



T.C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAMSUN İLİNDEN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDE
***Acanthamoeba* spp.'nin MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE**
ARAŞTIRILMASI

İLKNUR KOYUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ORDU 2018

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALİ

SAMSUN İLİNDEN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDE
Acanthamoeba spp.'nin MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

İLKNUR KOYUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2018

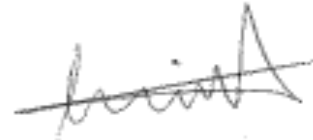
TEZ ONAY

İlknur KOYUN tarafından hazırlanan "SAMSUN İLİNDEN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDE *Acanthamoeba* spp.'nin MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17/07/2018 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALINDA YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN



Üye
Doç. Dr. Cihangir AKDEMİR
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi,
Giresun Üniversitesi



Üye
Doç. Dr. Ülkü KARAMAN
Parazitoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi,
Ordu Üniversitesi



Üye
Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Fen Fakültesi,
Ordu Üniversitesi



15/08/2018 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezi kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 27/08/2018 tarih ve 2018.../322 sayılı karar ile onaylanmıştır.

Dr. Öğr. Üyesi Melimet Sami GÜLER



TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

İlknur KOYUN

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün

BY - 1719 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

SAMSUN İLİNDEN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDE *Acanthamoeba* spp.'nin MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

İlknur KOYUN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ 74 SAYFA

Danışman: Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN

Acanthamoeba türleri toprak, hava ve su ortamlarında yaşar. Granüloamatöz Amibik Ensefalit (GAE) ve *Acanthamoeba* keratiti (AK) gibi önemli hastalıklara sebep olur. *Acanthamoeba* enfeksiyonuna karşı hala etkili bir tedavi bulunmadığı için önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir.

Çalışmada Samsun ilinden alınan su örneklerinde *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesi ilk defa yapılmıştır. Samsun ilinde belirlenen 32 istasyondan (Samsun, Terme, Çarşamba, Tekkeköy, Bafra) alınan 192 su örneğinin 98'inde PCR ile *Acanthamoeba* spp.'nin varlığı tespit edilmiştir. İstasyonlar arasında Terme ilçesinin en yüksek oranda (%64.4) *Acanthamoeba* türlerinin kistleriyle bulaşlı olduğu gözlenmiştir. Bunu sırasıyla Samsun merkez (%41.7), Çarşamba (%40), Tekkeköy (%38.9) ve Bafra (%33.3) ilçeleri takip etmiştir. Sekans analizi sonucunda pozitif su örneklerinin 5'i Haplotip I (*A. triangularis*), 29'u Haplotip II (*A. polyphaga*), 61'i Haplotip III (*Acanthamoeba* sp.) ve 3'ü Haplotip IV olarak belirlenmiştir. Tüm istasyonlar değerlendirildiğinde araştırma alanında en yaygın *Acanthamoeba* genotipinin T4 (*Acanthamoeba* sp., *A. polyphaga*, *A. triangularis*) olduğu ve %3 oranında olsada T5 genotipine de rastlanıldığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda araştırılan sulara en fazla T4 genotipine rastlanması AK'nin bölgede yaşayan ve buradaki sularla temas halinde olan insanlar ve hayvanlar için risk oluşturabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Karadeniz Bölgesi'nin yanısıra Türkiye' de daha önce hiç çalışılmayan farklı istasyonlarda daha fazla sayıda su örneklerinde *Acanthamoeba* suşlarının çeşitliliği, bunların prevalansı, genotiplendirilmesi ve patojenik potansiyeli ile ilgili çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Acanthamoeba* spp., Genotiplendirme, Samsun, Su Kaynaklı Parazitler

ABSTRACT

INVESTIGATION of *Acanthamoeba* spp. in WATER SAMPLES COLLECTED from SAMSUN PROVINCE by MOLECULAR METHODS

İlknur KOYUN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

MSC THESIS, 74 PAGE

Supervisor: Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN

Acanthamoeba species lives in air, soil and aquatic environments. Granulomatous Amoebic Encephalitis (GAE) and *Acanthamoeba* keratitis (AK), are caused by *Acanthamoeba* spp. Acanthamoebiasis is still one of the important public health problem, because it is not an effective treatment against *Acanthamoeba* infections.

In the study, genotyping of *Acanthamoeba* species in water samples collected from Samsun province was performed for the first time. The presence of *Acanthamoeba* spp. was detected by PCR in 98 of 192 water samples collected from 32 sites of Samsun province (Samsun center, Terme, Çarşamba, Tekkeköy, Bafra). Among the investigated sites, it was observed that the highest rate of Terme was found to be contaminated by cysts of *Acanthamoeba* species. This contamination was followed by Samsun center (41.7%), Çarşamba (40%), Tekkeköy (38.9%) and Bafra districts (33.3%), respectively. As a result of the sequence analysis, 5, 29, 61 and 3 of the positive water samples, respectively were identified as Haplotip I (*A. triangularis*), Haplotip II (*A. polyphaga*), Haplotip III (*Acanthamoeba* sp.) and Haplotip IV. When all sites were evaluated, it was determined that the most common *Acanthamoeba* genotype was T4 (*Acanthamoeba* sp., *A. polyphaga*, *A. triangularis*) in the investigated area and T5 genotype was found to be at the rate of 3% as well.

Our study suggests that because the T4 genotype found the most common in the investigated waters, the AK could possible a risk to humans and animals living in the area in contact with the waters. It has been concluded that the diversity of *Acanthamoeba* strains, their prevalence, genotyping and pathogenic potential studies should be studied in more water samples of both in the Black Sea area and Turkey.

Keywords: *Acanthamoeba* spp., Genotyping, Samsun, Waterborne Parasites

TEŞEKKÜR

BY-1719 kodlu Yüksek Lisans Tez Projem'i destekleyen Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP) teşekkür ediyorum.

Yağmıő olduğum tüm çalışmalar boyunca her zaman bilgi ve deneyimleriyle beni hiç yalnız bırakmayan ve sabırla ilgilenen değerli hocam Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN'e en içten teőekkürlerimi sunarım.

Bu hayatta herkesin bir meleği vardır, benim de meleğim olan biricik annem Hatice KOYUN'a ve bu hayatın bana hediye olarak sunduğu biricik kardeőim İlker KOYUN'a daima yanmda oldukları için sonsuz teşekkür ediyorum.

Manevi kardeőlerim olarak nitelendirebileceğim Hilal KUL, Beyza ARSLAN, Cansu SARI, Hacer SUCİ, Gökçen TEKİN, Özgür Nazlıgüloğlu ve A. Burak Tuysuz'e bana inandıkları için teşekkür ederim.

Okul hayatım boyunca maddi manevi hep yanımda olan bu süreçte beni istesem dahi hiç yalnız bırakmayan MİSFOOD ekibine ve Mutlu ÇETİN'e ayrıca teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1 Suyun Önemi.....	1
1.2 Su Kirliliği.....	2
1.3 Su Kalite Standartları	4
1.4 Su Kalitesinin Belirlenme Evreleri	5
1.5 Su Kalite Parametreleri	6
1.6 Su Kirliliğine Neden Olan Protozoonlar	7
1.6.1 <i>Acanthamoeba</i> 'nın Sınıflandırılması ve Hayat Döngüsü.....	8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	22
2.1 <i>Acanthamoeba</i> İle İlgili Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	22
2.2 <i>Acanthamoeba</i> İle İlgili Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar	25
3. MATERYAL ve METOD	29
3.1 Araştırma Bölgesinin Tanımı ve Örneklerin Toplanması	29
3.2 Su Örneklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	32
3.2.1 Su Örneklerinin Toplanması	32
3.2.2 Örneklerin Membran Filtreden Süzdürülmesi.....	32
3.2.3 Ringer Agar Besiyerinin Hazırlanması	33
3.2.4 <i>Escherichia coli</i> Kültürünün Hazırlanması	33
3.2.5 Su Örneklerin Filtratlarının Ringer Agar Besiyerlerine Ekimi	33
3.2.6 <i>Acanthamoeba</i> spp. Sayımının Yapılması	34
3.2.7 Örneklerden DNA İzolasyonunun Yapılması	34
3.2.8 Standart PZR Uygulanması.....	35
3.2.9 Sekans Analizi.....	37
3.3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	37
3.3.1 Sıvı Ringer Solüsyonunun Hazırlanması	37
3.3.2 Ringer-Agar Besiyerinin Hazırlanması	37
3.3.3 Eosin Methylene Blue (EMB) Agar Besiyerinin Hazırlanması	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1 <i>Acanthamoeba</i> spp.’nin Mikroskopla Tespit Edilmesi	39
4.2 <i>Acanthamoeba</i> spp.’nin Moleküler Tekniklerle Tespit Edilmesi	40
4.2.1 PZR Metodunun Özgünlüğü	40
4.2.2 PZR Metodunun Hassasiyeti.....	41
4.3 Araştırma Alanından Alınan Su Örneklerine Ait PZR ve Sekans Analiz Sonuçları ..	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKÇA	59
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 <i>Acanthamoeba</i> Türlerinin Yaşam Alanları	10
Şekil 1.2 <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin Hayat Döngüsü	12
Şekil 1.3 GAE Sonucu Beyinde Oluşan Hasar Ve Yüz Felci	15
Şekil 1.4 <i>Acanthamoeba</i> Keratitli Hastanın Gözleri	16
Şekil 3.1 Örnek Toplanacak İstasyonların Harita Üzerinde Gösterimi	30
Şekil 3.2 Su Örneklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemlerin Akış Şeması	31
Şekil 3.3 Süzdürme İşleminde Kullanılan Vakum Pompası Ve 0.45µm'lik Gözenek Boyutuna Sahip Selüloz Nitrat Membran	32
Şekil 3.4 <i>Acanthamoeba</i> spp. 18S rDNA Geninin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primer Çifti	34
Şekil 3.5 PZR Reaksiyon Karışımı	35
Şekil 4.1 Su Örneklerinden İzole Edilen Ve Kültüre Edilmiş <i>Acanthamoeba</i> Kistlerinin İnvert Mikroskopta Görüntüsü	38
Şekil 4.2 Plaklardan Toplanan <i>Acanthamoeba</i> Kistlerinin Thoma Lamı İle Sayımı	38
Şekil 4.3 <i>Acanthamoeba</i> 18S rDNA Gene Bölgesinin PZR İle Özgünlüğünün Agaroz Jeldeki Görüntüsü	39
Şekil 4.4 Miktarı Belli <i>Acanthamoeba</i> Kistleri (105/MI) İlave Edilen Irmak Suyu Örneklerine Ait PZR Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü	40
Şekil 4.5 Samsun İlinden Alınan Su Örneklerine Ait PZR Yöntemiyle Çoğaltılan Hedef DNA' nın Agaroz Jeldeki Görüntüsü	41
Şekil 4.6 Tüm <i>Acanthamoeba</i> Genotipleri 18S rDNA Gen Bölgesine Ait NJ Filogeni Ağacı	48

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 <i>Acanthamoeba castellanii</i> 'nin Sistematığı	9
Çizelge 1.2 <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin Morfolojik Olarak Gruplandırılması.....	11
Çizelge 1.3 <i>Acanthamoeba</i> spp.'leri ve Sebep Olduğu Hastalıklar	14
Çizelge 3.1 <i>Acanthamoeba</i> spp. 18S rDNA PZR koşulu.....	35
Çizelge 4.1 Samsun İlinde Belirlenen İstasyonlardan Alınan Su Örneklerinde <i>Acanthamoeba</i> spp.'nin Gösterilmesi.....	42
Çizelge 4.2 Samsun İlinden Alınan Pozitif PZR Ürünlerinin Sekans Analiz Sonuçları	43
Çizelge 4.3 Gen Bankasından Alınan <i>Acanthamoeba</i> Genotipleri ve Su Örneklerine Ait 18S rDNA Gen Bölgesi Yüzde Nükleotid Benzerliği ve Evrimsel Uzaklık İlişkisi.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	: <i>Acanthamoeba</i> Keratiti
BOI	: Biyolojik Oksijen İhtiyacı
CDC	: Hastalık Kontrol Merkezi
EMB	: Eosin Methylene Blue
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
g	: Gram
GAE	: Granülomatöz Amibik Ensefalit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
İTASHY	: İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik
km	: Kilometre
KOI	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
m	: Metre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MSS	: Merkezi sinir Sisitemi
NaCl	: Sodyum Klorür
NNA	: Non Nutrient Agar
PPYG	: Proteaz Pepton - Maya Özütü-Glukoz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Lenght Polymorphism
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
SKKY	: Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği
SYA	: Serbest Yaşayan Amip
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1 Suyun Önemi

Dünya var olduğundan itibaren canlılığın devamlılığı için gerekli olan ilk kaynak sudur. Su, sadece insanlar için değil, doğadaki bütün canlıların da hayatını sürdürebilmesi için gerek duyduğu en temel ihtiyaçlardan birisidir (Toroğlu ve ark., 2006). Dünyadaki tüm döngülerin gerçekleşmesinden hücre faaliyetlerine kadar bütün olaylarda suya gereksinim duyulmaktadır. Besin maddesi olmasıyla birlikte, sahip olduğu bileşik ve mineraller ile vücutta gerçekleşen tüm biyokimyasal olaylarda rol almaktadır. Bir hücreli canlılardan çok hücreli canlılara kadar tüm biyolojik yaşamı devam ettiren sudur. Vücudumuz da beyin fonksiyonlarının gerçekleşmesi, vücut sıcaklığının düzenlenmesi, gıdaların sindirimi, metabolizmanın düzenli çalışması, toksinlerin temizlenmesi, besin ve oksijenin hücrelere taşınması ve pH dengesinin korunması gibi birçok görevi bulunmaktadır (Akın ve Akın, 2007).

Yaşamın temellerinin suda atılması ve ekosistemdeki vazgeçilmez yerinden dolayı su, dünyada sınırlı kaynaklar arasında yer almaktadır. Yeryüzünün 2/3'ü sular ile çevrili olduğu halde dünya su rezervlerinin yalnızca %0.3'ü içilebilir ve kullanılabilir su olma özelliğine sahiptir. Hidrolojistlere göre, yeryüzündeki toplam su miktarının %97.5'ini tuzlu sular, %2.5'ini ise tatlı sular oluşturmaktadır (Tombul, 2014). Dünyadaki suyun miktarı ise toplam 1.388 milyon km³'tür. Bu su miktarının %96.6'sını (1.340 milyon km³) denizler, %3.5'ini (48 milyon km³) karalar, %21.74'ünü (24 km³) buzullar, %1.66'sını (23 km³) yer altı suları, %0.1'ini (1 km³) atmosferdeki miktarı, göller ve akarsular oluşturmaktadır. Fakat bu su miktarının tatlı su olarak sadece %1.76'sı kullanılabilir özelliktedir (Mitscherlich, 1995; Haviland, 2002; Dağlı, 2005).

Dünya nüfusunun hızla büyüme göstermesi kullanılabilir su kaynakları sayısının hızla azalmasına sebep olmaktadır. Bunun yanısıra tatlı su kaynaklarının az olması ve artan nüfus suya olan talebi her geçen gün arttırmaktadır. Suyu olan bu talebin artması su

kaynaklarının kirletilmesine, ekolojik tahribatın oluşmasına, suyun kötü yönetilerek israf edilen su miktarının da artmasına neden olmaktadır (Çolakoğlu, 2009).

Yirmi birinci yüzyılın başlarında 6.2 milyar olan dünya nüfusunun, %69.3'lük bir artışla 2050 yılında 10.5 milyar olması öngörülmektedir. İnsanların kullanmış olduğu su miktarı 1940 yılında 1×10^{12} m³ iken, 1990 yılında bu miktar 4.13×10^{12} m³'e yükselmiştir. İlerleyen yıllarda ise nüfus artış oranı dikkate alındığında su tüketiminin dörtte bir oranında artacağı düşünülmektedir (Kanber, 2007).

Yaklaşık 80 ülke su sorunu yaşamaktadır ki bu dünya nüfus dağılımının %40'ını oluşturmaktadır. Bu sebeple su kaynakları çok iyi yönetilerek atık su temizleme yöntemleri belirlenmeli ve hayat standartlarına zarar vermeden yapılacak çalışmalar ile su kaynaklarının temizlenmesi sağlanmalıdır (Karaytuğ, 2015).

Yeryüzüne yıllık inen yağış miktarı 1000 mm'dir. Türkiye'ye düşen yağış miktarı ise 643 mm olarak hesaplanmıştır. Türkiye'nin kullanılabilir mevcut su kapasitesi 110×10^6 m³'tür. Bu su kapasitesinin 17.6 milyar m³'ü içme ve kullanma suyunda, 79.2 milyar m³'ü tarım arazilerinin sulanmasında, 13.2 milyar m³'ü de endüstride kullanılmaktadır. Türkiye'nin yıllık yağış ortalamasının dünya geneline oranla az olması, nüfus sayısının artması yaklaşan tehlikeyi işaret etmektedir. Bu sebepten dolayı sahip olunan kaynakların kullanımında daha dikkatli olunmalı ve kirliliği önlemek için gerekli çalışmalar yapılmalıdır (Anonim, 2016a).

Yeryüzündeki suyun neredeyse tamamı tek bir döngüyle birbirini takip ettiğinden dolayı genel olarak kirlenme riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Suyun kalitesini bozan faktörlerin miktarı az da olsa suda çözünmediği için su yüzeyinde ince bir katmana neden olur. Bu katmandan dolayı suyun atmosferde dönüşümü aynı zamanda ısı alışverişi ve oksijen değişimi zorlaşarak sudaki hayatı olumsuz yönde etkilemektedir (Çetin, 2011).

1.2 Su Kirliliği

Su kirliliği insanların ekosisteme etkileri neticesinde elde edilen, kullanımı engelleyen ya da kısıtlayan ve ekonomik dengelerin farklılaşmasına yol açan kalite değişimleridir. Diğer bir ifade ile su kirliliği; su kaynaklarının kimyasal ya da fiziksel, radyoaktif, ekolojik ve bakteriyolojik özellikleri bakımından sahip olduğu değerlerin negatif olarak değişmesiyle ortaya çıkan sonuçlardır. Bu sonuçlar dolaylı ya da dolaysız

yönden su kalitesini, insan sağlığını ve su ile ilgili bütün alanlarda oluşacak atıkların serbest kalmasını kapsamaktadır (Yaman, 2010).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) yapmış olduğu tanım ise canlı sağlığını tehlikeye sokan, doğal kaynakların tahrip olması, su ürünleriyle ilgili yapılan çalışmaların negatif yönde sonuçlar ortaya koymasına sebep olan maddelerin su kaynaklarına karışması olarak ifade edilmektedir (Yanık ve Atamanalp 2001; Sönmez Tamer ve Manavay, 2003).

