu farklılığın sebebi coğrafi konumları farklı olan ülke ve bölgelerdeki suyun sıcaklığı, iklim koşulları gibi durumlar olduğu düşünülmektedir.

Acanthamoeba spp. kistleri morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Pussard ve Pons *Acanthamoeba* spp.’yi kist boyutu ve morfolojik özelliklerine göre 3 gruba ayırmıştır. Kist özellikleri cins tanımlamasını kolaylaştırırsa da tür düzeyinde ayırım yapmak zordur. PCR ve dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle, *Acanthamoeba* spp. 18S rRNA gen dizilerine dayalı olarak sınıflandırılmaktadır (Fuerst ve Booton, 2020). Genotip sistemi, suşların belirli bir ortam ya da patolojik bir ortamla ilişkisinin kaydını kolaylaştırarak kesin suş tanımlamasına olanak vermekte olup epidemiyolojik araştırmaların gelişmesine katkı sağlamaktadır. Genotipler ve patojenite arasında henüz net bir ilişki kurulamamış olmasına rağmen morfolojik olarak grup I çevresel ve patojen olmayan suşlar ile ilişkilendirilmiştir (D. Corsaro ve ark., 2017). Hajjalilo ve arkadaşlarının 2016 yılında İran’daki amipli keratit hastalarından *Acanthamoeba* suşlarının izolasyonu ve genotiplendirilmesini gerçekleştirdikleri çalışmalarında 138 kornea kazıntısı, kontakt lens örneği ve gereçleri incelemişlerdir. Tüm klinik örnekleri hem direkt mikroskopi hem de kültür yöntemi ile incelemişlerdir. Morfolojik sınıflamaya göre gruplandıkları örneklerde ağırlıklı olarak grup II’ye ait kistler tespit etmişlerdir ancak tek bir izolatta grup I morfolojisine ait *Acanthamoeba* spp. kisti saptamışlardır (Hajjalilo ve ark., 2016). Mısır’da Damanhour içme suyu arıtma tesisinde *Acanthamoeba* türlerinin araştırıldığı Herrawy ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 48 su örneğinden 12 örnekte (%25) pozitiflik saptamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, morfolojik olarak sınıflandırılan örneklerde grup I, grup II ve grup

III'e ait *Acanthamoeba* spp. tespit etmişlerdir (Al-Herrawy ve ark., 2015). 2020 yılında İzmir İlinde Toplanan Çevresel Örneklerde *Acanthamoeba* spp. *Naegleria Fowleri* ve *Balamuthia mandrillaris* Araştırılması Aykur tarafından gerçekleştirilmiştir. Aykur'un yapmış olduğu çalışmada 148 su örneğinin değerlendirilmesi sonucu %12,16'sında *Acanthamoeba* spp. pozitif saptamıştır. Morfolojik kriterlere göre kistlerin büyüklük ve şekillerine göre yaptıkları sınıflamada grup II ve grup III'e ait olduklarını saptamışlardır (Aykur, 2020). 100 farklı çevresel su örneğini incelediğimiz çalışmamızda kültürde üretilen 27 *Acanthamoeba* spp. morfolojik olarak sınıflandırıldığında ağırlıklı olarak grup II ve grup III'e ait olduğu belirlenmiştir.