Su kirliliğine sebep olabilecek birden fazla neden vardır. Çevresel sularda kirlenmeyi sağlayan etkenleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) şöyle sınıflandırmıştır:

- 1) Virüs, bakteri ve hastalık yapan mikroorganizmalar
- 2) Zirai mücadele ilaçları
- 3) Sanayi atıkları
- 4) Yağlar ve benzeri maddeler
- 5) Radyoaktivite
- 6) Yapay deterjanlar
- 7) Organik maddelerden kaynaklanan kirlenme
- 8) Kimyasal madde ve türevleri
- 9) İnorganik tuzlar
- 10) Doğal ve sentetik gübreler

Suların yaygın kirletici kaynakları ise iki grup olarak sınıflandırılmaktadır.

- 1) Noktasal Kaynak
- 2) Dağılmış Kaynak

Noktasal kaynak, kirlenmeye yol açan maddenin su kaynaklarına bulaştığından emin olunan ve bu bölgenin kontrol altına alınabilecek kaynaktır. Endüstriyel, tarımsal ve evsel artıklarla kontamine olmuş sular hiçbir işleme tabi tutulmadan dere ya da göllere boşaltılan kaynakları kapsamaktadır (Haller ve ark., 2008).

Dağılmış kaynak, kirlenmeye yol açan maddenin su kaynağına karıştığı bölgenin belirlenemediği ve kontrol altına alınması mümkün olmayan kaynaktır. Tarımsal alanda kullanılan ilaçlı sular, atık madde toplama fabrikalarından sızan sular, atmosfere dağılan gazlar dağılmış kaynak kirliliğine sebep olan en önemli başlıklar arasında yer almaktadır (Hepsağ, 2003; Kayıkçı, 2015).

Son zamanlarda doğal kaynaklarda oluşan kirlenme, su kaynaklarının verimli olarak kullanılabilmesini sağlamak için suyun belirli standartlara sahip olması ve standartların düzenli takip edilmesi gerekmektedir. Suyun kirletici etkenlerini saptayabilmek, suyun kirlenme derecesini belirleyebilmek ve gerekli tedbirlerin alınabilmesi için ilk ve öncelikli olarak su kirleticilerinin de takip edilmesi gerekir (Olgun, 2010; Öksüz, 2010; Kayıkçı, 2015).

1.3 Su Kalite Standartları

Su kalite standardı, suyun kullanılabilirliğini gösteren ve sahip olduğu özelliklerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik yönden incelenmesini içeren bir terimdir (Akyurt, 1993; Taş ve ark., 2010). Canlıların büyüme, gelişme, üreme ve beslenme gibi vital fonksiyonlarının sucül ekosistemde su kalite standartlarıyla ilişkilidir.

Su kirliliğinin önlenmesinde, su kalite standartlarının belirlenmesi ve bu belirlenen standartların sabit kalması için gereken çalışmaların yapılması gerekmektedir. Su kalite sınıflarının belirlenmesi için yapılan bu çalışmalara su kalitesi kriterleri denilmektedir.

Belirlenen bu kriterlerin sularda olabilecek birçok kirletici faktörlerin doğadaki canlı hayatındaki etkilerini, etki etme dozlarını ve hangi şartlarda nasıl zararlar verebileceğini açıklayan verilerdir (Başbüyük, 1992).

Suyun hangi amaçla kullanılmasına dikkat edilmeksizin tüm kaynakların sağlık şartlarına uygun olarak muhafaza edilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda su kaynaklarının planlanma ve korumasına ilişkin yapılacak fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin sonuçları su kalite kriterlerini belirler (Kayıkçı, 2015).

Bu kalite sınıflarını şöyle sıralayabiliriz;

- 1) Yüksek Kaliteli Su: Birinci sınıf su gurubunu oluşturur. İçme suyunda, rekreasyonel amaçlı ve çiftlikte kullanılan sular, alabalık ve hayvan yetiştiriciliğinde tercih edilen sular.
- 2) Az Kirlenmiş Su: İkinci sınıf su gurubunu kapsamaktadır. SKKY'ne göre gerekli şartlar sağlandığında sulama suyu olarak kullanımı, alabalık dışındaki balıkların yetiştiriciliğinde ve uygun arıtma yapılarak içme suyu temini, Yüksek Kaliteli Suyun kullanımının yapılmadığı diğer tüm alanlarda kullanılmaktadır.

- 3) Kirlenmiş Su: Üçüncü sınıf su gurubudur. Giyim ve gıda sektörü dışındaki kaliteli suya gereksinim duyulmayan ve gerekli arıtma işlemleri uygulandıktan sonra endüstride kullanılan su sınıfıdır.
- 4) Çok Kirlenmiş Su: Kullanım amacına bakılmaksızın tercih edilmeyen su sınıfıdır.

Su kaynaklarının herhangi bir sınıfta yer alabilmesi için bütün değerlerinin bu dört sınıfın verileriyle aynı olması gerekmektedir (Kayıkçı, 2015).

WHO atık suların doğaya bırakılabilmesi için sahip olması gereken mikrobiyolojik parametreleri belirlemiştir. Ancak bu parametrelerin hayata geçirilmesi esnasında yaşanan bazı zorluklardan dolayı tam olarak uygulanamamaktadır. Kirliliği ölçmek için yapılacak olan işlemlerin uygulama süresinin fazla olması, yöntemlerin uygulanmasındaki teknik zorluklar ve bu alanda çalışan kişi sayısının az olması gibi sebeplerden dolayı bu önlemler planlandığı şekilde uygulanamamaktadır (Berberoğlu ve Güngör, 2013).

1.4 Su Kalitesinin Belirlenme Evreleri

Su kalitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler oldukça fazladır. Su kalite kriterlerinin belirlenmesi suyun günümüzde ve gelecekte hangi amaçla tüketileceğine, günümüz çevre şartlarına ve yürürlükte yer alan kanunlar ölçü alınarak belirlenmiştir. Su kalitesinin belirlenmesindeki aşamalar aşağıdaki gibi sıralanmıştır (Hepsağ, 2003).

- Su kalitesinin belirlenmesinde güncel durum araştırılmalı, su kaynaklarının hidrolojik verileri, su kaynaklarının tüketimindeki sebepler, bölge ekonomisi ve yürürlükteki kanunlar esas alınmalıdır.
- Yapılması gereken ilk çalışmalar zaman açısından kısa süren araştırmalar olmalıdır. Kaynakların kirlenmesine yol açan etmenlerin saptanması, bu etmenlerin izlenilmesinde kullanılacak yöntemler ve fizibilite çalışmasını kapsamaktadır.
- Hidrolojik gözlem, kaynaklarda öngörülen tahliyelerin belirlenmesi ve su düzeyinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve sıcaklık farklarının kaydedilmesidir.
- Toplanan örneklerin laboratuvarında önceden tespit edilen analizler doğrultusunda biyolojik parametreler doğrultusunda yapılmaktadır.

- Laboratuvar analiz sonuçlarından alınan verilerin kalitesi kontrol edilir. Farklı laboratuvarlar kullanılarak verilerin doğru ve güvenilir olması sağlanmaya çalışılmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre istatistiksel değerlendirilmesi gerçekleştirilir.
- Analiz sonuçları ve istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre yorumlama yapılarak mevcut durum saptanır. Kaynaklardaki kirlenme çeşitliliği, kirleticinin bulunduğu yerler ve kirleticisi miktarları kıyaslanır. Su kalite sonuçları, arazinin kullanım amacı ve kirlenmeye sebep olan kaynak veya kaynaklar arasında oluşan bağ araştırılmaktadır. Ortaya konulan bu değerlendirme sonuçları esas alınarak gerekli düzenlemelere karar verilmektedir.

1.5 Su Kalite Parametreleri

İçme suyunun kullanıma elverişli hale getirilmesinin yanı sıra bu suların aynı zamanda sahip oldukları kalitenin de bozulmadan korunmaya devam etmesi oldukça önemlidir. Bu sebepten dolayı gelecek yıllarda da kaynakların hala içilebilir su olma özelliği gösterebilmeleri için mevcut durumun takip edilmesi gerekmektedir. Sağlık Bakanlığı ile 2005'te gerçekleşen Avrupa Birliğine Üyelik müzakereleri dâhilinde çıkartılan "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkındaki Yönetmelik" sayesinde içilebilir su olması için gereken özellikler belirlenmiştir (İTASHY, 2014a).

Su kalitesini belirleyen parametreleri biyolojik, fiziksel ve kimyasal şeklinde sınıflandırarak incelemeler yapılmaktadır. Bu sınıflandırmanın dışında yer alan başka bir sınıflandırma şeklinde spesifik ve konvansiyonel olarak sınıflandırmadır. Kolay ölçülebilen ve kolaylıkla yorumlanabilen konvansiyonel parametre yöntemleri en çok tercih edilen yöntemdir. Bu parametreler BOI (Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı) ve KOI (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) gibi etmenleri kapsar. Sulardaki ağır metal ve toksik olarak nitelendirdiğimiz maddeler spesifik parametreler sınıfını oluşturmaktadır. Su kalitesinin suyun kullanım amacına göre belirlendiği durumlarda kullanılmaktadır (Hepsağ, 2003).

Biyolojik sınıflandırmada, suda yaşayan mikroorganizmalar su kalitesini belirleyen parametrelerdendir. Bunlar arasında bakteriler, virüs, parazitler (*E. coli*, Enterokok, Koliform bakteriler, *P. aeruginosa*, *Salmonella*) gibi mikroorganizmaların varlığı

yapılan mikrobiyolojik analizlerde kalite indikatörü olarak kullanılmaktadır. Su kalite testlerindeki mikroorganizma sayısına göre sınıflandırma yapılmaktadır. Özellikle koliform bakteriler bu analizlerde tercih edilmektedir.

Geçmişte ve günümüzde su kaynaklı salgınlardan dolayı hastalıklar ve ölümler su kalitesine verilmesi gereken önemi göstermiştir. Bu sebepten ötürü temiz ve sağlıklı su kullanabilmek için sular arıtma tesislerinde birçok işlemlerden geçirilmesinin ardından kullanıma sunulmaktadır. Dağıtım sistemlerine verilen suyun belirlenen standartlardaki özelliklerin çoğunu taşımaktadır. Ancak suyun bu dağıtım sırasında bazı nedenlerden dolayı sahip olduğu kaliteyi kaybetmektedir (İTASHY, 2014b).

1.6 Su Kirliliğine Neden Olan Protozoonlar

Nüfus yapısı, ulusal ve uluslararası seyahatlerin artması, ekolojik etmenler, sağlık sektöründeki açıklıklar, gıda üretimindeki denetimlerin yetersiz olması ve mikroorganizmaların yaygınlaşması enfeksiyon vakalarını görülmesini etkilemektedir (Çivi ve ark., 2006). Fekal-oral yolu takip eden hemen hemen tüm enterik patojenler, su ile insanlara bulaşabilmektedir (Ford, 1999).

Kullanılabilir su olma özelliğini kaybettiren biyolojik faktörler içinde su kökenli parazitler önemli bir yere sahiptir. Bu parazitler içinde insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen protozoonlardan biri de *Acanthamoeba* türleridir. Sudan bulaşan hastalıklar, hasta veya taşıyıcı konumdaki insan ya da hayvanların dışkılarıyla su kaynaklarının kontamine olması sonucu bulaşmaktadır. Böyle suların hem içme ve hem de temizlik amacıyla kullanımı su kökenli hastalıkların ortaya çıkmasıyla sonuçlanmaktadır (Kuk ve ark., 2013).

Nehir ve kanalizasyon sularının içme sularına karışması, kirli sularla bahçelerin sulanması ve buralardan toplanan sebze ve meyvelerin iyi yıkanmadan tüketilmesi, etlerin gereğinden az pişirilmesi sonucu ortaya çıkan gıda kaynaklı protozoon etkenleri insan sağlığına olumsuz yönde etki etmektedir (Terzi, 2005).

Çoğu gelişmiş ülkelerden bildirilen olguların %50'den fazlasında insanların, yapay göllerde yüzme esnasında enfekte oldukları ve olguların birçoğunun Amerika'nın Virginia, Florida ve Teksas gibi yörelerinde saptandığı bildirilmektedir. Bazı olgularda bulaşma kaplıca, yüzme havuzu, sulama kanalları ve doğal göllerde yüzme ile olurken, Kuzey Nijerya ve Güney Avustralya'dan bildirilen olgularda yüzme

öyküsü olmadan bulaşmanın, yüzün yıkanması esnasında ve havada bulunan amip kistlerinin solunmasıyla gerçekleşebileceği bildirilmektedir (Özcel ve ark., 2007).

Suda ve toprakta yaygın bir şekilde olan serbest yaşayan amipler dünya üzerinde geniş bir dağılım göstermektedir. Bu amiplerden *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Sappinia* ve *Balamuthia* gibi cinslerin bazı türleri hayvan ve insan vücuduna girerek başta beyin hasarı olmak üzere ciddi patolojilere sebep olabilmektedir (Martinez ve Janitschke, 1985).

Amipler, bataklık ve nemli topraklarda kanalizasyon sularında, göllerde, yüzme havuzlarında, baraj göllerinde ve tatlı su birikintilerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Hatta hava filtrelerinde dahi yaşamlarını sürdürebilmektedirler.

İnsanın toprak, su ve havayı kendi yararları için daha fazla kullanmaya başlamaları doğa ile temasının artması Serbest Yaşayan Amiplerin (SYA) insan vücuduna girme olasılığını arttırmaktadır. SYA'ların neden oldukları hastalıklarda gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır (Özcel, 2007).

SYA'lardan *Acanthamoeba* spp. türleri immun sistemi baskılanmış kişilerde akciğer ve deri enfeksiyonlarının yanı sıra çoğunlukla sessiz başlayan fakat kronik seyreden ölümcül Granülomatöz Amibik Ensefalite (GAE)'de neden olmaktadır (Schuster ve Visvesvara, 2004). Türkiye'de amip prevalansı %0.4 - %18.4 olup Güney ve Güneydoğu bölgelerinde endemiktir (Yakut ve Özden, 2008).

SYA'lardan *Acanthamoeba* türleri bazı türleri de göz kaybına kadar gidebilen Kronik Amibik Keratit (KAK) gibi hastalıklara neden olmaktadır. Bu keratit olgularından ilk defa izole edilen SYA'lar *Acanthamoeba* olduğu için *Acanthamoeba* keratiti (AK) olarak da bilinmektedirler (Özcel ve ark., 2007).

1.6.1 *Acanthamoeba*'nın Sınıflandırılması ve Hayat Döngüsü

1.6.1.1 Parazitin Tanımı ve Sınıflandırılması

İlk kez *Acanthamoeba* cinsi amipler 1930 yılında Castellani tarafından, *Cryptococcus* cinsi bir mantar türü kültürlerinde bulunmuş ve tanımlamıştır. Tanımlanmasının ardından cinsin sınıflandırılması, 1931 yılında Volkonsky tarafından yapılmış, fakat gerçek sınıflandırma son yıllarda yapılan araştırmaların sonucunda ortaya

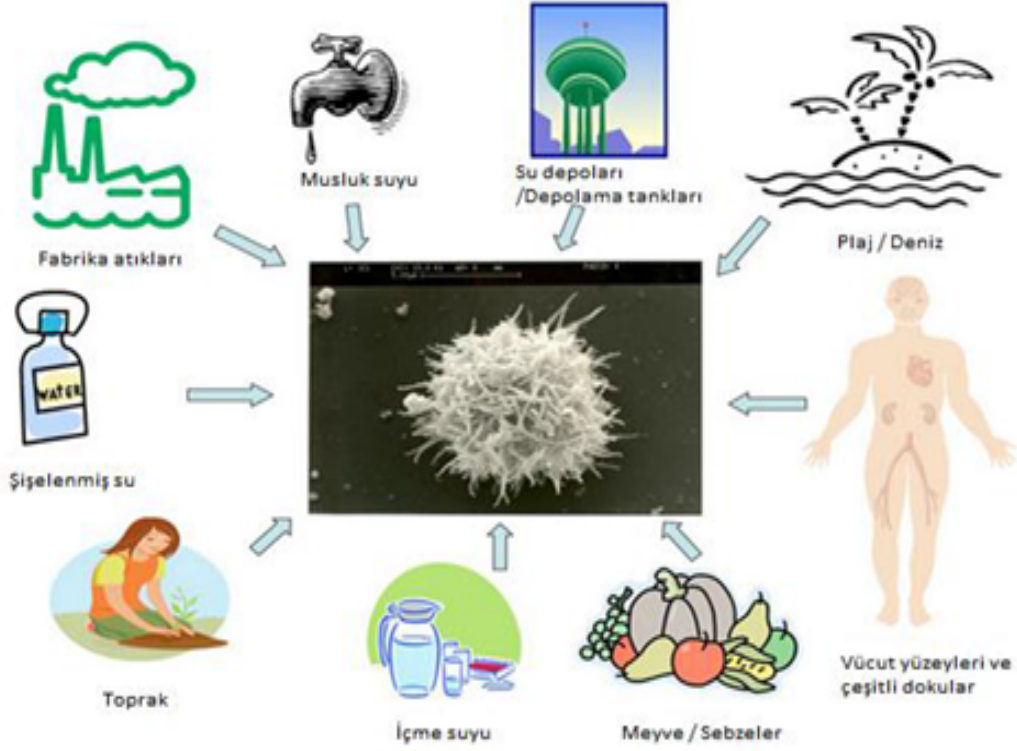
konulmuştur (Jhon, 1998; Aydın, 2008). Yapılan bu çalışmalar sonucunda *Acanthamoeba castellanii*'nin sistematığı Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1 *Acanthamoeba castellanii*'nin Sistematığı (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Aydın, 2008)

Domain	Eukaryota
Alem	Protista
Şube	Rhizopoda
Sınıf	Lobosea
Altsınıf	Gymnamoebia
Takım	Centramoebia
Aile	Acanthamoebidae
Cins	<i>Acanthamoeba</i>
Tür	<i>Acanthamoeba castellanii</i>

1.6.1.2 Parazitin Yaşam Alanları

Doğada yaygın olarak bulunmaktadırlar. Toprakta, tozlardan, havadan, kaplıca sularından, deniz suyundan, yüzme havuzlarından, lağım sularından, çamurdan, çeşme sularından, diş tedavi ünitelerinden, diyaliz ünitelerinden, bakteri, maya ve hücre kültürlerinden, bitkilerden, hayvanlardan, sağlıklı insanların burun ve boğazlarından, kontakt lenslerden, lens saklama kaplarından, lens temizleme solüsyonlarından, dışkıdan, infekte hastaların beyin ve akciğer dokusundan, deri lezyonlarından ve korneal dokulardan izole edilmişlerdir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).



Şekil 1.1 *Acanthamoeba* Türlerinin Yaşam Alanları (Kaynak, 2017)

Acanthamoeba türlerinin organelleri, karakteristik bir ökaryot hücredeki gibi olup golgi kompleksi, mitokondri, pürüzsüz ve kıvrımlı endoplazmik retikulum, dağınık ribozomlar, besin kofulları ve mikrotubulleri bulunmaktadır. Sitoplazmik içerik, üç katlı plazma membranıyla çevrilidir. Sitoplazmada, hücrenin su dengesini kontrol eden kontraktıl vakuoller bulunmaktadır. Çekirdek tek olup, büyük ve merkezi bir çekirdekçiğe sahiptir. Üreme, eşeysiz olarak, mitoz bölünme şeklindedir (Saygı, 2002; Aydın, 2008).