Çevresel ve klinik örneklerde *Acanthamoeba* spp.'nin tanımlanması genellikle direkt mikroskopi ve/veya kültür yöntemi kullanılarak yapılmaktadır. Kültür yöntemi örneklerin tanısında altın standart olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin incelemeyi yapan kişilerin deneyimine ve *Acanthamoeba* spp.'nin üreme koşullarının değişkenliği nedeniyle bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Moleküler yöntemlerin gelişmesi ile beraber bu problem önemli ölçüde azalmıştır (Chang ve ark., 2010; Lorenzo-Morales ve ark., 2015). Milanez ve arkadaşlarının Filipinler de 63 adet içme su sistemlerinden izole ettikleri *Acanthamoeba* spp.'yi epidemiyolojik ve moleküler yönlerden inceledikleri çalışmalarında, NNA-*E.coli* besiyerinde %14,28 (9/63) pozitiflik , *Acanthamoeba*'ya özgü prümerler kullanılarak kültür pozitif örneklerinin moleküler yöntemle de pozitif olduğunu saptamışlardır (9/9) (Milanez ve ark., 2020). Karimi ve arkadaşlarının Batı İran su kaynaklarında *Acanthamoeba* spp.'nin tanımlanması ve genotiplendirilmesini araştırdıkları çalışmada 72 su örneği toplamışlardır bunlara kültür işlemi uygulandıktan sonra PCR işlemi gerçekleştirmişlerdir. İnceledikleri 72 su örneğinin tamamının (%100) kültür yöntemiyle SYA açısından pozitif olduğu saptamışlardır. Kültür örneklerinden *Acanthamoeba*'nın teşhisi ve tanımlanması için kullanılan PCR testinin sonucua göre sadece 17 örneği (%23,6) pozitif olarak saptamışlardır (Karimi ve ark., 2023). Masangkay ve arkadaşlarının Filipinlerde kuyu suyu kaynaklarında, *Cryptosporidium* ve *Acanthamoeba* ssp.'yi araştırdıkları çalışmalarında %36 (8/22) *Acanthamoeba* spp. açısından pozitif bulmuşlardır. Moleküler olarak yaptıkları testlerde kültür sonucu morfolojik olarak *Acanthamoeba* spp.'ye uygun özellik göstermesine rağmen 2 örnekte PCR sonucunu negatif bulmuşlardır (Masangkay ve ark., 2022). Değerli ve arkadaşlarının Türkiye genelinde termal havuzlarda *Acanthamoeba* ve *Naegleria*'nın

genotiplendirilmesini yaptıkları çalışmada toplam 434 su örneğini incelemişlerdir. İnceledikleri örneklerinin %6'sında (26/434) *Acanthamoeba* spp. %0,7'sinde (3/434) *Naegleria* tespit etmişlerdir. Kültürde üretilen 26 örneğin sadece 15'inin PCR ile *Acanthamoeba* olduğunu doğrulanmışlardır ancak 11 SYA'nın hangi gruptan olduğu belirleyememişlerdir. (Değerli ve ark., 2020). Çalışmamızda 100 örnekten toplam 27 tanesinin kültüründe pozitiflik saptanırken 25 örneğin RT-PCR sonucu *Acanthamoeba* spp. olduğu doğrulanmıştır. Kültürde hiç üretilmeyen 73 örneğin 9'u ise RT-PCR'de pozitif bulunmuştur. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında kültür yöntemi uzun süreler gerektirmesine rağmen günümüzde *Acanthamoeba* spp. tespitinde hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Kültür ve RT-PCR sonuçları arasında fark görülmesinin sebebi mikroskop görüntüleri incelenen kültür örneklerinin *Acanthamoeba* spp. ile benzer morfolojik görüntülere sahip *Vermamoeba* spp. (*Hartmannella*) olabileceği düşünülmektedir. *Acanthamoeba* türleri birçok genotipe sahiptir ve yeni genotipler keşfedilmektedir.

Acanthamoeba spp. tüm dünyada farklı iklim özelliklerine sahip bölgelerde ve farklı su kaynaklarında bulunmaktadır. Mevsimsel değişiklikler, *Acanthamoeba* spp.'nin varlığı ile ilişkilendirilebilir. Kao ve arkadaşlarının Tayvan'da bulunan Puzih Nehri havzasındaki *Acanthamoeba* spp.'nin varlığını değerlendirdikleri çalışmalarında toplam 136 su örneği toplamışlardır. Örnek toplama 2009 Temmuz- 2010 Mart arasında dört mevsimi kapsayacak şekilde yapılmıştır. 136 örneğin 16'sında (%11,7) *Acanthamoeba* spp. saptamışlardır. *Acanthamoeba* spp. mevsimsel olarak ilkbahar (%2,9), yaz (%32,4), sonbahar (%2,9) ve kış (%8,8) tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucuna göre *Acanthamoeba* spp. en sık yaz aylarında saptamışlardır (Kao ve ark., 2013). Carnt ve arkadaşlarının Sidney'de yaptığı araştırmada musluk sularında *Acanthamoeba* spp.'nin mevsimsel değişimi incelemişlerdir. Toplamda 97 örnek toplamış ve bunların %28,6 'sında *Acanthamoeba* tespit etmişlerdir. Yaz döneminde 54 örnekten 16'sı (%29,6), kış döneminde 43 örnekten 12'si (%27,9) pozitif olarak saptamışlardır. Yaz aylarında saptanan *Acanthamoeba*'nın kış aylarında saptanana göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Carnt ve ark., 2020). Çalışmamızda dört farklı mevsimde toplanan örneklerin kültür sonuçlarına göre *Acanthamoeba* spp. saptanma durumu değerlendirildiğinde 12 tane pozitif kültür sonucu ile en çok yaz mevsiminde saptanmıştır.