1.6.1.3 *Acanthamoeba*'nın Morfolojik Özellikleri

Morfolojik olarak tür düzeyinde ayırım yapmak oldukça zordur. *Acanthamoeba* türleri, morfolojik olarak kist büyüklüğü ve biçimine göre 3 sınıftan oluşur:

Grup I: İç duvarlardan (endokist) açıkça ayrılmış yuvarlak dış duvarlara (ektokist) sahip geniş kistler bu gruptadır.

Grup II kistleri: Değişken endokist şekilleri ile daha küçüktür. Ektokistleri buruşuk görünümdeyken endokist poligon, yıldız, üçgen veya oval biçiminde görülür.

Grup III kistleri: Grup II kistlerine göre daha az olup, duvarları iyi ayrılmamıştır. Temel insan patojenleri Grup II'ye ait olmakla birlikte, Grup III'ten *Acanthamoeba*

culbertsoni de tanınmış bir patojendir (Illingworth ve Cook, 1998; John, 1998; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Aydın, 2008).

Çizelge 1.2. *Acanthamoeba* spp.'nin Morfolojik Olarak Gruplandırılması (Illingworth ve Cook, 1998; Ergüden, 2015)

Grup I	Grup II	Grup III
<i>A. tubiashi</i>	<i>A.castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	<i>Acanthamoeba</i>
<i>Acanthamoeba commandoni</i>	<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	<i>lenticulata</i>
<i>Acanthamoeba echinulata</i>	<i>Acanthamoeba griffini</i>	<i>Acanthamoeba healyi</i>
<i>Acanthamoeba pearcei</i>	<i>Acanthamoeba rhysodes</i>	<i>Acanthamoeba jacobsi</i>
	<i>Acanthamoeba divionensis</i>	<i>Acanthamoeba palestinesis</i>
	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	

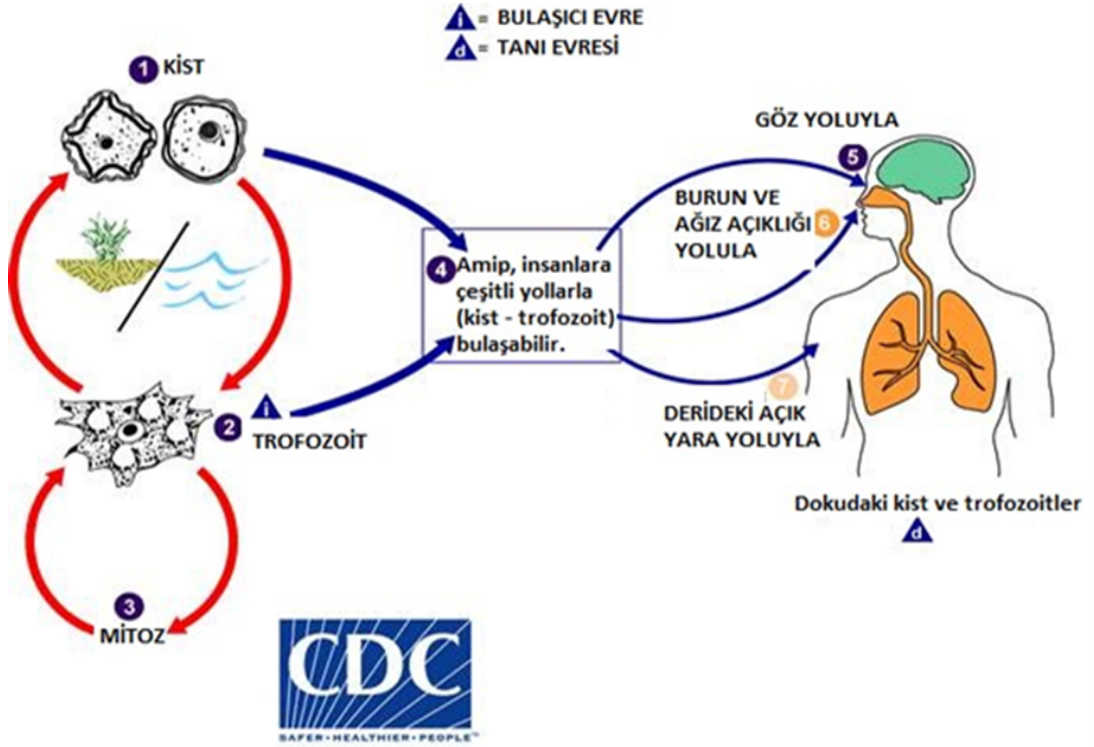
Kist ve trofozoitlerin boyutları türler arasında farklılık göstermektedir. Hem trofozoit hem de kist formu büyük, yoğun, merkezi bir çekirdekçiğe sahip tek bir çekirdek ile karakterizedir. Trofozoit form olumsuz çevre şartlarında hücre farklılaşmasıyla çift duvarlı kist formuna dönüşmektedir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Khan, 2006; Madencioğlu, 2014).

1.6.1.4 *Acanthamoeba*'nın Hayat Devri

Acanthamoeba cinsi amiplerin hayat devri iki kısımdan oluşur: ilk formunu büyüyen, beslenen, çoğalan ve aktif bir şekilde hareket eden trofozoit formu oluşturur. İkinci formu ise trofozoit formuna göre çevre şartlarına daha dirençli olan kist formudur (Polat ve ark., 2007a).

Kist Şekli: *Acanthamoeba* kistleri 12 ile 20 µm arasında farklılık gösterir. Tek çekirdekli ve çift çeperli olan kistler tipik bir görüntüye sahip olduklarından kültür ortamında kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Kist duvarının dış tarafı düz ve buruşuk olup, iç kısmı beşgen veya altıgen şeklindedir. Sahip olduğu bu farklı morfolojiden dolayı tür ayırımında kolaylık sağlamaktadır. Kistler sahip oldukları bu morfolojiden dolayı buldukları doku kesitlerinde de rahatça ayırt edilebilmektedir. Düşük sıcaklıklarda (0-2°C) dahi hayatta kalabilmektedirler. Çevre şartları uygun olduğunda, kistlerden trofozoitler çıkar (John, 1998; Polat ve ark., 2007b; Aydın, 2008). Kistler, hava yoluyla taşınarak çevrede *Acanthamoeba* türlerinin yayılmasına ve bu patojenlerin uygun konaklara taşınmasına yardımcı olurlar. Birçok çalışma, kistlerin uzun yıllar boyunca patojenitesini sürdürerek canlı kalabildiğini göstermiştir

(Madencioğlu, 2014). Şekil 1.2’de *Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü verilmiştir.



Şekil 1.2 *Acanthamoeba* spp.’nin Hayat Döngüsü (Ergüden, 2015; Anonim, 2016b)

Trofozoit Şekli: *Acanthamoeba* trofozoitleri boyutları 25 ile 56µm olarak farklılık göstermektedir. Çoğunlukla yavaş hareket ederler ve hareketlerini acanthapodium ya da lopopod adı verilen yalancı ayaklarla gerçekleştirir. Sahip oldukları bu yalancı ayaklardan dolayı *Naegleria* cinsinden de kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Özcel, 2007). Yuvarlak ve tek çekirdekli olmasının yanı sıra ektokist ve endokist adı verilen iki katmandan oluşur. Çoğunlukla dış kısmı kıvrıktır ve iç kısmı da çok yüzlü bir görünüme sahiptir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). Trofozoit sitoplazması endoplazma ve ektoplazma denilen iki bölümden oluşur. Ektoplazma yani trofozoitin dış kısmı saydam ve yumurta akı kıvamındadır. Canlının hareketinde ve savunmasında rol oynar. Endoplazma ise granüler bir yapıda olup beslenme ve kontraktıl vaküolleri ile çekirdek gibi organizmanın hayati organlarının yer aldığı kısımdır. Çekirdek, bir ya da birden fazla sayıda olup, çoğalmayı promitoz veya mitozla ikiye bölünmeyle gerçekleşir (Saygı ve Polat, 2003).

Su parazitleri içinde yer alan *Acanthamoeba* türleri yaşam alanları esas alındığında dünya üzerinde oldukça geniş bir habitata sahiptirler. Akarsular, nehirler, göler,

kaplıca suları, havuz suları, toz, toprak, deniz, çamur ve çamurlu sular, kanalizasyonlar, klima filtreleri, pet şişeler, şebeke suları, kontak lens saklama kapları, solüsyonları ve lensler *Acanthamoeba*'nın yaşamını sağlayabileceği alanlara örnek verilebilir (Larkin ve East, 1990; Gray ve ark., 1995; Madencioğlu, 2014).

Acanthamoeba türü yaşam alanlarının dışında birçok canlı bünyesinde de barınabilmektedir. Çeşitli bitki türleri, balıklar, kurbağalar, sürüngenler ve memeli grubunda yer alan bazı hayvan türlerinde gözlemlenmiş ve izole edilmiştir. Sağlıklı bireylerin burun ve boğaz mukozasında ve enfekte kişilerin beyin, akciğer ve deri lezyonlarından izolasyon gerçekleştirilmiştir. (De Jonckheere ve Michel, 1988; Dykova ve ark., 1999; Kong ve ark., 2000; Madencioğlu, 2014).

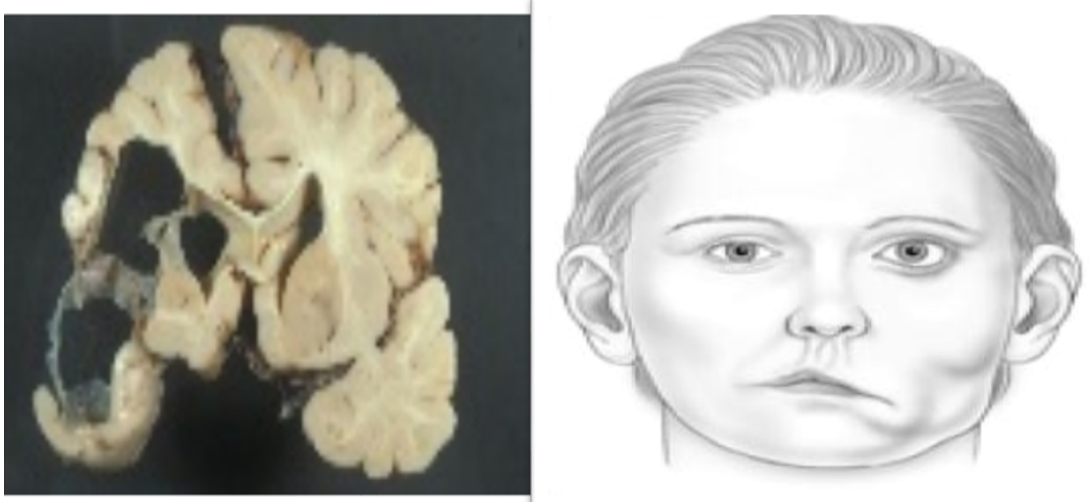
1.6.2 *Acanthamoeba* Türlerinin Sebep Olduğu Hastalıklar

Acanthamoeba, GAE, Kutanöz *Acanthamoebiasis* ve gözde meydana gelen *AK* gibi ölümcül veya körlüğe sebep olan önemli hastalıkların etmenidir. Şimdiye kadar belirlenmiş 18 alt türü bulunmaktadır. Aynı zamanda bir çok viral bakteri kökenli hastalığında bulaşmasında etkili olduğundan klinik açıdan da oldukça önemli bir konumdadır (Barker ve Brown, 1994; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Horn ve Wagner, 2004; Ertabaklar ve ark., 2007). *Acanthamoeba* türlerinin sebep olduğu hastalıklar Çizelge 1.3' de verilmiştir.

Çizelge 1.3 *Acanthamoeba* spp.'leri ve Sebep Olduğu Hastalıklar (Siddiqui ve Khan, 2012; Kaynak, 2017)

<i>Acanthamoeba</i> Genotipleri	Neden Olduğu Hastalık
T 1	GAE
T 2a	AK GAE
T 2b	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 3	AK
T 4	AK GAE
T 5	AK GAE
T 6	AK
T 7	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 8	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 9	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 10	AK GAE
T 11	AK
T 12	GAE
T 13	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 14	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 15	AK
T 16	Henüz ilişkisi bulunmamıştır

Acanthamoeba türlerinden birkaçının (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* ve *A. divionensis*) GAE'ye sebep olduğu bilinmektedir. Özellikle HIV/AIDS'li hastalarda veya kronik hastalığı olan kişilerde, diyabet hastalarında, organ transplantasyonu yapılanlarda saptanmıştır. Kan- beyin bariyerlerinin invazyonu (istilâsı), bağ doku ve nöral zarar beyin fonsiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Amip alt solunum yollarından girerek, endovasküler alanı istila edip buradan kan dolaşımı ile yayılmaktadır. *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA genine odaklanarak belirlenen T1-T12 genotiplerinden AK'ye yol açan suşların çoğunun T4 genotipinde olduğu bildirilmiştir (Khan, 2006). GAE sonucu beyinde oluşan hasar Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3 GAE Sonucu Beyinde Oluşan Hasar ve Yüz Felci (Anonim, 2017a)

GAE nadir görülüyor olmasına rağmen çoğunlukla ölümcül seyretmektedir. Jager ve Stamm 1972 yılında hastalığı tanımlamışlardır. Kronik ve yavaş ilerleyen GAE'ye *Acanthamoeba* türlerinin sebep olduğu bilinmektedir. Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ve akciğer enfeksiyonu ile karakterize bir hastalıktır. Genellikle immunsistemi zayıflamış bireylerde görüldüğü ileri sürülse de sağlıklı ve güçlü bireylerde de hastalık gözlemlenmektedir. Hastalık etkeni havadan burun yoluyla vücuda alınmaktadır. Kan damarları sayesinde yayılarak beyine ve oradanda MSS'ne ulaşır. Koku alma sinirleri aracılığıyla olfaktör loba (koku alma lobuna) yerleşir ve aradan da beynin diğer kısımlarına geçer (Saygı, 2002; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Altıntaş, 2005; Khan, 2006; Siddiqui ve Khan, 2012; Madencioğlu, 2014).

AK, sistemik bir hastalık oluşturmayan lokal bir göz enfeksiyonudur. İlk olarak 1974 yılında İngiltere de Nagington hastalığı bildirmiştir. Lens kullanımlarında görülen artış ve sağlıksız kullanımı ve su kaynaklı salgınların fazla olmasından dolayı 1980'lerden sonra görülme sıklığında artış olmuştur (Ertabaklar, 2009; Madencioğlu, 2014). GAE gibi bağışıklık sistemi zayıf bireylerde görüldüğü düşünülse de sağlıklı bireylerde de görülme oranı yüksektir. Ayrıca hastalık sonrası bağışıklık kazanma gibi bir durumda söz konusu değildir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Madencioğlu, 2014). AK olan bir hasta hastanın gözleri Şekil 1.4' te gösterilmiştir.



Şekil 1.4 *Acanthamoeba* Keratitli Hastanın Gözleri (Anonim, 2017b)

Dağılmış *Acanthamoeba* enfeksiyonunun aksine, korneal hastalık immünosüpresyon ile ilişkili değildir. AK'nin belirtileri, yabancı cisim hissi, fotofobi, azalmış görme keskinliği, yırtılma, göz ağrısı ve kızarıklığı içerir. Teşhis, yüksek şüphe endeksi

gerektirir ve erken teşhis, tedavi etkinliğini önemli ölçüde artırabilir. Etkilenen kişiler sürekli görme bozukluğu ve körlük açısından risk altındadır (Khan, 2006).

1.6.2.1 Bulaşma Yolları

1. Hastalıklı bireylerle aynı ortamlarda bulunan sağlıklı bireyler arasındaki iletişim, cinsel ilişkide bulunan insanlar, okul öncesi eğitim alan çocuklar, sağlık personelleri, tarım ve hayvancılık sektörüyle ilgilenenler (Özcel, 2007; Özcel ve ark., 2007).
2. Günlük hayatta temas halinde bulunduğumuz tüm su kaynaklarının kistler ile kirlenmiş olması
3. Sağlığa ve hijyene önem verilmeden hazırlanan ve çiğ tüketilen besinler (bazı et ve süt ürünleri)
4. Bağışıklık sistemi zayıf olan kişiler
5. Hastalık etkeni bulaşmış olan canlılar (kuş ve eklem bacaklılar vb.) taşıyıcı konak olabilmektedir (Özcel, 2007).

SYA'lar günlük hayatta bire bir temas halinde olduğumuz birçok ortamda (toprak, hava, havuz, içme suyu ve kontak lensler vb.) bulunmakta ve bu noktalardan izolasyonu gerçekleştirilmektedir. Temiz ve mikrobiyal yönden hijyenik olmadığı bilinen surların kullanılması AK gibi hastalıklar açısından kesinlikle tehlike oluşturmaktadır. Bu tarz sularda muhafaza edilen lenslerde mantarların üremesi amibin mantarlarla beslenerek buraya yerleşmesine sebep olur (Markel ve ark., 1992; Khan ve ark., 2002; Seal, 2003).

Genellikle korneal yaralanma sonucu ortaya çıkan bir hastalık olarak görülse de AK'li hastaların %85'inin sebebi kontakt lens kullanımındır (Radford ve ark., 1998). Yumuşak kontakt lenslerin kullanılması AK oluşması için uygun zemini hazırlamaktadır. Araştırma sonuçlarına göre AK vakalarının %64 ile %93 arasında yumuşak kontakt lens kullanımından kaynaklandığı belirlenmiştir (Page, 2013; Jonathan ve ark., 2014).

Genel olarak kontamine olmuş lens kutuları ve yumuşak kontakt lenslerle temas etmeden ellerin düzgün ve temiz bir şekilde yıkanmaması, lens kullanımından önce musluk suyu kullanılarak lenslerin temizlenmesi ya da evde yapılan tuzlu suyla temizlemek AK'nin bulaşması için uygun ortam oluşturmaktadır. Bunların yanı sıra

Acanthamoeba spp. ile kontamine olmuş suların herhangi bir sebepten ötürü (yüzü yıkama, yüzme) direkt kornea dokusu ile teması halinde de AK oluşumu gerçekleşmektedir (Saygı, 2003; Beattie ve Tomlinson, 2009; Kobayashi ve ark., 2015; Cheung ve ark., 2016). Tüm bu bulaşma yollarının yanı sıra AK'nin insandan insana bulaşmış olmasıyla ilgili bir rapor henüz kaydedilmemiştir (Ergüden, 2015).

1.6.2.2 Alınması Gereken Tedbirler

Kontak lenslerin veya renkli lensler bireye özgü olmalı ve başkalarıyla ortak kullanılmamalıdır. Lenslerin saklanması için kullanılan solüsyonlar hidrojen peroksit içermelidir. Lenslerin kullanım süreleri dolduğunda atılmalıdır ve lenslerle uyumamalıdır. Havuz, deniz ya da banyo esnasında lensler çıkarılmalıdır. Gün içerisinde ellerin sürekli kullanımından dolayı sağlığa uygun olması için temizliğine dikkat edilmeli ve sık sık yıkanmalıdır (Ergüden, 2015).

1.6.2.3 Epidemiyoloji

Acanthamoeba spp.'nin sebep olduğu hastalıkların gelişim süresi, vektörün kornea ya da bireye temas etmesi, organizmasının sayısı, etki etme gücü gibi faktörler ile ilişkisi olduğu mevcut araştırmalar sonucunda kanıtlanmıştır (Gökpınar, 2010; Carnt, 2016). Epidemiyolojik olarak bakıldığında AK'nin su kökenli bir geçmişi veya lens kullanımından kaynaklandığı bilinmektedir (Omana-Molina ve ark., 2014). Literatüre bakıldığı zaman AK olgularının çoğunun kontakt lenslere ait olduğu görülmektedir. (Pacella ve ark., 2013).

Dünya da Amerika, Avrupa, Afrika, Avustralya gibi birçok ülkelerden AK vakaları kayıtlara geçmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda sağlıklı bireylerin yutaklarından alınan örneklerde dahi pozitif kültür sonuçları elde edilmiştir (Ergüden, 2015).

1970'lerde AK hakkında ilk vaka gerçekleşmiştir. Olayda 3 hastadan 2'si korneal travmadan kaynaklanmaktadır. Nagington ve arkadaşları 1974'te ilk kez keratit olgusunu bildirmişlerdir (Alotaibi, 2011; Pacella ve ark., 2013). Amerikan'nın Dallas şehrinde 1973'te Oküler Mikrobiyoloji ve İmmunoloji topluluğunun yapmış olduğu toplantıda bir çiftçiyi enfekte ettiği belirlenmiştir (Yang ve ark., 2001). Belirlenen bu vakaların geçmişine bakıldığında kontakt lens kullanımının olmadığı görülmüştür. AK vaka sayısının 2004'te dünya geneline bakıldığında üç bine yaklaştığı görülmüştür (Schuster ve Visvesvara, 2004).

Kontak lens kullanımının 1980 de artmasıyla AK'li hasta sayısında da artış olmuştur. 1973 ile 1988 yıllarında Hastalık Kontrol Merkezleri'nin (CDC) sunmuş olduğu veriler sonucunda tehdit unsuru olarak kontak lens kullanıcı yaşı, lensin 12 saatten fazla gözde kalması, lens ile birlikte yüzme gibi faktörlerin üzerinde durmuşlardır (Carnt, 2016).

AK vakası Türkiye'de ilk defa 1996'da Elazığ da ortaya çıkmıştır. İkinci vaka 1999'da İzmir de olmuştur (Akyol ve ark., 1996). Dünya genelinde yapılan çalışmalar sonucu ortaya konulan raporlara göre lens kullanıcılarının bir milyon da 17 – 70 dolaylarında görüldüğü bildirilmiştir (Omana-Molina ve ark., 2014). Aynı vakanın İngiltere de görülme oranı 85 milyonda bir olarak kaydedilmiştir. Bu iki karşılaştırma arasındaki farkın sebebi sudaki kireç oranı olarak gösterilmiştir. Kireç kalıntısının fazla olduğu tesisat bölgelerinde *Acanthamoeba* spp.'nin bol miktarda olduğu belirtilmiştir. İngiltere ve Amerika'da merkezleri bulunan göz hastanelerinde yapılan kayıtlar sonucunda AK'li hastaların sayısında artma gözlemlenmiştir (Chawla ve ark., 2014).

1.6.2.4 Tanı

Gözde meydana gelen AK hastalığı *Herpes simplex*, *Pseudomonas aeruginosa* ve fungal keratit gibi hastalıklarla benzediğinden dolayı klinik olarak tanısını yapmak güçtür. Bu benzerlikten dolayı tanı kısmında yanlışlıklar meydana gelebilmektedir. Hastalığın tanısının yanlış yapılması tedavi için uygulanması gereken yönteminde yanlış olmasına, doğru ve geçerli olan tedavinin de gecikmesine sebep olmaktadır (Jhon, 2005). Ayrıca erken tanının yapılmış olması hastalığın tedavi edilebilmesini de arttırmaktadır. Tanının yapılabilmesi için hastalıklı bölgeden (kornea) sürüntü örneği almak yeterli olmamaktadır. Bunun yerine *Acanthamoeba*'nin trofozit veya kistlerini belirleyebilmek için biyopsi ya da korneal kazıntı yapmak daha doğru bir yöntemdir (Mazur, 1995; Jhon, 2005; Society, 2014).

Tanının doğru yapılabilmesi için farklı yöntemler bulunmaktadır:

- 1) Kültüre Almak: Hastalık etkeninin tanımlanabilmesi yönünden oldukça önemlidir. Etken vektörü (*Acanthamoeba*) olan amipin üremesi için birden fazla besiyeri vardır. Tanısı esnasında en sık tercih edilen besiyeri *Escherichia coli* ilave edilmiş besin değeri olmayan agardır. Hazırlanan bu besiyeri için uygun olan materyal de korneal kazıntıdır (Abduz ve ark., 2012). Yapılan bu işlemlere

rağmen tanıda karışıklık olabilir. Bunun sebebi de hastadan kornea kazıntısı alınırken veya alındıktan sonra materyalin üzerine mantar veya bakteri bulaşmış olma ihtimalidir. Tanı için kültüre alma işlemi yapıldıktan sonra da sonuç negatifse yani üreme gözlenmemişse korneal biyopsiden kültür hazırlanmalıdır. Aynı zamanda da lens kaplarının ve lens temizleme sularından da örnekler alınarak kültüre alınmalıdır. Tüm bu yapılan tanı işlemlerinin sonucunun pozitif çıkmasına rağmen tanı için net bir şey söylenemez ancak *Acanthamoeba* olduğu düşünülebilir (Jhon, 2005).

2) Sitolojik Test: bu tanı yöntemi de kendi içinde dörde ayrılmaktadır.

- Antikor testi: Antikor testinin diğer bir adı da İndirekt Immunofloresan'dır. Bu yöntem sayesinde hastalıklı bireyden alınan örneklerde amipin varlığı tespit edilebilir. Varlığı tespit edilen antikorlar indirekt Immunofloresan yöntemi ile belirlenebilir (Huang ve ark., 2010; Ergüden, 2015).
- Akridin Turuncusu: Akridin Oranj diye bilinen bu boyama tekniğiyle beyin omurilik sıvısından ve kornea kazıntısından alınan örnekler bu boya ile boyanır ve AK ile GAE'nin tanısı zahmetsiz ve seri olarak yapılmış olur. Boyama işleminde *Acanthamoeba* kistleri turuncu ve sarımsı bir renge boyanmaktadır (Magnet, 2014).
- Calcoflour Beyazı: Normalde mantarları sınıflandırma da tanımlamada kullanılan bir boyama tekniğidir ama kemofloresan özelliği olduğu için polisakkaritlere affinitesi vardır. Bundan dolayı trofozoit ve kistlerin tanısında da yararlanılmaktadır. Kolay ve seri sonuç veren bu yöntemden bahsetmek gerekirse alınan örnek lama yayılır, 3-4 dakika metil alkol ile tespit edilir. Ardından üzerine %1'lik Calcoflour beyazı ve yine %1'lik Evans Blue bir iki damla damlatılarak beş dakika bekletilir. Bekleme işleminden sonra boyanın fazlası uzaklaştırılarak lamelle kapatılıp mikroskopta incelenir. Boyama sonucunda *Acanthamoeba* kist duvarları parlak elma yeşiline boyanır ve trofozoitler ise kahverengi kırmızı arası bir görünümde boyanırlar (Jhon, 2005; El-Sayed ve ark., 2012).

- Pamuk Mavisi: Laktofenol olarak da bilinen bu teknikte oldukça hızlı sonuç vermektedir. Kazıntı örneği lama yayılarak üzerine bir damla pamuk mavisi damlatılır ve lamel konularak ışık mikroskobu ile gözlemlenir. Amipin kist duvarı açığa çıkar ve diğer alanlara göre daha koyu maviye boyanır (Chu ve ark., 1998).
- 3) Konfokal Tanı: bu yöntem son zamanlarda gelişmekte olan bir tekniktir. Konfokal kornea mikroskopi, korneanın dıştan içe doğru taranmasına imkân vermektedir. Binoküler mikroskopla görülemeyen yapıların Konfokal mikroskoptaki büyütme katsayısının fazla olmasından dolayı görülebilme imkânı sağlar (Mattana ve ark., 2004). Böylelikle amiplerin in vivo olarak tanımlanması sağlanmış olur. Sitolojik testlerde kornea örneğine ihtiyaç olması, kültür sonucunun zaman alması ve büyük bölümünün pahallıya mal olmasından dolayı konfokal mikroskopi yöntemini avantajlı kılmıştır. Klinik olarak henüz kullanılmamasına rağmen avantajlı olmasının sebebi amipin henüz yerleşmemiş yani hastalığın nüfuz etmeden de tanısını sağlamış olabilmesidir (Gardiner, 2000; Jhon, 2005; De Almeida ve ark., 2007).
 - 4) PZR Yöntemi ile Tanı: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) spesifik bir yöntem olmasından kaynaklı son zamanlarda oldukça umut vaat eden bir tekniktir. Kornea kazıntısına kesin ihtiyacın olduğu bu teknikte alınan materyalden DNA izolasyonu yapılır. Elde edilen DNA da *Acanthamoeba* primerleri kullanılarak PZR yöntemiyle hedef gen bölgesi tespit edilerek amibin varlığı kesinleşmiş olur. Teknik uygulanırken kesinlikle özen gösterilmesi zorunlu olan kısım *Acanthamoeba* spp. için kullanılacak olan primerin spesifik olması gerektiğidir. Ayrıca enfekteli bireyde henüz sadece 4-5 adet gibi az sayılarda amip bulunuyorsa PZR dışındaki yöntemlerle tanı yapılması oldukça zordur. Buna benzer durumlarda gözyaşından alınan örneğe PZR uygulanması tavsiye edilir. Sadece tanının yapılabilmesinin yanı sıra tedavinin sonuç verip vermediğini de kontrol edilmesi için de kullanılabilir (Mazur, 1995; Jhon, 2005; De Almeida ve ark., 2007).
 - 5) FISH Yöntemi: Floresan In Situ Hibridizasyon yöntemi olarak bilinmektedir. Bu yöntem ile *Acanthamoeba*'ya özgü işaretlenmiş radyoaktif özellikte proplar gönderilerek AK'nin varlığı belirlenir. Spesifik olan bu diziler T4 probudur ve 22 bazdan meydana gelmektedir. Ayrıca 18S rDNA dizisinin

komplementeridir. FISH tekniğiyle *Hartmannella* ve *Balamuthia* gibi hastalık etkenlerinin tanı işlemi yapılamaz (Matsuzaki ve ark., 2014).

- 6) RFLP Yöntemi: Açılımı Restriction Fragment Length Polymorphism'dir. Tanının konulması için kullanılsa da genellikle *Acanthamoeba*'nın hangi türünün hastalığa sebep olduğunu saptamak için kullanılmaktadır. Alınan örneğe *Acanthamoeba*'ya ait primerler kullanılarak PZR yöntemi kullanılarak varyasyon bölgeleri çoğaltılır. Daha sonra restriksiyon enzimi ile kesilerek restriksiyon endonükleaz'ın tanıdığı bölgelerin niteliği baz alınarak türünün hangisi olduğu belirlenir. Mitokondrial 16S rRNA ve 18S rRNA *Acanthamoeba* cinsinin varyasyon belgeleridir (Jhon, 2005).

1.6.2.5 Patojenliğin Belirlenmesi

Patojenitenin saptanması için laboratuvar ortamında üretilen beyaz fındık fareleri kullanılmaktadır. Hastalıklı bireyden numune alınıp uygun koşullarda ezilerek farenin kafatasına enjekte edilmektedir. Kültürde üremesi sağlanan amibin de bu yöntemle patojenitesi saptanabilmektedir. Bu işlem için düşük dozda anestezi uygulanır ve fare ensesinden tutturularak burun delikleri görünebilecek duruma getirilir. Amipli örnek burun deliklerinden içeriye doğru bir iki damla damlatılır. Eğer amip patojense farenin görünümü ile tüy renginde farklılaşma gözlenir. Farenin hareketleri değişmekte ve bunun yanı sıra amipten kaynaklı ölüm gerçekleşmektedir (Ergüden, 2015).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 *Acanthamoeba* İle İlgili Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

İlk defa *Acanthamoeba* keratiti 1996’da ikincisi ise 1999 yılında ışık ve elektron mikroskopuyla genotiplendirme yapılmadan tespit edilmiştir (Akyol ve ark., 1996; Akisu ve ark., 1999).

Kılıç ve ark., (2004), Ankara da yaptıkları çalışmada topraktan alınan 28 ve sudan alınan 2 örnekte *Acanthamoeba* varlığını saptamaya çalışmıştır. Alınan toprak örneklerinin 16’sında *Acanthamoeba*’nın ürediği görülmüştür. Pozitif sonuç veren bu 16 örneğin 8’inin T2, 5’inin T3, 2’sinin T4 ve 1’inin de T7 genotipine sahip olduğu belirlenmiştir.

Kontakt lens kullanmayan ve kornea travma öyküsü bulunmayan 22 yaşındaki bir erkek sağ gözde şiddetli yanma ve ağrı ile İzmir de hastaneye başvurmuştur. Korneal kazıma yapılan örnekten kültüre alma işlemiyle *Acanthamoeba*’nın varlığı araştırılmıştır. Kültür sonucuna göre *Acanthamoeba* suşunun Grup II ve genotip T4 olduğu belirlenmiştir. Bunun üzerine aynı coğrafi bölgede lens saklama kutusundan, topraktan ve musluk suyundan izole edilen *Acanthamoeba* suşu olduğu tahmin edilen muhtemel örnekler moleküler ve morfolojik olarak tanımlanmaya çalışılmıştır. Toprak ve lens saklama kutusunun izolatları Grup I ve T9, musluk suyunun ise T4 olduğu görülmüştür. Böylece Türkiye de *Acanthamoeba* keratite sebep olan suşlardan ilk kez genotip T9 izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Ertabaklar ve ark., 2007).

Avusturalya ve Viyana’dan getirtilen *A. hatchetti* ile *A. castellanii* türleri kullanılarak yapılan çalışmada, her iki tür içinde besin Non Nutrient Agar (NNA) ve Proteaz Pepton - Maya Özü-Glukoz (PPYG) besiyerleri kullanılarak pasajlama işlemi yapılmıştır. Üremesi sağlanan türlerin trofozoit ve kist formları göz önüne alınarak türlerin morfolojik özellikleri çeşitli boyalar kullanılarak konjugasyona eş görünümünün izlenmesi sağlanmıştır. Yapılan gözlem sonucunda türlerde trofozoit formlarının çok çekirdekli olduğu ve yine aynı besiyerinde trofozoitlerin arasında ince bir kanal olduğu görülmüştür. Yapılan bu gözlem sonucuna göre trofozoitler arasında gerçekleşen konjugasyona benzeyen bu olay ile genetik materyal transferi sağlandığı düşünülmüştür (Akın Polat ve ark., 2007).

Özkoç ve ark., (2008) tarafından İzmir de yapılan çalışmada kontak lensli olmayan ancak az da olsa *Acanthamoeba* keratit belirtileri gösteren 38 yaşındaki kadın hastadan *Acanthamoeba* tespiti için örnek alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda hastada T4 genotipindeki *Acanthamoeba castellanii* suşunun olduğu bildirilmiştir.

Aydın ilinde Tıp Fakültesi Hastanesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'na 3 haftadır devam eden gözünde yanmayla beraber kızarıklık, görmesinde bulanıklık olan ve kontakt lens kullanan 23 yaşındaki üniversite öğrencisine *Acanthamoeba* keratit teşhisi konulmuştur. Kültüre alma ve PZR yöntemiyle etken saptanmış ve yapılan genotiplendirme sonucunda etkenin *Acanthamoeba castellanii* (T4) olduğu bildirilmiştir (Ertabaklar ve ark., 2009).

Doğan ve ark., (2013), Kayseri'de farklı alanlardan alınan toprak örneklerinde patojenik SYA türlerini izole ederek genotiplendirmişlerdir. Belirlenen 20 lokalitenin her birinden birer örnek toplamışlardır. Toplanan örnekler süzöldükten sonra *E. coli* ilave edilmiş non-nutrient agar petrilere ekimi yapılmıştır. 37°C de kültüre edilen örnekler 2 hafta süresinde izlenmiştir. Üremenin olduğu plaklardan PZR yöntemiyle etken aranmıştır. Yapılan DNA sekans analiz sonuçlarına göre 20 örnekten 8'i *Acanthamoeba* spp. ve 3'ünün ise *Naegleria* olduğunu belirtmişlerdir.

Kayseri'de kuyu sularından özellikle bölgede yaşayanların ağırlıklı olarak içme veya sulama amacıyla kullandıkları çeşitli yerlerden alınan 20 örnekte *Acanthamoeba*'nın varlığı araştırılmıştır. Araştırma sonucunda yapılan PZR'de 20 örneğin 8'inin *Acanthamoeba* olduğu belirlenmiştir (Kuk ve ark., 2013).

Kuk ve ark. (2013), Kayseri'de içme ve sulama amaçlı sularda *Acanthamoeba* varlığını araştırmayı amaçlamışlardır. Erimiş kar suyu, yağmur suyu ve kuyu suyu olmak üzere toplamda 26 örnek ve kontrol olarak da 3 musluk suyu örneği alınmıştır. Toplanan su örneklerinin 5'i hem agar kültürü hem de PZR ile *Acanthamoeba* için %19.2 oranında pozitif olarak bulunmuştur. *Acanthamoeba*'nın T4 genotipinde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın araştırma alanında *Acanthamoeba*'nın izolasyonu ve tanımlanmasında Türkiye'nin ilk raporunu oluşturduğu vurgulanmıştır.

Sivas ilinde bulunan Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniğine gelen hastalardan göz kapakları ve konjunktivadan (retinayı örten zar) alınan örneklerde *Acanthamoeba* ve diğer SYA türlerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Farklı sebeplerle polikliniğe

başvuran 500 hastadan steril eküvyonlar kullanılarak numuneler toplanmıştır. *E. coli* ilave edilmiş Agar plaklarına hastadan alınan örnekler konulmuştur. Üreme gözlemlenen petrilere morfolojik gruplandırma kriterleri baz alınarak bir tanımlama yapılmıştır. Çalışma sonucuna göre 500 hastadan sadece 1'inde *Acanthamoeba* spp. (%0.2), 1'inde ise Hartmannella spp. (%0.2) ürettiği gözlenmiştir (Yünlü ve ark., 2015).