Sonuç olarak, 100 farklı su örneği NNA-*E.coli* ve BCYE besiyerlerine kültüre edilmiş. NNA-*E.coli* besiyerinde 22 (%22) BCYE besiyerinde (%19) *Acanthamoeba* spp. üretilmiştir. İki besiyeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. RT-PCR yöntemi ile toplam 25 *Acanthamoeba* spp. saptanmıştır (%25). Besiyerlerinin RT-PCR ile uyumu kapa katsayısı hesaplanarak istatistiksel olarak ($p<0.005$) anlamlı ve iki yönlü olarak kabul edilebilir bulunmuştur. *Acanthamoeba* büyümesini farklı kültür ortamlarında karşılaştıran az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu amip için daha yeni ve daha erişilebilir kültür ortamları keşfedilmesine ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Akyol, N., Aşçı, Z., ve Kükner, S. (1996). Acanthamoeba keratitis: the first reported case from Turkey. *Ophthalmic Practice*, 2, 46-48.
- Al-Herrawy, A. Z., Heshmat, M. G., Abu Kabsha, S. H., Gad, M. A., ve Lotfy, W. M. (2015). Occurrence of Acanthamoeba species in the Damanhour drinking water treatment plant, Behera Governorate (Egypt). *Reports in Parasitology*, 15-21.
- Almeria, S., Robertson, L., ve Santin, M. (2021). Why foodborne and waterborne parasites are important for veterinarians. In (Vol. 136, pp. 198-199): Elsevier.
- Anwar, A., Khan, N. A., ve Siddiqui, R. (2018). Combating Acanthamoeba spp. cysts: what are the options? *Parasites & vectors*, 11(1), 1-6.
- Awwad, S. T., Petroll, W. M., McCulley, J. P., ve Cavanagh, H. D. (2007). Updates in Acanthamoeba keratitis. *Eye & contact lens*, 33(1), 1-8.
- Aykur, M. (2020). *İzmir İlinde Toplanan Çevresel Örneklerde Acanthamoeba spp., Naegleria fowleri, Balamuthia mandrillaris Araştırılması*
- Aykur, M., ve Dagci, H. (2021). Evaluation of molecular characterization and phylogeny for quantification of Acanthamoeba and Naegleria fowleri in various water sources, Turkey. *PloS one*, 16(8), e0256659.
- Baldursson, S., ve Karanis, P. (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2004–2010. *Water research*, 45(20), 6603-6614.
- Bunsuwansakul, C., Mahboob, T., Hounkong, K., Laohaprapanon, S., Chitapornpan, S., Jawjit, S., ve ark. (2019). Acanthamoeba in Southeast Asia—overview and challenges. *The Korean journal of parasitology*, 57(4), 341.
- Carnt, N., ve Stapleton, F. (2016). Strategies for the prevention of contact lens-related Acanthamoeba keratitis: a review. *Ophthalmic and physiological optics*, 36(2), 77-92.
- Carnt, N. A., Subedi, D., Lim, A. W., Lee, R., Mistry, P., Badenoch, P. R., ve ark. (2020). Prevalence and seasonal variation of Acanthamoeba in domestic tap water in greater Sydney, Australia. *Clinical and Experimental Optometry*, 103(6), 782-786.
- Castrillón, J. C., ve Orozco, L. P. (2013). Acanthamoeba spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista chilena de infectología*, 30(2), 147-155.

- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., ve Rodier, M. (2014). Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *Journal of Hospital Infection*, 87(3), 131-140.
- CDC. (2012). *Acanthamoeba granulomatous amebic encephalitis, microbial keratitis prevention and control*. <https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/microbial-keratitis.html>
- CDC. (2019). *Acanthamoeba spp. life cycle*. <https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/pathogen.html>
- Chan, L.-L., Toh, H.-C., Jaikwang, K., Loo, E.-M., Wong, J.-H., Liew, Y.-K., ve ark. (2022). Report of rare genotypes of *Acanthamoeba* from soil source of the Payeh Maga Highland forest, North-eastern Sarawak, Malaysia. *Acta Tropica*, 229, 106372.
- Chang, C. W., Wu, Y. C., ve Ming, K. W. (2010). Evaluation of real-time PCR methods for quantification of *Acanthamoeba* in anthropogenic water and biofilms. *Journal of applied microbiology*, 109(3), 799-807.
- Chaudhry, F. N., ve Malik, M. (2017). Factors affecting water pollution: a review. *J Ecosyst Ecography*, 7(225), 1-3.
- Corsaro, D., Kohsler, M., Montalbano Di Filippo, M., Venditti, D., Monno, R., Di Cave, D., ve ark. (2017). Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol Res*, 116(4), 1273-1284. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5406-1>
- Corsaro, D., Köhsler, M., Montalbano Di Filippo, M., Venditti, D., Monno, R., Di Cave, D., ve ark. (2017). Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitology research*, 116, 1273-1284.
- da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B., ve Marciano-Cabral, F. (2009). Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.
- de Obeso Fernandez del Valle, A., ve Scheckhuber, C. Q. (2022). Superoxide dismutases in eukaryotic microorganisms: four case studies. *Antioxidants*, 11(2), 188.

- Değerli, S., Değerli, N., Çamur, D., Doğan, Ö., ve İter, H. (2020). Genotyping by sequencing of *Acanthamoeba* and *Naegleria* isolates from the thermal pool distributed throughout Turkey. *Acta Parasitologica*, *65*, 174-186.
- Efstratiou, A., Ongerth, J. E., ve Karanis, P. (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2011–2016. *Water research*, *114*, 14-22.
- El-Sayed, N. M., ve Hikal, W. M. (2015). Several staining techniques to enhance the visibility of *Acanthamoeba* cysts. *Parasitology research*, *114*, 823-830.
- Eroğlu, F., Evyapan, G., ve Koltaş, İ. S. (2015). The cultivation of *Acanthamoeba* using with different axenic and monoxenic media. *Middle Black Sea Journal of Health Science*, *1*(3), 13-17.
- Fuerst, P. A., ve Booton, G. C. (2020). Species, sequence types and alleles: dissecting genetic variation in *Acanthamoeba*. *Pathogens*, *9*(7), 534.
- Galarza, C., Ramos, W., Gutierrez, E. L., Ronceros, G., Teran, M., Uribe, M., ve ark. (2009). Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *International journal of dermatology*, *48*(12), 1324-1329.
- Gast, R. J., Ledee, D. R., Fuerst, P. A., ve Byers, T. J. (1996). Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *43*(6), 498-504.
- Hajjalilo, E., Behnia, M., Tarighi, F., Niyyati, M., ve Rezaeian, M. (2016). Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. *Parasitology research*, *115*, 3147-3151.
- Hajjalilo, E., Rezaeian, M., Niyyati, M., Pourmand, M. R., Mohebbali, M., Norouzi, M., ve ark. (2019). Molecular characterization of bacterial, viral and fungal endosymbionts of *Acanthamoeba* isolates in keratitis patients of Iran. *Experimental parasitology*, *200*, 48-54.
- Henriquez, F. L., Mooney, R., Bandel, T., Giammarini, E., Zeroual, M., Fiori, P. L., ve ark. (2020). Paradigms of Protist/Bacteria Symbioses Affecting Human Health: *Acanthamoeba* species and *Trichomonas vaginalis*. *Front Microbiol*, *11*, 616213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616213>
- Ibrahim, Y. W., Boase, D. L., ve Cree, I. A. (2007). Factors affecting the epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmic epidemiology*, *14*(2), 53-60.

- Jager, B., ve Stamm, W. (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *The Lancet*, 300(7791), 1343-1345.
- Jercic, M. I., Aguayo, C., Saldarriaga-Córdoba, M., Muiño, L., Chenet, S. M., Lagos, J., ve ark. (2019). Genotypic diversity of *Acanthamoeba* strains isolated from Chilean patients with *Acanthamoeba* keratitis. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-7.
- Kalra, S. K., Sharma, P., Shyam, K., Tejan, N., ve Ghoshal, U. (2020). *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. *Experimental parasitology*, 208, 107788.
- Kao, P.-M., Chou, M.-Y., Tao, C.-W., Huang, W.-C., Hsu, B.-M., Shen, S.-M., ve ark. (2013). Diversity and seasonal impact of *Acanthamoeba* species in a subtropical rivershed. *BioMed research international*, 2013.
- Karaman, S., ve Gökalp, Z. (2010). Küresel Isınma ve İklim Değişikliğinin Su Kaynakları Üzerine Etkileri. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*(1), 59-66.
- Karimi, A., Kheirandish, F., Mamaghani, A. J., Taghipour, N., Mousavi, S. F., Aghajani, A., ve ark. (2023). Identification and genotyping of *Acanthamoeba* spp. in the water resources of western Iran. *Parasite Epidemiology and Control*, e00308.
- Khan, N. A. (2003). Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial pathogenesis*, 34(6), 277-285.
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 564-595.
- Khan, N. A., ve Tareen, N. K. (2003). Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia parasitologica*, 50(2), 97-104.
- Koyun, I., Koloren, Z., Karaman, U., Tsiami, A., ve Karanis, P. (2020). *Acanthamoeba* spp. in river water samples from the Black Sea region, Turkey. *J Water Health*, 18(2), 186-199. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.170>
- Król-Turmińska, K., ve Olender, A. (2017). Human infections caused by free-living amoebae. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(2).
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., ve Walochnik, J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22.

- Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galván-Díaz, A., Izquierdo, F., Fenoy, S., ve Del Aguila, C. (2014). Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology research*, *113*(8), 2845-2850.
- Mahmoudi, M., Maleki, M., Zebardast, N., Rahmati, B., Ashrafi, K., Sharifdini, M., ve ark. (2022). Identification of *Acanthamoeba* spp. from water and soil of public parks in the north of Iran. *Journal of Water and Health*, *20*(10), 1604-1610.
- Marciano-Cabral, F., ve Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, *16*(2), 273-307.
- Masangkay, F. R., Milanez, G. D., Dionisio, J. D., Ormita, L. A. G.-L., Alvarez, A. V., ve Karanis, P. (2022). Well water sources simultaneous contamination with *Cryptosporidium* and *Acanthamoeba* in East-Southeast Asia and *Acanthamoeba* spp. in biofilms in the Philippines. *Science of the Total Environment*, *837*, 155752.
- Matin, A., ve Jung, S.-Y. (2011). Phospholipase activities in clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. *The Korean journal of parasitology*, *49*(1), 1.
- Michalek, M., Sönnichsen, F. D., Wechselberger, R., Dingley, A. J., Hung, C.-W., Kopp, A., ve ark. (2013). Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic *acanthamoeba*. *Nature chemical biology*, *9*(1), 37-42.
- Milanez, G. D., Masangkay, F. R., Scheid, P., Dionisio, J. D., Somsak, V., Kotepui, M., ve ark. (2020). *Acanthamoeba* species isolated from Philippine freshwater systems: epidemiological and molecular aspects. *Parasitology research*, *119*, 3755-3761.
- Mungroo, M. R., Khan, N. A., Maciver, S., ve Siddiqui, R. (2022). Opportunistic free-living amoebal pathogens. *Pathogens and global health*, *116*(2), 70-84.
- Nagington, J., Watson, P., Playfair, T., McGill, J., Jones, B., ve Steele, A. M. (1974). Amoebic infection of the eye. *The Lancet*, *304*(7896), 1537-1540.
- Nieder Korn, J. Y. (2021). The biology of *Acanthamoeba* keratitis. *Experimental Eye Research*, *202*, 108365.
- Parija, S. C., Dinoop, K., ve Venugopal, H. (2015). Management of granulomatous amebic encephalitis: Laboratory diagnosis and treatment. *Tropical Parasitology*, *5*(1), 23.

- Patel, D. V., ve McGhee, C. N. (2009). Acanthamoeba keratitis: a comprehensive photographic reference of common and uncommon signs. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 37(2), 232-238.
- Penland, R. L., ve Wilhelmus, K. R. (1997). Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of Acanthamoeba. *Journal of clinical microbiology*, 35(4), 915-922.
- Plutzer, J., ve Karanis, P. (2016). Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water research*, 101, 318-332.
- Polat, Z. A., Özçelik, S., Vural, A., ve Saygı, G. (2007). Aksenik kültürlerde Acanthamoeba trofozoitleri üzerindeki gözlemler ve bunların farklı boyalarla boyanma özellikleri. *Türkiye Parazitol Derg*, 31(1), 7-13.
- Possamai, C. O., Loss, A. C., Costa, A. O., Falqueto, A., ve Furst, C. (2018). Acanthamoeba of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. *Parasitology research*, 117, 1389-1400.
- Putaporntip, C., Kuamsab, N., Nuprasert, W., Rojrung, R., Pattanawong, U., Tia, T., ve ark. (2021). Analysis of Acanthamoeba genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 Acanthamoeba bangkokensis sp. nov. *Sci Rep*, 11(1), 17290. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96690-0>
- Putaporntip, C., Kuamsab, N., Nuprasert, W., Rojrung, R., Pattanawong, U., Tia, T., ve ark. (2021). Analysis of Acanthamoeba genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 Acanthamoeba bangkokensis sp. nov. *Scientific reports*, 11(1), 17290.
- Raju, R., Khurana, S., Mahadevan, A., ve John, D. (2022). Central nervous system infections caused by pathogenic free-living amoebae: An Indian perspective. *Trop. Biomed*, 39, 265-280.
- Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *Journal of clinical pathology*, 33(12), 1179-1183.
- Saburi, E., Rajaii, T., Behdari, A., Kohansal, M. H., ve Vazini, H. (2017). Free-living amoebae in the water resources of Iran: a systematic review. *J Parasit Dis*, 41(4), 919-928. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0950-2>