Karakavuk ve arkadaşları İzmir ve Manisa illerinde bulunan vefat etmiş yabancı kuşlarda *Acanthamoeba*'nın varlığını araştırmışlardır. Yabancı kuşlarında *Acanthamoeba*'nın sebep olduğu keratit enfeksiyonu üzerine yapılan araştırmalar dünyada çok azdır ve Türkiye de bu alanda yapılan ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Yabancı kuşları PZR ve non-nutrition agar (NNA) yöntemi ile taramayı amaçlamışlardır. Kornea örneklerini 18 ölü yabancı kuştan elde etmişlerdir. Dış tetkik sırasında, iki Avrasya serpintisinde (*Accipiter nisus*) keratit belirtileri gözlenmiştir. Tüm kornea örnekleri PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. Sekanslama verilerine göre, iki izolatın T5 genotipine ve 1'inin ise T4 genotip ait olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile *Acanthamoeba*'nın Türkiye'nin yabancı kuşlarında keratite neden olabileceğini ve bu yırtıcı kuşların görme yeteneği kaybı nedeniyle diğer vahşi hayvanların hedefi olabileceğini göstermişlerdir (Karakavuk ve ark., 2017).

Sivas'ta bulunan Üniversite Araştırma Hastanesinde (CURAH) *Acanthamoeba* gibi SYA'ların varlığı araştırılmıştır. Yirmi dört toz numunesi klimaların ızgara ve filtre kısımlarından steril pamuk swapları yardımıyla toplanmıştır. Toplanan numuneler laboratuvarında *E. coli* ilave edilmiş besin değeri olmayan agar (NNA) petrilere ekilmiştir. Üreme saptanan plaklardaki amipler morfotiplendirme yöntemiyle cins düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Çalışma sonucunda 24 klima numunesinin 14'ünde (%58.3) SYA olduğu belirlenmiştir. 14 numunenin 10'nun *Vermamoeba* spp. (%42) ve 4'ünün de *Acanthamoeba* spp. (%17) olduğu belirtilmiştir (Özcelik ve ark., 2017).

2.2 *Acanthamoeba* İle İlgili Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar

Bulgaristan'da Tsvetkova ve ark. (2004) toprak, kum, kaynak suları ve bataklıklar gibi çeşitli çevresel örnekleri incelemişlerdir. Toplamda 35 toprak örneğinin 11'inde ve 22 kum örneğinin tamamında SYA'ların varlığı tespit edilmiştir.

Malezya'da 2005 yılında Anisah ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, kontakt lens öyküsü olmayan, 286 okul öğrencisinden sürüntü örneği toplamışlardır. Kornea kazıntısı alınan sürüntü örnekleri, *E. coli* ile zenginleştirilen besin değeri olmayan plaklara ekilmiştir. Örnekler 14 gün etüv de bekletildikten sonra mikroskop altında incelenmiştir. Ancak *Acanthamoeba* spp. varlığı açısından pozitif bir sonuç bulunamamıştır (Anisah ve ark., 2005).

Sudan'da su örneklerinde yapılan bir çalışmada *Acanthamoeba* türlerinin *V. cholerae* O1 ve O139'un büyümesini ve hayatta kalmasını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Sudan'daki farklı kolera endemik alanlarından alınan su örneklerinde hem *V. cholerae* hem de *Acanthamoeba* türlerini PZR ile tespit etmişlerdir (Shanan ve ark., 2011).

Güney Tayvan'da yapılan bir çalışmada iki havzadan 211 su örneği toplanmıştır. Tayvan'daki Puzih Nehri ve Kaoping Nehrindeki *Acanthamoeba*'nın varlığı araştırılmıştır. 34 (%16.1) örnekte *Acanthamoeba* türü tespit edilmiştir. Su numuneleri içerisindeki *Acanthamoeba* varlığı, su sıcaklığı ve toplam koliform seviyeleri ile anlamlı fark göstermiştir. En fazla tespit edilen *Acanthamoeba* genotipleri sırasıyla T4 (n = 19), T5 (n = 8) ve T15 (n = 3)'dir (Kao ve ark., 2012).

Mahmoudi ve ark., (2012), İran'da Gilan'dan gelen su kaynaklarındaki serbest yaşayan *Acanthamoeba* prevalansını belirlemek için su numunelerini analiz etmişlerdir. Doğal (nehirler, göller ve lagün) ve tatlı su kaynakları da dahil olmak üzere çevresel kaynaklardan toplam 27 yüzeysel suyu örneğini filtre etmişlerdir. *E. coli* eklenmiş agar plaklarına filtre edilmiş su örnekleri konularak 2-7 gün boyunca 30°C'de veya 42°C'de inkübe etmişlerdir. *Acanthamoeba* türlerini morfolojik olarak faz kontrast mikroskopunda incelemişlerdir. Su örneklerinden DNA ziole edilerek PZR yöntemiyle testlenmiştir. Yirmi yedi örnekten 19'u (%70.3) *Acanthamoeba* türleri için morfolojik kriterlere göre, 14'ü (%73.7) ise PZR yöntemi ile pozitif bulunmuştur.

Göz Hastalıkları Anabilim dalına gelen 372 hastadan alınan örneklerde yapılan mikroskopik incelemelerde *Acanthamoeba* keratitin varlığı konfokal mikroskopi ile tespit edilmiştir. Hastaların 238'inde (%64) yumuşak kontakt lens kullanım öyküsü olduğu belirtilmiştir (Page ve Mathers, 2013).

Kanarya Adalarında *Acanthamoeba* suşlarının varlığını değerlendirmek amacıyla yapılan diğer bir çalışmada ise 2012 ve 2013 yılları arasında 24 toprak örneği

toplanmıştır. Numuneler, besleyici niteliği olmayan agar (NNA) plakalarına aşılıdıktan sonra *Acanthamoeba*'nın varlığı için izlenmiştir. *Acanthamoeba* suşlarının belirlenmesi, kist ve trofozoit formlarının morfolojisine dayanmaktadır. Daha sonra araştırmacılar *Acanthamoeba*'nın 18S rDNA genini çoğaltarak 24 örneğin %64.5 oranında pozitif sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir (Reyes Batlle ve ark., 2014).

Geisen ve ark. (2014) yapmış olduğu bu çalışmada, Hollanda, Sardunya ve Tibet'te bulunan yüksek rakımlı dağlardan üç ayrı istasyon belirleyerek örnek almışlardır. 32'si Hollanda'dan, 18'i Tibet'ten ve 15'i de Sardunya'dan olmak üzere toplamda 65 örnek elde edilmiştir. Toplanan bu örnekler kültüre alınmış ve üreme gözlenen (yaklaşık %80'i) plaklardaki örneklere PZR metodu uygulanmıştır. Sekans analiz sonuçlarına göre Hollanda'dan 4 örneğin, Sardunya'dan 3 örneğin ve Tibet'ten de 2 örneğin *Acanthamoeba* türüne ait olduğu belirlenmiştir. T4 genotipinin Sardunya ve Tibet'te baskın olmasına rağmen T13 genotipinin de buralarda bulunduğu gösterilmiştir. Hollanda topraklarındaki örneklerde ise T2 ve T16 genotipleri gözlenmiştir.

İspanya'nın Kanarya Takım Adalarında yapılan çalışmada küçük köpek cinslerinde iki *Acanthamoeba* enfeksiyonu (keratit ve assit / peritonit) tanımlamışlardır. Amipler %2 besleyici olmayan agar plakaları kullanılarak izole edilip daha ileri biyokimyasal ve moleküler analizler için kullanmışlardır. Osmotolerans ve termotolerans analizleri yapılarak her iki izolatın da patojenik özellikte olduğu gösterilmiştir. Suşları moleküler seviyede sınıflandırmak için, *Acanthamoeba*'nın 18SrDNA bölgesi çoğaltılarak DNA dizi analizi yapmışlardır. Her iki izolatın da T4 genotipine ait olduğunu belirlemişlerdir (Valladares ark., 2015).

Mahmoudi ve ark. (2015), İran'daki dört ilin (Guilan, Mazandaran, Alborz ve Tahran) yüzeysel su kaynaklarındaki *Acanthamoeba* türlerinin varlığını kültürel ve molekül temelli yöntemler kullanarak tespit etmişlerdir. Mart-Kasım ayları arasında 2014'te araştırma alanından 49 yüzeysel suyu örneği toplanmışlardır. Kırk dokuz örneğin 18'inde PZR yöntemiyle *Acanthamoeba* spp. pozitif olarak bulunmuştur. Sekans analizi sonucunda on altı örneğin T4, iki örneğin ise T5 izolatu olduğu bulunmuştur.

Uganda'da ilk kez, *Acanthamoeba*'nın prevalansı ve genotipleri hakkında çevresel ve evsel (musluk suyu) sularda çalışma yapılmıştır. Kasım 2013-Eylül 2014 tarihleri

arasında toplam 324 çevre ve 84 musluk suyu örneği alınmıştır. Kültürü yapılan örnekler mikroskop altında incelenmiştir. İncelenen örneklerden DNA izole edilerek PZR yöntemiyle *Acanthamoeba*'nın varlığı doğrulanmıştır. Çevre ve musluk suyu örneklerinden sırasıyla 107 (%33) ve 36 (%42.9) örneğin *Acanthamoeba* spp. olduğu bulunmuştur (Sente ve ark., 2016).

Aghajani ve ark. (2016), İran da bulunan Sistan bölgesindeki havuz ve durgun sularda tespit edilen *Acanthamoeba*'nın genotiplerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu araştırmada Zabul Tıp Fakültesinde yer alan Parazitoloji Laboratuvarı kullanılmıştır. Sistan bölgesinde yer alan Hirmand, Hamoon Zabol, Zahhak ve Nimrooz'daki havuzlardan ve belirlenen su birikintilerinden toplamda 93 su örneği alınmıştır. Toplanan örnekler kültürle alınmak için önce 0.45µm nitroselüloz filtre kâğıdından süzölmüştür. Filtratlar *E. coli* ile zenginleştirilmiş %1.5 non-nutrient agara konulmuştur. *Acanthamoeba* genotiplerini belirlemek için PZR uygulanmıştır. Kültür sonrası pozitif sonuç veren 82 kültür örneğinden 38'inin *Acanthamoeba* spp. olduğu PZR ile doğrulanmıştır. Sekans sonuçlarına göre 34 örneğin (%89.47) T4, 3'ünün (%7.9) T5 ve 1'inin de (%2.63) T3 genotipine ait olduğu belirlenmiştir.

Fallah ve ark., (2017) Kuzeybatı İran'da *Acanthamoeba* türlerini tanımlamıştır. 2014 Mayıs ve Eylül ayları arasında yüzey sularından 22 farklı istasyon belirleyerek 50 örnek toplamıştır. Su örnekleri filtrelendikten sonra, besleyici olmayan agarda çoğaltılmıştır. Örneklerden DNA izole edilerek 18S rDNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. Elli örneğin 33'ünün (%68) hem kültürde morfolojik karakterizasyonu ile hemde PZR ile *Acanthamoeba* spp. olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak Kuzeybatı İran'daki yüzey sularının potansiyel olarak kirlendiği vurgulanmıştır.

Alexandria Üniversitesi'ndeki iki yüzme havuzundan alınan örneklerde *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türlerinin varlığı araştırılmıştır. 2012 Mayıs ve 2013 yılının Nisan aylarında su örnekleri toplanmıştır. Moleküler karakterizasyon sonucu 10 örneğin *Acanthamoeba* izolatın 7'sinin ise *Naegleria* izolatı olduğu belirlenmiştir. *Acanthamoeba* T3, T4, T5, T11 ve T15 genotipleri tanımlanmıştır. *Acanthamoeba* T4 genotipinin en sık görölen genotip olduğu gösterilmiştir (Al-Herrawy ve ark., 2017).

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Araştırma Bölgesinin Tanımı ve Örneklerin Toplanması

Orta Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Samsun, bölgenin en kalabalık şehridir. Coğrafi konum olarak Samsun ili $40^{\circ} 50'$ - $41^{\circ} 51'$ olarak kuzey enlemleri ve $37^{\circ} 08'$ ve $34^{\circ} 25'$ olarak da doğu boylamları arasında yer almaktadır. Ordu, Amasya, Çorum, Tokat ve Sinop illerinin ortasında yer almaktadır. Karayollarıyla Karadeniz Bölgesini, İç Anadolu Bölgesini ve Doğu Anadolu Bölgesini bağlayan ve 9.579 km^2 'lik geniş bir yüzölçümüne sahip olan Samsun aynı zamanda bir liman şehridir. Samsun Ondokuzmayıs, Salıpazarı, Bafra, Alaçam, Asarcık, Ayvacık, Havza, Çarşamba, Kavak, Ladik, Tekkeköy, Terme, Vezirköprü ve Yakakent olmak üzere toplam 14 ilçeden oluşmaktadır. Samsun şehrinin %18'ini ovalar, %32'sini platolar ve %50'sini de dağlar oluşturmaktadır. İl akarsu ve göl bakımından da oldukça zengindir. İlde 8 adet akarsu bulunmaktadır ve bunlar Yeşilirmak, Kızılırmak, Ters Akan, Terme Çayı, Mert Irmağı, Kürtün Çayı, Abdal deresi ve Karaboğaz Deresi'dir. Ladik, Dutedibi, Balık, Liman, Karaboğaz, Akgöl, Hayırlı, Uzun, İnce, Çernek, Simenlik, ve Tombul olmak üzere il sınırları içerisinde toplam 12 göl bulunmaktadır. Kızılırmak ve Yeşilirmak nehirleri Karadeniz'e dökülür. Türkiye'nin en uzun nehri olan Kızılırmak, Anadolu'dan itibaren büyük bir yay çizerek Samsun topraklarına girer ve il kıyılarında Karadeniz'e dökülür. Samsun ili doğal bitki örtüsü bakımından da son derece zenginlik göstermektedir. Kızılırmak sahip olduğu ekosistem sayesinde biyolojik çeşitlilik yönünden oldukça zengindir. Kuş türlerinin sayıca fazla olması (312 tür) bu delta'nın uluslararası ornitolojik öneme sahip olduğunu göstermektedir (Delioğlu, 2012).

Araştırma alanı olarak Samsun il merkezi ile beraber beş ilçesinde 32 istasyon belirlenmiştir. İstasyonlara ait harita Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.

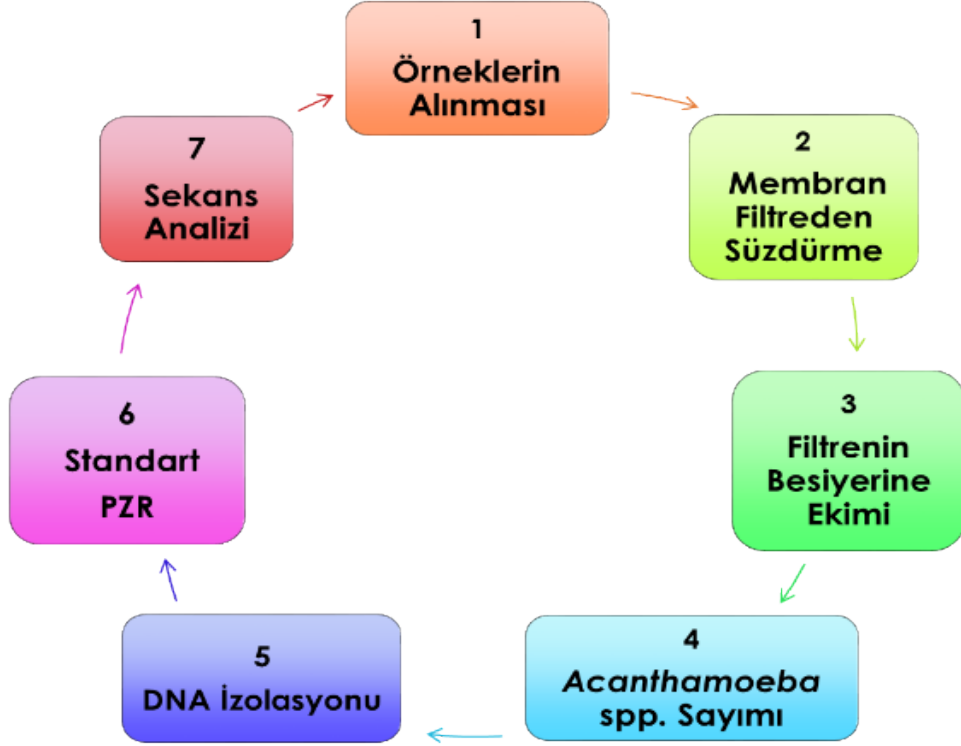
- Samsun il merkezinde belirlenen istasyonlar; Mert Irmağı'ndan 3 örnek (M1, M2, M3); Kürtün Irmağı'dan 3 örnek (Kü1, Kü2, Kü3).
- Terme ilçesindeki istasyonlar; Akçaydan 1 örnek (A1), Miliç Çayı'ndan 2 örnek (M1, M2), Terme Çayı'ndan 6 örnek (T1, T2, T3, T4, T5, T6), Kocaman'dan 6 örnek (K1, K2, K3, K4, K5, K6).
- Çarşamba ilçesindeki istasyonlar; Yeşilirmak Nehri'nden 3 örnek (Y1, Y2, Y3), İrmaksırtı'ndan 2 örnek (IS1, IS2).

- Tekkeköy ilçesindeki istasyonlar; Gelemen (Te1), Selyeli (Te2) ve Kirazlık (Te3) olmak üzere 3 tanedir.
- Bafra ilçesindeki istasyonlar; Kızılırmak'tan 3 örnek (K11, K12, K13).



Şekil 3.1 Örnek Toplanacak İstasyonların Harita Üzerinde Gösterimi (Gülabi, 2016'dan modifiye edilerek çizilmiştir)

3.2 Su Örneklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler



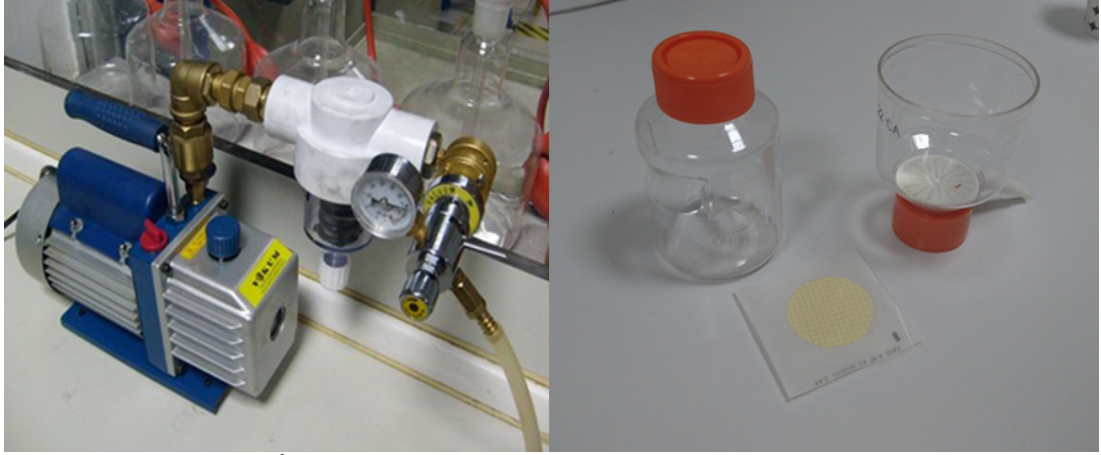
Şekil 3.2 Su Örneklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemlerin Akış Şeması

3.2.1 Su Örneklerinin Toplanması

Samsun ili ve ilçelerinde belirlenen 32 istasyondan 2016 yılının ilkbahar ve 2017 yılının sonbahar aylarında toplam 192 yüzey suyu örnekleri alınmıştır. Ayrıca Samsun, Tekkeköy, Terme, Çarşamba ve Bafra'dan 30 musluk suyu örneği de toplanmıştır. Belirlenen istasyonlardan su örnekleri 500 ml olacak şekilde alınmıştır.

3.2.2 Örneklerin Membran Filtreden Süzdürülmesi

500 ml alınan su örnekleri 0.45 µm gözenek boyutuna sahip selüloz nitrat membran filtre (sartorius) yardımıyla vakum pompası kullanılarak süzdürülmüştür (Mahmoudi, 2012). Süzdürme işleminin ardından *E. coli* ilave edilmiş ringer besiyerine aktarılmıştır.



Şekil 3.3 Süzdürme İşleminde Kullanılan Vakum Pompası ve 0.45µm'lik Gözenek Boyutuna Sahip Selüloz Nitrat Membran

3.2.3 Ringer Agar Besiyerinin Hazırlanması

Sıvı Ringer besiyeri (Katalog No: 1155250001, Merck) hazırlanıp steril edildikten sonra +4°C'ye kaldırılmıştı. Hazırlanan steril Ringer solüsyonun dan 200 ml alınarak içersisine 3 g agar eklenerek otoklavda steril edildikten sonra 90 mm'lik steril petrilere 10 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

3.2.4 Escherichia coli Kültürünün Hazırlanması

Eozin Metilen Blue besiyerine *E. coli* (ATCC 25922) suşundan steril öze kullanılarak biyogüvenlik kabini içerisinde ekim yapılmıştır. Etüvde 36°C'de 24 saat inkübasyondan sonra sarı-yeşil metalik röfle veren koloniler seçilmiştir. Bu koloniler %0.85'lik NaCl içeren ependorf tüplerine toplanmıştır. Hazırlanan Ringer agar besiyerlerine 1 mL *E. coli* süspansiyonundan eklenerek petri kaplarına yayılması sağlanmıştır. Bu koloniler %20'lik yardımıyla ependorflara toplanarak stok oluşturulmuştur.

3.2.5 Su Örneklerin Filtratlarının Ringer Agar Besiyerlerine Ekimi

Selüloz nitrat membran filtratları önceden hazırlanmış olan ve *E. coli* ilave edilmiş Ringer agar besiyerine filtratla besiyeri temas edecek şekilde yerleştirilerek 27°C'lik inkübatörde 3-4 gün bekletilmiştir. Ringer agar besiyerlerindeki *Acanthamoeba* üremesi invert mikroskopta takip edilmiştir. İnvirt mikroskop altında plaklardan *Acanthamoeba* üremesinin yoğun olduğu bölgeler işaretlenerek daha sonra bu bölgelerden küçük agarlar kesilmiştir. Kesilen agar parçaları yeniden Ringer agar besiyerlerine ekilerek iki hafta boyunca 27°C'lik inkübatörde plaklar takip edilmiştir.

3.2.6 *Acanthamoeba* spp. Sayımının Yapılması

İnkübasyondan sonra *Acanthamoeba* kistleri steril fosfat tamponu [PBS (pH = 7.2)] ile yıkanarak, steril öze yardımıyla 15 mL'lik steril falcon tüplerine toplanmıştır. Bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Toplanan trofozoitler 10 °C ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 1 mL kalana kadar fazla supernatant atılmıştır. Hazırlanan preparatlardaki kist sayımı Thoma lamı kullanılarak x10, x20, x40 büyütme ile ışık mikroskopunda (LEİCA, DM500) yapılmıştır. Thoma lamında 1 ml'deki kist sayımı (16 büyük kare x sulandırma faktörü x 10.000) şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.7 Örneklerden DNA İzolasyonunun Yapılması

Thoma lamında sayımı yapılmış 1mL PBS içerisinde bulunan *Acanthamoeba* kistleri 10°C ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 100 µL pellet elde edilene kadar supernatant atılmıştır. Üzerine lizis tamponu eklenerek DNA izole edilene kadar -80°C de tutulmuştur. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) protokolü kısmen değiştirilerek, DNA izolasyonu Karanis ve ark., (2006) göre yapılmıştır.

QIAamp DNA Mini Kit protokolüne göre, üzerine lizis tamponu eklenerek -80 °C'de saklanan örnekler art arda 15 kez sıvı azot içinde dondurup-çözme işlemi uygulanmıştır. Dondurma işlemi örnekler sıvı azot içerisinde 1 dakika bekletilerek, çözme işlemi ise kaynama sıcaklığında olan su banyosunda 1dk bekletilerek yapılmıştır. Bu sayede kist duvarlarının tamamen kırılması sağlanmıştır. En son su banyosunda çözdürülen örneklerin içerisinde 20 µl proteinaz K ilave edildikten sonra tüpler 56°C'lik kuru blok ısıtıcı da bir gece bekletilmiştir. Bir gece kuru blok ısıtıcıda bekletilen tüpler 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin süpernatantı yeni bir ependorf tüpüne alınmıştır ve geride kalan eski tüpteki pellet atılmıştır. Elde edilmiş olan süpernatantın üzerine 200 µL Buffer AL eklenmiş ve 15 saniye vortekslendikten sonra 70°C'de 10 dakika kuru blok ısıtıcıda bekletilmiştir. Kuru blok ısıtıcıdan alınan örnekler vortekslenerek ependorfta yukarı çıkan örneği tüpün altında toplamak için çok kısa bir spin-down yapılmıştır. %99'luk etanolden 200 µL alınıp örneklerin üzerine eklenir ve vortekslenip spin-down yapılmıştır. Bu işlemin sonunda beyaz bir çökelti ependorfun dibinde görülmüştür.

Örnek sayısı kadar kit kutusundan 2 mL'lik collection (toplama) tüpü çıkarılmış ve üzerlerini örnek bilgileri yazılmıştır. Collection tüpünün içine spin column (DNA'nın

bağlanacağı tüp) tüpleri konulmuştur. Bir önceki aşamada oluşan beyaz çökeltilinin olduğu içeriğin tamamı bu spin column tüpünün içine aktarılmıştır ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj işlemiyle collection tüpünde toplanan sıvı atılmış ve tekrar ve tekrar aynı spin column aynı collection tüpüne konulmuştur. Üzerine 500 µL AW1 eklenmiş ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yine collection tüpünde toplanan sıvı atılmıştır.

Dikkatli bir şekilde spin column tüpünün kapağı açılmıştır ve içindeki beyaz bölgeye gelecek şekilde 500 µL AW2 eklenmiştir ardından 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından collection tüpünde biriken sıvı tüple birlikte atılmış ve yeni collection tüpü konulmuştur ve tekrar 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin column tüpleri üzerlerine örnek isimleri yazılmış steril ependorf tüplerine konulmuştur. Bu aşamadan sonra spin column tüplerinin kapağı dikkatli bir şekilde açılarak 50 µl Buffer AE solüsyonu tüpün tam ortasına eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ependorf tüpünün dibinde 50 µL’lik DNA elde edilmiştir. PZR çalışmalarında kullanılmak üzere kısa süre için + 4°C’de iki ay için -20°C’de tutulmuştur.

3.2.8 Standart PZR Uygulanması

Elde edilen DNA örneklerinden 18S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu için Schroeder specific primer çiftleri Şekil 3.4’de gösterilmiştir.

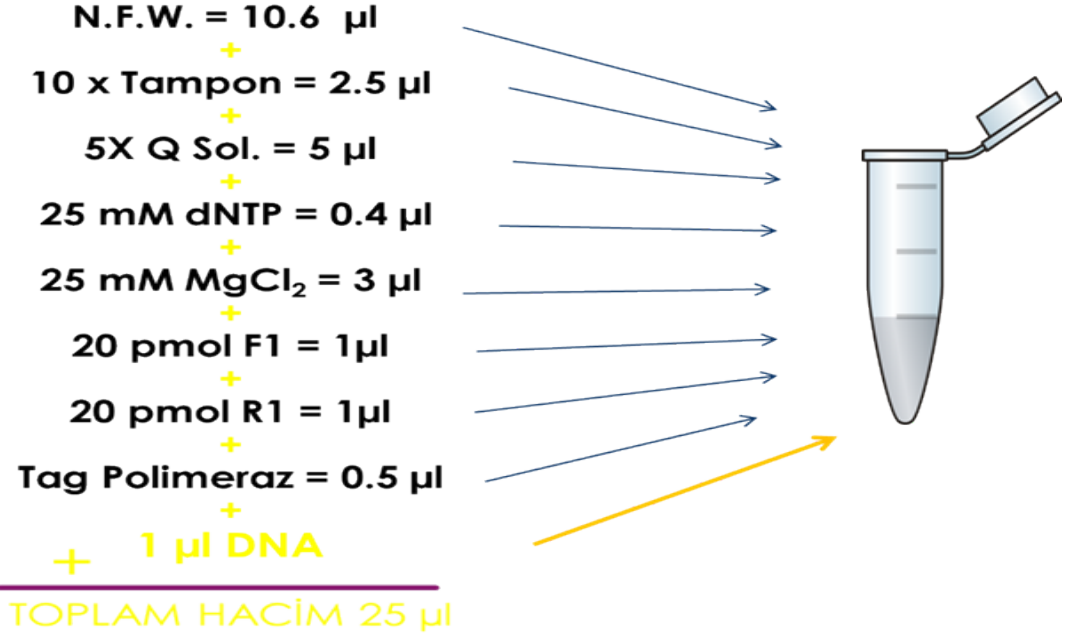


Şekil 3.4 *Acanthamoeba* spp. 18S rDNA Geninin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primer Çifti

Forward: JDP1 5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3';

Reverse: JDP2 5'-TCTCACAAGCTGCTAGG GAGTCA-3'

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testi Mahmoudı ve ark.'nın (2015) kullandığı protokol modifiye edilerek uygulanmıştır. Standart PZR'de: 5X Q solution, 25 mM MgCl₂, 5U hot start Taq DNA Polimeraz (Qiagen), 25 mM dNTP mix, 20 pmol F1 ve R1 primerleri ve 1 µL DNA kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 PZR Reaksiyon Karışımı

Çizelge 3.1 *Acanthamoeba* spp. 18S rDNA PZR koşulu

PZR Koşulu			
İşlem	Sıcaklık	Döngü Sayısı	Süre
İlk denatürasyon (zincirlerin ayrılması)	95°C'de	1	15 dk
Denatürasyon (zincirlerin ayrılması)	94°C'de	35	1 dk
Annealing (eşleşme-bağlanma)	50°C'de	35	45 sn
İlk extention (sentez-uzama)	72°C'de	35	1 dk
Final extention (son uzama)	72°C'de	1	10 dk

Acanthamoeba spp. için PZR reaksiyonu karışımı yukarıda bahsedilen protokoller için 25 µL son hacimde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı vortekslenip Applied Biosystem (Veriti 96 well Thermal Cycler) PZR cihazında inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri +4°C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Her bir test için negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır. Oluşan ürünler Ethidium Bromide boyanmış %1.5'luk agara yüklenmiştir. Jel elektroforezde 100 V da 60 dk. yürütüldükten sonra UV altında (Prizma/Quantum ST4) bantlar görüntülenmiştir.

3.2.9 Sekans Analizi

Sekansı yapılan PZR ürünlerinden elde edilen 18S rDNA gen bölgesine ait forward ve reverse baz dizilerinin consensusu alınarak her bir örneği temsil eden ortak baz dizileri oluşturulmuştur. Gen bankasından alınan referans baz dizileri ve örneklere ait ortak baz dizilerini hizalamak için BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılmıştır. *Acanthamoeba* spp. 18S rDNA gen bölgesine ait referans gen dizileri (U07400 (T1), DQ992189 (T2), S81337 (T3), AF316547 (T4), U94736 (T5), AY172999 (T6), AF019064 (T7), AF019065 (T8), AF019070 (T10) ve AF019068 (T11)) ile su örneklerine ait gen dizileri BioEdit programının içindeki ClustalW (Thompson ve ark., 1994) modülü kullanılarak yapılmıştır. Hizalanmış olarak elde edilen baz dizileri MEGA 5.05 paket programı kullanılarak Maksimum olasılık analizleri, Seç Bağla testi (Boostrapping) ve Kimura-2 genetik uzaklık parametre modeli 1000 tekrarla hesaplanmıştır. Neighbour Joining (NJ), Maximum-Parsimony (MP) ve Maximum-Likelihood (ML) algoritmalarından yararlanılarak filogeni ağacı çizilmiştir.

3.3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar

3.3.1 Sıvı Ringer Solüsyonunun Hazırlanması

Sıvı Ringer besiyerinin hazırlanması için (Katalog No: 1155250001, Merck) 1 tablet alınmış ve üzerine saf su ilave edilerek çözünmesi sağlanmış ve toplam hacim 500 mL de sabitlenmiştir. Hazırlanan çözeltinin sterilizasyonu için 121°C sıcaklıkta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Ringer solüsyonu ihtiyaç duyulana kadar +4°C'de buzdolabında 1 ay korunabilir).

3.3.2 Ringer-Agar Besiyerinin Hazırlanması

Temizlenmiş spatülle stoktan (Katalog No: MC002, Lab M) alınmış olan agar hassas terazide 7.5 g tartılır. 500 mL'lik hazırlanan Sıvı Ringer solüsyonunun içerisine tartılan agar ilave edilmiş ve sıcaklık ayarı olan bir manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3001K) yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Agarın çözündükten sonra besiyerinin sterilizasyonu için 121°C de 15 dakika otoklavlanmıştır. Sterilizasyondan sonra besiyerine dokunulabilecek sıcaklığa kadar düşmesi beklenmiştir. Soğumanın ardından Kalibre Biyo-Güvenlik Kabininde (Bilser Class 2A) 90 mm'lik steril petrilere yaklaşık olarak 10 – 15 mL dökülerek oda sıcaklığında katılaşması

beklenmiştir. Kullanıma hazır hale gelen besiyeri plaklarının etrafı parafilmlelenerek +4°C’de kullanılmaya hazır olarak saklanmıştır (Malatyalı ve ark., 2011).

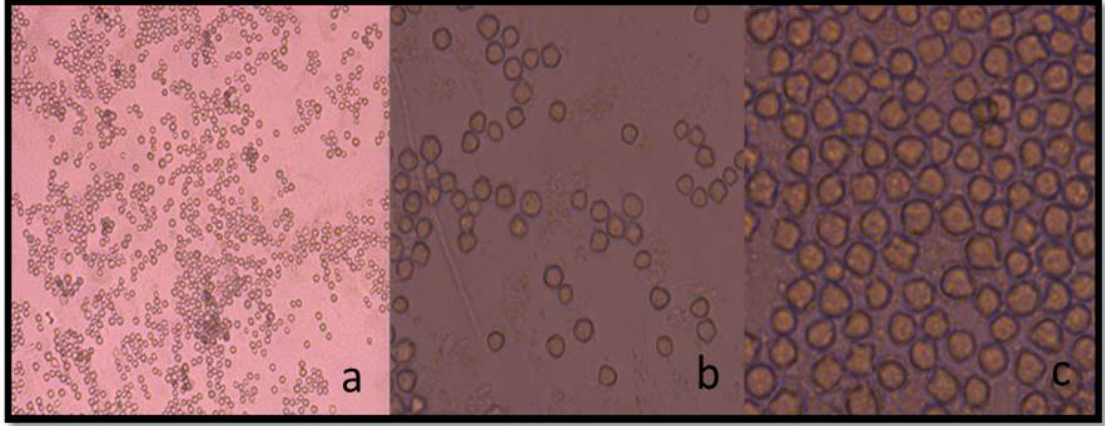
3.3.3 Eosin Methylene Blue (EMB) Agar Besiyerinin Hazırlanması

Stok kabından (Katalog No: CM0069B, OXOID) temiz bir spatül yardımıyla 18.75 g dehidre besiyeri alınarak hassas terazide tartılmıştır. Total hacim 500 ml olacak şekilde saf su eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika steril edilerek, 50°C civarındaki sıcaklığa gelince biyogüvenlik kabini içerisinde 90 mm’lik steril petrilere dökülmüştür. Kullanılncaya kadar 4°C buzdolabına saklanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

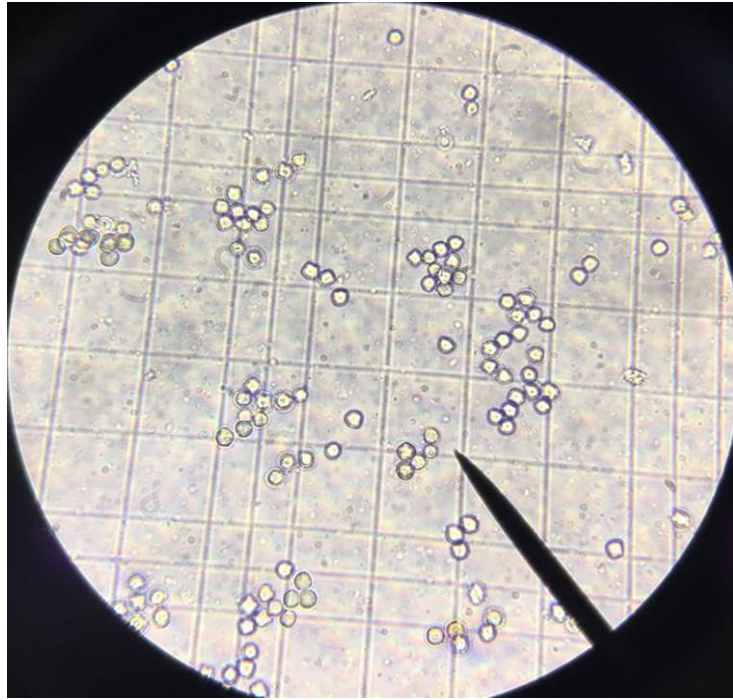
4.1 *Acanthamoeba* spp.'nin Mikroskopta Tespit Edilmesi

Su örneklerinin filtratlarının ringer agar besiyerlerine ekiminden sonra plaklarda gözlenen *Acanthamoeba* kistlerinin görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Su Örneklerinden İzole Edilen ve Kültüre Edilmiş *Acanthamoeba* Kistlerinin Invert Mikroskopta Görüntüsü, a: X10, b: X20, c: X40

İnkübasyondan sonra *Acanthamoeba* kistleri plaklardan toplanarak Thoma lamında kistlerin 1mL'deki sayısı hesaplanmıştır. Thoma lamında kistlerin görüntüsü Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Plaklardan Toplanan *Acanthamoeba* Kistlerinin Thoma Lamı İle Sayımı (a: 40X)