- Satlin, M., Graham, J., Visvesvara, G., Mena, H., Marks, K., Saal, S., ve ark. (2013). Fulminant and fatal encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a kidney transplant recipient: case report and literature review. *Transplant Infectious Disease*, 15(6), 619-626.
- Sawyer, T. K., ve Griffin, J. L. (1975). A proposed new family, Acanthamoebidae n. fam.(order Amoebida), for certain cyst-forming filose amoebae. *Transactions of the American Microscopical Society*, 93-98.
- Schimmel, M., ve Mehta, I. (2020). Granulomatous amebic encephalitis. *N Engl J Med*, 383(13), 1262.
- Schuster, F. L., ve Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International journal for parasitology*, 34(9), 1001-1027.
- Siddiqui, R., ve Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & vectors*, 5(1), 1-13.
- Siddiqui, R., ve Khan, N. A. (2012). War of the microbial worlds: who is the beneficiary in *Acanthamoeba*-bacterial interactions? *Exp Parasitol*, 130(4), 311-313. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.021>
- Siripurapu, G., Samad, S. A., Fatima, S., Wig, N., ve Srivastava, M. P. (2021). Successful management of post-COVID-19 acanthamoebic encephalitis. *International Journal of Infectious Diseases*, 110, 226-228.
- Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., ve Visvesvara, G. S. (2008). Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *Journal of clinical microbiology*, 46(12), 4045-4048.
- Syed, M. M., Hossain, M. S., Karim, M. R., Uddin, M. F., Hasan, M., ve Khan, R. H. (2023). Surface water quality profiling using the water quality index, pollution index and statistical methods: A critical review. *Environmental and Sustainability Indicators*, 100247.
- Tawfeek, G. M., Bishara, S. A.-H., Sarhan, R. M., ElShabrawi Taher, E., ve ElSaady Khayyal, A. (2016). Genotypic, physiological, and biochemical characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from the environment in Cairo, Egypt. *Parasitology research*, 115, 1871-1881.
- Taxonomy. (2022). *Taxon:* Genus *Acanthamoeba*. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1064&src=0>

- Tombul, F. (2014). Uluslararası Antlaşmalar Çerçevesinde Meriç Havzasında Su Yönetimi.
- Varacalli, G., Di Zazzo, A., Mori, T., Dohlman, T. H., Spelta, S., Coassin, M., ve ark. (2021). Challenges in Acanthamoeba keratitis: a review. *Journal of Clinical Medicine*, 10(5), 942.
- Walochnik, J., Scheikl, U., ve Haller-Schober, E. M. (2015). Twenty years of Acanthamoeba diagnostics in Austria. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), 3-11.
- Wang, Y., Jiang, L., Zhao, Y., Ju, X., Wang, L., Jin, L., ve ark. (2023). Biological characteristics and pathogenicity of Acanthamoeba. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- WHO. (2018). *WASH strategy 2018-2025*.
<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CED-PHE-WSH-18.03>
- Yünlü, Ö., Özçelik, S., ve Arici, M. K. (2015). The investigation of Acanthamoeba and other free living amoeba in swab samples obtained from conjunctiva and eye lid. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39(3), 194.
- Zhang, Y., Xu, X., Wei, Z., Cao, K., Zhang, Z., ve Liang, Q. (2023). The global epidemiology and clinical diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Journal of Infection and Public Health*.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÇEVRESEL SU ÖRNEKLERİNDE Acanthamoeba spp.'nin KÜLTÜR VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 10	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	earsiv.odu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.populermedikal.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1