4.2 *Acanthamoeba* spp.'nin Moleküler Tekniklerle Tespit Edilmesi

4.2.1 PZR Metodunun Özgünlüğü

PZR metodunun özgünlüğünü kanıtlamak amacıyla seçilen hedef DNA *Acanthamoeba* spp. 18S rDNA gen bölgesinin dışında hedef DNA olarak seçilmeyen protozoonların DNA'ları (*C. parvum*, *T. gondii*, *G. intestinalis*, *Babesia bovis*, *Blastocystis hominis*) kullanılmıştır. Özgünlüğünü test etmek için *Acanthamoeba* spp. ve farklı protozoonlara ait 18S rDNA gen bölgesinin PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

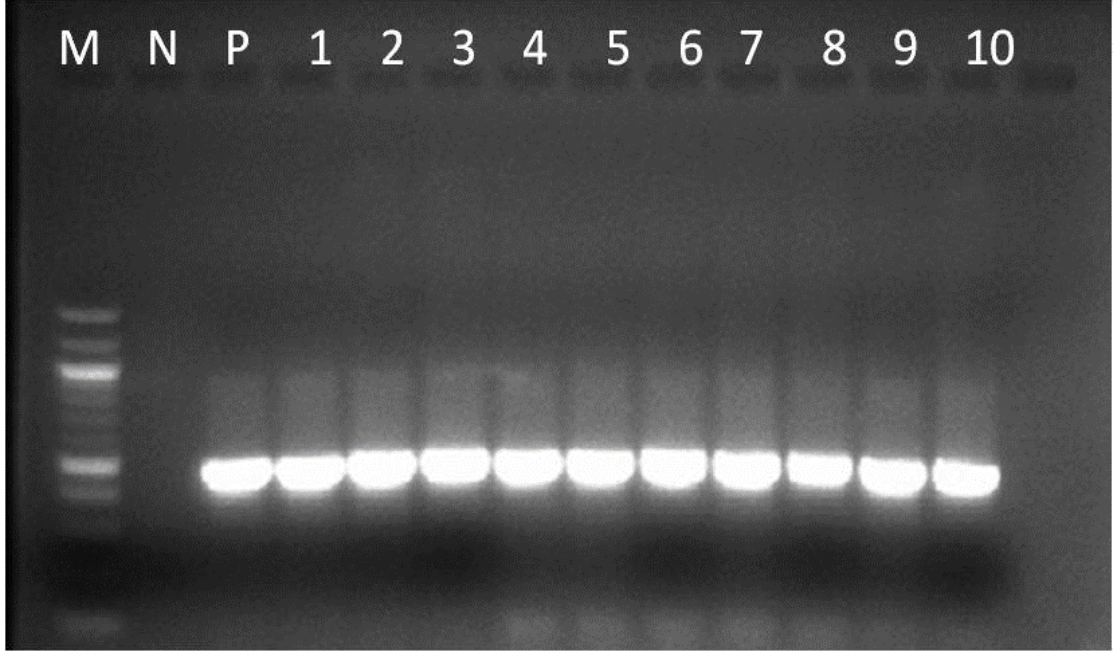


Şekil 4.3 *Acanthamoeba* 18S rDNA Gen Bölgesinin PZR İle Özgünlüğünün Agaroz Jeldeki Görüntüsü M: 100 bç marker, N: distile su (negatif), P: *Acanthamoeba castellanii* (ATCC30010) DNA 1: *C. parvum* DNA, 2: *T. gondii* DNA, 3: *G. intestinalis* DNA, 4: *Babesia bovis*, 5: *Blastocystis hominis*.

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi sadece *Acanthamoeba* spp. PZR ürününün bulunduğu kuyucukta (P) bant gözlenmiştir. Hedef DNA olarak seçilmeyen protozoonların DNA'larına (*C. parvum*, *T. gondii*, *G. intestinalis*, *B. bovis*, *B. hominis*) ait PZR ürünlerinde herhangi bir amplifikasyon görülmemiştir. Böylece çalışmada kullanılan PZR protokolünün sadece *Acanthamoeba* spp. için spesifik olduğu ortaya konulmuştur.

4.2.2 PZR Metodunun Hassasiyeti

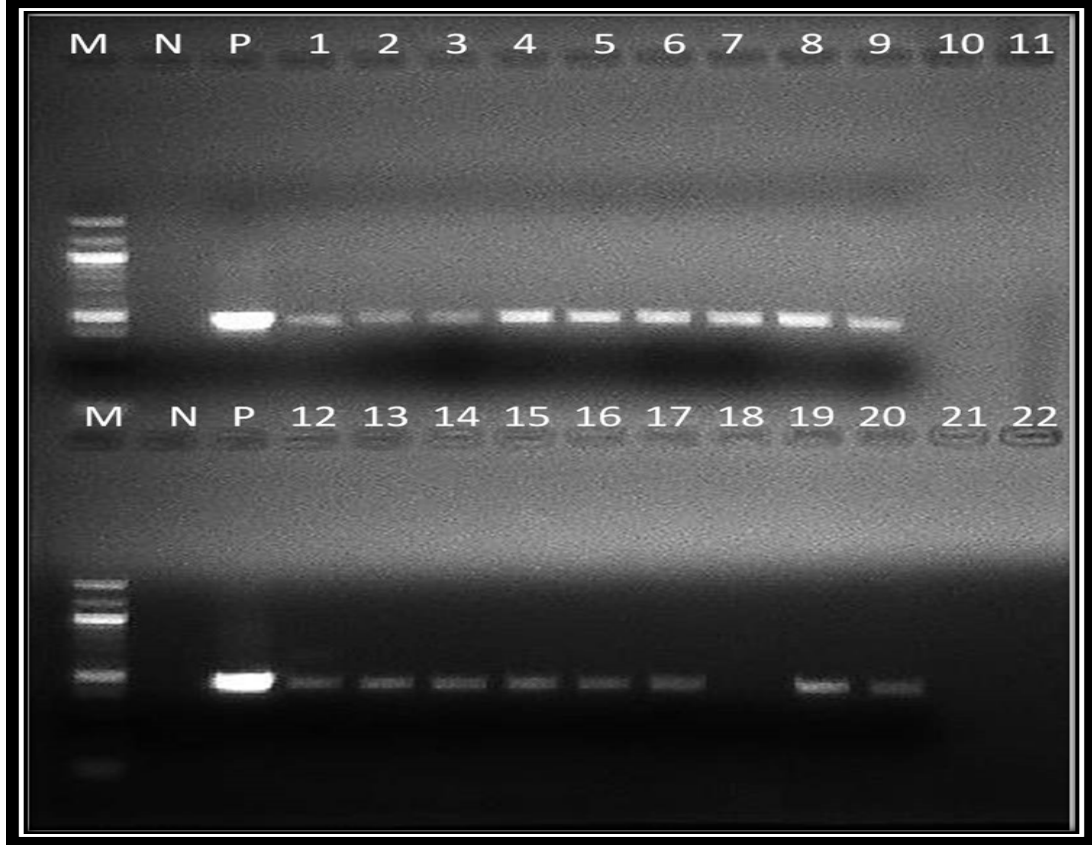
Miktarı belli *Acanthamoeba* kistleri (10^5 /mL) ilave edilen ırmak suyu örneklerinden elde edilen DNA'lara standart PZR tekniği uygulanmıştır. PZR ürünleri ethidium bromidli %1.5'lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforezde yürütülen DNA'ların UV ışığı altında (Prizma/Quantum ST4) bantları görüntülenerek PZR metodunun hassasiyeti test edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Miktarı belli *Acanthamoeba* Kistleri (10^5 /mL) İlave Edilen Irmak Suyu Örneklerine Ait PZR Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü M: 100 bp Marker, N: Distile Su (negatif), P: *A. castellanii* (ATCC30010) DNA (pozitif), 1-10: Araştırma Alanından Alınan *Acanthamoeba* Kistleri İlave Edilmiş Irmak Suyu Örneklerine Ait PZR Ürünleri

4.3 Araştırma Alanından Alınan Su Örneklerine Ait PZR ve Sekans Analiz Sonuçları

Samsun ilinden alınan 192 çevresel, 30 musluk suyu örneklerinden DNA izolasyon işlemi yapılmış ve izole edilen DNA'lara PZR metodu uygulanmıştır. Musluk suyu örneklerinde *Acanthamoeba* spp. tespit edilememiştir. Toplamda 222 su örneği incelenmiş olup PZR tekniğiyle 98 (%44) örnek pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif örneklere ait agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.5 Samsun İlinden Alınan Su Örneklerine Ait PZR Yöntemiyle Çoğaltılan Hedef DNA' nın Agaroz Jeldeki Görüntüsü M: 100 bp DNA marker, N: (distile su) negatif, P: *A. castellanii* (ATCC30010) , 1-22: Araştırma Alanından Toplanan Su Örnekleri

Samsun merkezinden alınan 36 su numunesinin 15'i, Terme ilçesinden alınan 90 su numunesinin 58'i, Çarşamba ilçesinden alınan 30 su numunesinin 12'si, Tekkeköy ilçesinden alınan 18 su numunesinin 7'sinde, Bafra ilçesinden alınan 18 su numunesinin 6'sında PZR tekniği kullanılarak *Acanthamoeba* DNA'sı pozitif sonuç vermiştir. Musluk sularından alınan örneklerde *Acanthamoeba* spp.'ye rastlanmamıştır. Toplam çevresel ve musluk suyu (222 örnek) numunesinin %44'ü pozitif olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.3'de araştırma alanın da *Acanthamoeba* spp.'nin varlığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Samsun İlinde Belirlenen İstasyonlardan Alınan Su Örneklerinde *Acanthamoeba* spp.'nin Gösterilmesi

Su Örnekleri	Araştırma Alanı	İncelenen Örnek Sayısı	PZR ile Pozitif Örnek Sayısı
Musluk Suyu	Tüm istasyonlar	30	0
	Samsun Merkez	36	15
	Terme	90	58
Nehir Suyu	Çarşamba	30	12
	Tekkeköy	18	7
	Bafra	18	6
Ara Toplam		192	98
% Pozitif			(% 51)
Genel Toplam		222	
Pozitif (%)			(% 44)

PZR metoduyla pozitif olduğu tespit edilen su örneklerine ait ürünlerin sekans analiz sonuçları Gen Bankasından alınan *Acanthamoeba* genotiplerine ait referanslarla kıyaslanmıştır. Buna göre çalışmada 4 farklı Haplotip belirlenmiştir. Çizelge 4.2’de sekans analiz sonuçları ve oluşturulan Haplotipler gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Samsun İlinden Alınan Pozitif PZR Ürünlerinin Sekans Analiz Sonuçları

İstasyonlar	PZR Pozitif Örnek Sayısı	Sekans Analizi			
		Haplotip I <i>Acanthamoeba triangularis</i> (AF316547) T4	Haplotip II <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (AF019051) T4	Haplotip III <i>Acanthamoeba sp.</i> (EU168069) T4	Haplotip IV <i>Acanthamoeba lenticulata</i> (U94736) T5
Samsun Merkez	15				
Mert Irmağı					
Me1	2	-	-	2	-
Me2	3	-	1	2	-
Me3	4	1	1	2	-
Kürtün Irmağı					
Kü1	2	-	-	2	-
Kü2	2	-	-	2	-
Kü3	2	-	1	1	-
Terme	58				
Akçay	-	-	-	-	-
Miliç					
Mi1	2	-	1	1	-
Mi2	1	-	-	1	-
Terme Çayı					
T1	4	1	1	2	-
T2	6	-	2	3	1
T3	5	-	1	3	-
T4	5	-	2	3	-
T5	4	-	1	2	1
T6	4	1	-	3	-
Kocaman Irmağı					
K1	6	-	2	3	1
K2	5	1	3	2	-
K3	5	-	2	3	-
K4	4	-	2	2	-
K5	4	1	1	2	-
K6	3	-	-	3	-
Çarşamba	12				
Yeşilirmak Nehri					
Y1	1	-	-	1	-

Çizelge 4.2'nin devamı

Y2	2	-	1	1	-
Y3	3	-	1	2	-
Irmaksırtı					
I1	2	-	1	1	-
I2	4	-	2	2	-
Tekkeköy	7				
Gelemen (Te1)	3	-	1	2	-
Selyeri (Te2)	3	-	2	1	-
Kirazlık (Te3)	1	-	-	1	-
Bafra	6				
Kızılırmak					
K11	-	-	-	-	-
K12	3	-	-	3	-
K13	3	-	1	2	-
Genel Toplam Pozitif	98	5 (%5)	29 (% 29.6)	61(% 62)	3 (%3)

Samsun ilinde belirlenen 32 istasyondan 192 su numunesi alınmıştır ve bu su numunelerinin 98'i pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4. 2) 98 pozitif su örneğinin %5'i Haplotip I, %29.6'sı Haplotip II, %62'si Haplotip III ve %3'ü ise Haplotip IV olarak belirlenmiştir. Belirlenen 32 istasyonun ilçelere göre dağılımı şu şekildedir.

Samsun merkezde pozitif olan 15 su örneğinin 1'i Haplotip I (*A. triangularis*), 3'ü Haplotip II (*A. polyphaga*), 11'i Haplotip III (*Acanthamoeba* sp.) olup, Haplotip IV (*A. lenticulata*) görülmemiştir. Terme ilçesinden alınan 58 pozitif su örneğinin 4'ü *A. triangularis*, 18'i *A. polyphaga*, 33 tanesi *Acanthamoeba* sp. ve 3 tanesi de *A. lenticulata* olarak saptanmıştır. Çarşamba ilçesinden alınan 12 pozitif su örneğinde Haplotip I ve Haplotip IV görülmemiştir. Beş örneğin *A. polyphaga*, 7 örneğin ise *Acanthamoeba* sp. olduğu belirlenmiştir. Tekkeköy ilçesinde bulunan pozitif 7 su örneğinin 3'ü Haplotip II (*A. polyphaga*), 4'ü Haplotip III (*Acanthamoeba* sp.) olarak tespit edilmiştir. Haplotip I ve Haplotip IV'e rastlanmamıştır. Bafra ilçesinden alınan su örneklerinden pozitif olan 6 örneğin 1'i Haplotip II (*A. polyphaga*), 5'i Haplotip III (*Acanthamoeba* sp.) olmuştur. Haplotip I ve Haplotip IV görülmemiştir.

Haplotipler arasında 18S rDNA gen bölgesi yüzde benzerlik ve evrimsel uzaklık ilişkisi Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Gen Bankasından Alınan *Acanthamoeba* Genotipleri ve Su Örneklerine Ait 18S rDNA Gen Bölgesi Yüzde Nükleotid Benzerliği ve Evrimsel Uzaklık İlişkisi

	Haplotip I	<i>Acanthamoeba triangularis</i> (AF316547)	Haplotip II	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Haplotip III	<i>Acanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba griffini</i>	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	Haplotip IV	<i>Acanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba astromyxis</i>	<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	<i>Acanthamoeba healyi</i>	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	<i>Protacanthamoeba bohemica</i>
Haplotip I	ID	0.997	0.486	0.486	0.133	0.133	0.354	0.351	0.39	0.333	0.332	0.337	0.291	0.293	0.307	0.387	0.227
<i>Acanthamoeba triangularis</i> (AF316547)	0.002	ID	0.487	0.487	0.133	0.133	0.354	0.351	0.39	0.333	0.332	0.337	0.29	0.293	0.307	0.387	0.227
Haplotip II	0.0360	0.0360	ID	0.999	0.215	0.215	0.393	0.422	0.41	0.394	0.394	0.427	0.389	0.369	0.379	0.407	0.271
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> (AF019051)	0.03603	0.0360	0.001	ID	0.215	0.215	0.393	0.422	0.41	0.394	0.394	0.427	0.389	0.369	0.379	0.407	0.271
Haplotip III	0.04504	0.0450	0.0450	0.0450	ID	0.998	0.523	0.512	0.525	0.469	0.469	0.509	0.352	0.385	0.504	0.532	0.482
<i>Acanthamoeba</i> sp. (EU168069)	0.04504	0.0450	0.0450	0.0450	0.003	ID	0.523	0.512	0.525	0.469	0.469	0.509	0.352	0.385	0.504	0.532	0.482
<i>Acanthamoeba castellanii</i> (U07400)	0.05405	0.0540	0.0540	0.0540	0.0540	0.0540	ID	0.844	0.871	0.729	0.729	0.822	0.554	0.621	0.827	0.882	0.628
<i>Acanthamoeba</i> sp. (DQ992189)	0.02702	0.0270	0.0090	0.0090	0.0360	0.0360	0.0450	ID	0.883	0.753	0.753	0.926	0.552	0.609	0.792	0.865	0.626
<i>Acanthamoeba griffini</i> (S81337)	0.00900	0.0090	0.0270	0.0270	0.0360	0.0360	0.0450	0.0180	ID	0.745	0.743	0.858	0.561	0.62	0.795	0.944	0.635
<i>Acanthamoeba lenticulata</i> (U94736)	0.05405	0.0540	0.0630	0.0630	0.0630	0.0630	0.0450	0.0540	0.0450	ID	0.998	0.755	0.546	0.59	0.699	0.748	0.604
Haplotip IV	0.05405	0.0540	0.0630	0.0630	0.0630	0.0630	0.0450	0.0540	0.0450	0.002	ID	0.755	0.546	0.59	0.699	0.748	0.602
<i>Acanthamoeba</i> sp. (AY172999)	0.02702	0.0270	0.0180	0.0180	0.0360	0.0360	0.0450	0.0180	0.0180	0.0540	0.0540	ID	0.548	0.604	0.781	0.845	0.609
<i>Acanthamoeba astromyxis</i> (AF019064)	0.09009	0.0900	0.0900	0.0900	0.0990	0.0990	0.0720	0.0900	0.0810	0.0630	0.0630	0.0720	ID	0.825	0.554	0.566	0.458
<i>Acanthamoeba tubiashi</i> (AF019065)	0.09909	0.0990	0.0900	0.0900	0.0990	0.0990	0.0540	0.0900	0.0900	0.0810	0.0810	0.0720	0.0180	ID	0.622	0.625	0.506
<i>Acanthamoeba healyi</i> (AF019070)	0.05405	0.0540	0.0540	0.0540	0.0630	0.0630	0.0180	0.0450	0.0450	0.0630	0.0630	0.0450	0.0900	0.0720	ID	0.793	0.587
<i>Acanthamoeba hatchetti</i> (AF019068)	0.00900	0.0090	0.0270	0.0270	0.0360	0.0360	0.0450	0.0180	0.0000	0.0450	0.0450	0.0180	0.0810	0.0900	0.0450	ID	0.631
<i>Protacanthamoeba bohemica</i> (AY960120)	0.21621	0.2162	0.2252	0.2252	0.1801	0.1801	0.2162	0.2162	0.2072	0.1711	0.1711	0.2162	0.2342	0.2522	0.2162	0.2072	ID

18S 18S rDNA gen bölgesi yüzde benzerlik ve evrimsel uzaklık ilişkisi incelendiğinde Haplotip I ve *A. triangularis* arasında en az genetik uzaklık 0.002 ile hesaplanmıştır. Haplotip I ile *A. tubiashi* arasında en yüksek genetik uzaklık ise 0.0991 olarak bulunmuştur. Haplotip I ile *A. trigualis* arasındaki nükleotit benzerliği %99.7 olarak tespit edilmiştir.

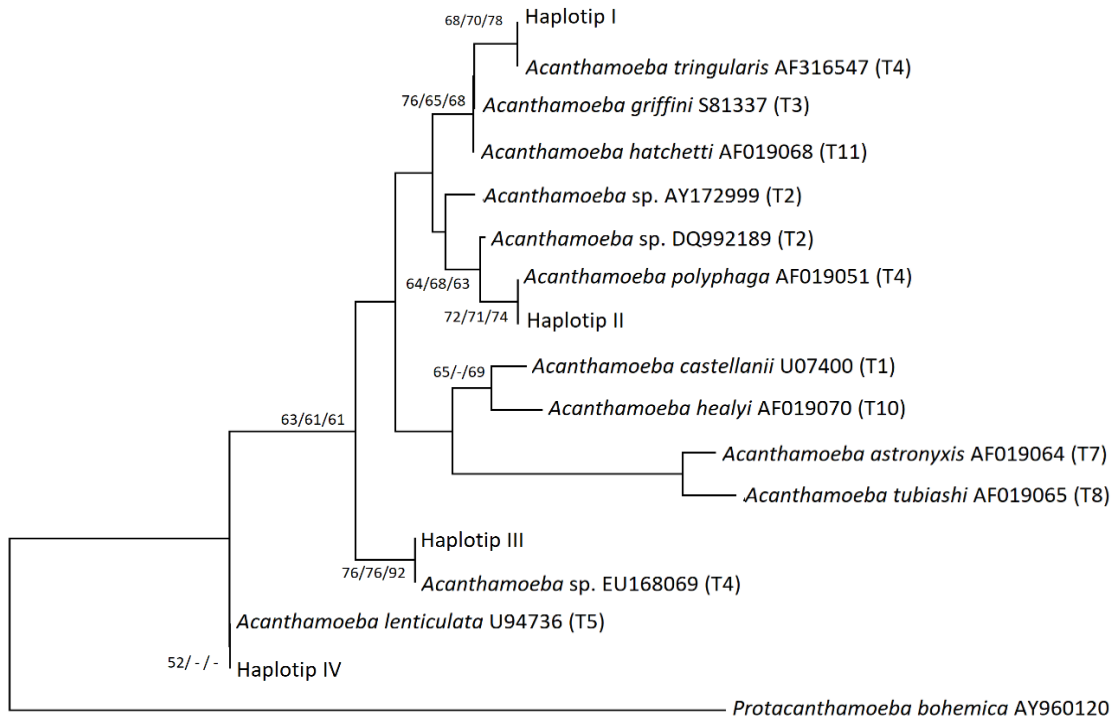
Haplotip II ile *A. polyphage* arasında en düşük genetik uzaklık 0.001 olarak bulunmuştur. Haplotip II ile en yüksek genetik uzaklık ise *A. astronixis* ve *A. tubiashi* arasında 0.0901 olarak belirlenmiştir. Haplotip II ile *A. polyphage* arasındaki nükleotit benzerliği %99.9 olarak bulunmuştur.

Haplotip III ile en düşük genetik uzaklık 0.003 olarak *Acanthamoeba* sp. arasında bulunmuştur.

Haplotip III'ün en yüksek genetik uzaklığı ise 0.0991 ile *A. tubiashi* ve *A. astronixis* arasında hesaplanmıştır. Haplotip III ile *Acanthamoeba* sp. arasında nükleotit benzerliği %99.8 oranında bulunmuştur.

Haplotip IV de en düşük genetik uzaklık 0.002 ile *A. lenticulata* arasında tespit edilmiştir. Haplotip IV ile en yüksek genetik uzaklık 0.081 ile *A. tubiashi* arasında gözlenmiştir. Haplotip IV ile *A. lenticulata* arasında nükleotit benzerliği ise %99.8 olarak bulunmuştur. Tüm türler için ortalama genetik uzaklık 0.08 olarak hesaplanmıştır.

Acanthamoeba pozitif su örnekleri (Haplotip I, Haplotip II, Haplotip III ve Haplotip IV) ve gen bankasından alınan tüm *Acanthamoeba* genotiplerine ait (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T10 ve T11) 18S rDNA gen bölgesi NJ filogeni ağacı Şekil 4.6'da verilmiştir. Burada bootstrop değeri %50'den fazla olan NJ, MP, ML analizleri sırayla ağaç üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Tüm *Acanthamoeba* Genotipleri 18S rDNA Gen Bölgesine Ait NJ Filogeni Ağacı

Şekil 4.6'da gösterildiği gibi Haplotype I ile *A. triangularis* arasında %68, 70 ve 78 oranında bootstrop değerleriyle NJ, MP, ML filogeni ağaçlarında benzerlik bulunmuştur. Haplotype II ile *A. polyphaga* arasında %72, 71 ve 74 oranında bootstrop değeriyle NJ, MP, ML filogeni ağaçlarında benzerlik saptanmıştır. Haplotype III ile *Acanthamoeba* sp. arasında %76, 78 ve 92 oranında bootstrop değeriyle NJ, MP, ML filogeni ağaçlarında benzerlik belirlenmiştir. Haplotype IV ile *A. lenticulata* arasında %52 bootstrop değeriyle NJ filogeni ağaçlarında benzerlik görülmüştür.

Serbest yaşayan amipler (SYA) yaşamlarını sürdürmek için her zaman bir organizmaya ihtiyaç duymayan ve her yerde yaşayabilen protozoonlardır. Su, toprak, gibi doğal ortamlarda yaşayabildikleri gibi doğal olmayan yüzme havuzlarında, musluk sularında da bulunabilirler (Rodriguez-Zaragoza, 1994; Berk ve ark., 2006). Bakteriler, algler, mantarlar, protozoonlar veya diğer organik partiküller üzerinde beslenirler ve hareketlidirler ve aynı zamanda besinleri pinositoz yoluyla da alabilirler (Marciano-Cabral ve Cabral 2003; Greub ve Raoult, 2004) *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Sappinia* cinsleri doğrudan insanlarda hastalık yapmaktadırlar (Visvesvara ve ark., 2007; Critchley ve ark., 2009).

Acanthamoeba türleri doğal ortamlarda (su, termal sular, deniz suyu, toprak, hava) bulunduğu gibi doğal olmayan insanlar tarafından yapılmış ortamlarda da (içme suyu, ambalajlı kaynak suları, distile su, klorlu yüzme havuzu suları, kontakt lens saklama kapları ve solüsyonları) bulunmaktadır (Khan ve ark., 2002).

Chappell ve ark. (2001), normal insanların %80'inden fazlasının, *Acanthamoeba*'ya karşı antikorlara sahip olduğunu bildirmiştir. Bu durum *Acanthamoeba*'nın insanlar ile sık sık temas eden organizmalar olduklarını ortaya koymaktadır (Lorenzo-Morales ve ark., 2005). *Acanthamoeba* türleri yaşamak için bir konağa ihtiyaç duymasa da insanlara teması sonucunda dokulara yerleşerek çok ciddi hastalıklar oluşturmaktadır (Lorenzo ve Morales, 2015).

Acanthamoeba türlerinin cins seviyesinde teşhisi, trofozoitlerin ve kistlerin ayırt edici özelliklerine, özellikle de çift duvarlı kistlerin şekline bağlı olarak yapılmaktadır. *Acanthamoeba* cinsinin trofozoit evresinde görülen “Acanthapoda” denilen diken şeklindeki çıkıntılar bu cinsin diğer amiplerden morfolojik olarak ayrımını sağlamaktadır. *Acanthamoeba* türleri, başlangıçta 3 farklı morfolojik grup (I, II ve III) olarak sınıflandırılmıştır (Pussard ve Pons 1977; Page, 1991). Ancak, morfolojik sınıflandırma *Acanthamoeba*'nın tür seviyesinde ayrımı için yetersiz kalmaktadır (Stothard ve ark., 1998; Alves ve ark., 2000). Ayrıca kist morfolojisinin kullanılan besiyerine bağlı olarak farklılık göstermesi, teşhis için kültüre alınmasının gerekliliği, bu alanda uzman araştırmacılara ihtiyaç duyulması gibi nedenler morfolojik karakterler esas alınarak yapılan teşhisin dezavantajlarıdır. Bu parazitlerin taksonomisi ve sınıflandırması, moleküler tekniklerin başarılı bir şekilde uygulanmasının ardından revize edilmeye başlanmıştır (Khan ve ark., 2001; Booton ve ark., 2002; Kong ve ark., 2002; Lorenzo-Morales ve ark., 2005).

Gast ve ark. (1996) ve Stothard ve ark. (1998) tarafından yayınlanan 18S rRNA geni kullanılarak yapılan sınıflandırmanın ardından bu alanda günümüze kadar devam eden pek çok çalışmaya rastlamak mümkündür. 18S rRNA gen bölgesinde tespit edilen farklılıkların hepsinin %5'in altında olduğu suşlar tek genotip altında toplanmıştır. Üç morfogruptan gelen 50'den fazla suşu analiz ederek T1'den T12'ye kadar 12 genotip belirlemişlerdir (Stothard ve ark., 1998). Daha sonra T13'ten T15'e kadar üç yeni genotip Horn ve ark. (1999); Gast (2001) ve Hewett ve ark. (2003) tarafından

belirlenmiştir. Klinik ve çevresel örneklerden elde edilen genetik ve filogenetik veriler sayesinde yeni bir genotip olan T16 Corsaro ve Venditti (2010) tarafından rapor edilmiştir. Fuerst ve ark. (2015) *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA filogenetik analizi sonucunda T1 den T20'ye kadar genotiplendirme gösterilmiştir. T17 genotipi için izolatlar arasında varyasyonun heterojen olduğu, T18 genotipinin ise sadece son zamanlarda yeni nominal *Acanthamoeba byersi* olarak bildirilmiştir (Fuerst ve ark., 2015).

Acanthamoeba'nın cinse özgü primer çiftiyle PZR tekniğinin kullanımı ilk olarak Vodkin ve ark. (1992) tarafından yapılmıştır. ACARNA 1383- 1655 primer çiftini kullanarak bir amipe kadar az sayıda amip içeren formalinle tespit edilmiş veya taze örneklerden 1383 -1655bp'lik PZR ürünü elde etmişlerdir. Daha sonra Kim ve ark. (1997) tarafından gözde bulunan *Acanthamoeba* izolatlarının tanımlanması için cinse özgü primer çiftini kullanılarak 66-585 bp'lik 18S rDNA gen bölgesini çoğaltmışlardır. Bunları takiben Lehmann ve ark. (1998) AK'teki amip varlığının belirlenmesinde PIGP-2379 forward- 2632 reverse primer çiftini kullanmışlardır. Klinik çalışmalarda *Acanthamoeba* varlığını doğrulamak için 1835-2079 bp'lik gen bölgesini çoğaltmışlardır. Primer seti 66-585 (Kim ve ark., 1997), *Acanthamoeba*'ya özgü primer olmasına rağmen sadece morfolojik grup 2 ve 3'ün genotiplerini (T1, T6, T10, T12) çoğaltmıştır. Daha büyük olan Morfolojik Grup I'in T7, T8 ve T9 genotipleri bu primerler ile çoğaltılamamıştır. Ortaya çıkan bu problem Schroeder ve ark. (2001) tarafından 18S rDNA dizilerinin veri tabanı kullanılarak elde edilen JDP1-JDP2 primer seti dizayn edilerek çözülmüştür. Bu primerlerin tüm *Acanthamoeba* 18S rDNA genotiplerini çoğaltırken, amiplerin diğer yakın cinslerinden veya insanlar dahil uzaktaki kontrol organizmalarından hiç birini çoğaltmadığı gözlenmiştir.

Brazilya'nın Rio Grande do Sul bölgesinde Mart ve Kasım 2009 tarihleri arasında arasında devlet ve belediye okullarından toplam 136 musluk suyu örneği toplanmıştır. Araştırılan 31 (%22.79) musluk suyu, serbest yaşayan amipler (FLA) için pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan 13 *Acanthamoeba* türlerinin T2, T4 ve T6 genotiplerine ait olduğu belirlenmiştir (Winck ve ark., 2011).

Güney Tayvan'daki iki su havzasından toplanan 211 su örneğinden JDP1-JDP2 primer seti kullanılarak PZR yapılmıştır. *Acanthamoeba* türleri 34 (%16.1) örnekte tespit

edilmiştir. Su örneklerinde *Acanthamoeba* türlerinin varlığı su sıcaklığı seviyelerine ve toplam koliformlara bağlı olarak anlamlı farklılık göstermiştir. *Acanthamoeba* genotipleri T4 (n = 19), T5 (n = 8) ve T15 (N = 3)'tir. Genotip T6, T7/T8, T11 ve T12 hepsi bir kez tespit edilmiştir. Genotip T4, T5, T6, T11 ve T15 *Acanthamoeba* keratitinden sorumlu olup çevresel sularla temas eden insanlar için potansiyel sağlık sorunları oluşturabileceği vurgulanmıştır (Kao ve ark., 2012).

Magnet ve ark. (2012) tarafından dört içme suyu arıtma tesisinden 32, yedi atık su arıtma tesisinden 28 su örneği toplanmıştır. Su örneklerinde *Acanthamoeba* kültür izolasyonu ile %90.3 oranında ve Real-time PZR ile %87.5 oranında tanımlanmıştır. Tüm çevresel su örneklerinde T4 genotipine rastladığı bildirilmiştir.

Pakistan'ın Khyber Pakhtunkhwa bölgesinde farklı sulardan *Acanthamoeba* genotiplerinin moleküler karakterizasyonu sonucunda ilk defa, çeşitli patojenik (T2-T10, T4, T5, T15) ve nonpatojenik (T7, T16 ve T17) genotipler belirlenmiştir (Tanveer ve ark., 2013).

Kuzey Polonya'daki beş farklı bölgeden 20 yüzey suyu örneği toplanmıştır. İncelenen 20 örnekten Gerçek zamanlı PZR ile test edilen 13 örnekte, PZR tekniği ile 10'unda *Acanthamoeba* DNA'sı bulunmuştur. Pozitif örneklerin hepsinin T4 genotipine sahip olduğu ve bu genotipin AK vakaları ile ilişkili olup daha geniş alanlarda farklı lokasyonlardaki *Acanthamoeba* suşlarının prevalansı ve patojenik potansiyelinin belirlenmesi gerektiği belirtilmiştir (Lass ve ark., 2014).

Brezilya'nın güneyindeki Porto Alegre'de pazarlanan maden suyu şişelerinde *Acanthamoeba*'nın varlığını araştırmak için 18S rDNA geninin ASA.S1 bölgesi JDP1 and JDP2 primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılıp dizi analizi yapılmıştır. Sekiz suştan altısının T5 genotipine, birinin T4 genotipe, diğerin ise T11 genotipine ait olduğu bulunmuştur (Maschio ve ark., 2015).

Bu çalışmada JDP1-JDP2 primerleri kullanılarak yapılan özgünlük deneyinde (Şekil 4.1) hedef DNA olan *Acanthamoeba* spp. 18S rDNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. Ancak aynı primerlerle hedef DNA olarak seçilmeyen *C. parvum*, *T. gondii*, *G. intestinalis*, *Babesia bovis*, *Blastocystis hominis* DNA'ları çoğaltılamamıştır. Böylece JDP1-JDP2 primerlerinin sadece *Acanthamoeba* cinsine özgü primer setleri olduğu bir kez daha

doğrulanmıştır. Çalışmada kullanılan PZR koşullarının da optimizasyonu bu şekilde sağlanmıştır.

Belçika'daki enerji santrallerinden gelen soğutma sularında serbest yaşayan amiplerin varlığını tespit etmek için yapılan bir araştırmada *Acanthamoeba*'yı tespit etmek için JDP1-JDP2 primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır (Behets ve ark., 2007). Japonya, Osaka'daki musluk suyu kaynaklarından potansiyel olarak patojenik *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türlerinin izolasyonu ve genotiplendirilmesi Edagawa ve ark., (2009) tarafından yapılmıştır. Araştırma alanından alınan su örneklerinin %70 oranında *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türleri ile bulaşlı olduğu gözlenmiştir. Morfolojik olarak Acanthamoebidae olarak tanımlanan 152 izolattan 74'ü, 18S rRNA geninin PZR amplifikasyonu (JDP1-JDP2 primerleri) ile pozitif iken 42°C'de izole edilen 11 örnek pozitif sonuç vermemiştir. Yetmiş dört pozitif örneğin 55'inin sekans analizi sonucunda %94–99 oranında *Acanthamoeba* spp. olduğu tespit edilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda sekansı alınan örneklerin T3, T4, T5 ve T13 genotiplerine sahip olduğu görülmüştür (Edagawa ve ark., 2009).

Slovakya'nın Bratislava bölgesindeki farklı su kaynaklarından ve klima ünitelerinden alınan örneklerde *Acanthamoeba* varlığı morfolojik, fizyolojik, moleküler ve filogenetik karakterizasyonla gösterilmiştir. *Acanthamoeba* izolatlarının tanımlanmasında, kistlerin ve trofozoitlerin morfolojisi, cinse özgü primerler olan JDP1 ve JDP2 kullanılarak yapılan PZR amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. *Acanthamoeba* türlerinin patojenik potansiyeli, Vero hücre kültürleri üzerinde in vitro test edilmiş, genotip tanımlaması için 18S rDNA'nın GTSA.B1 gen bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen verilere göre, çalışılan örneklerin T3 ve T4 genotiplerine ait olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın *Acanthamoeba*'nın çevresel dağılımını gösteren ilk rapor olduğu vurgulanmıştır. Schroeder ve ark. (2001) dizayn ettiği JDP1 and JDP2 primerlerinin çoğalttığı 18S rDNA gen bölgesi ASA.S1, sadece korneal sıyrıklar ve AK tanısı için değil aynı zamanda herhangi çevresel örneklerdeki genotipleri belirlemek için de çok uygundur. Ancak T3, T4, T11 gibi bir kümenin birbirine çok yakın üyeleri arasında güvenilir bir ayırım yapmak ve tek tek genotiplerin belirlenmesi için CRN5 ve 1137 primerler ile çoğaltılan genotipe özgü GTSA.B1 18S rDNA gen bölgesi verileri kullanılmıştır (Nagyova ve ark., 2010).

Dünyada en yaygın bulunan *Acanthamoeba* genotipinin T4 olduğu birden fazla çalışmada belirtilmiştir (Walochnik ve ark., 2000b; Schroeder ve ark., 2001; Ledee ve ark., 2003; Booton ve ark., 2005, De Jonckheere 2007). GAE ve AK olmayan diğer enfeksiyonlarda da en baskın olan T4 genotipini sırasıyla T1, T10, T12 (Booton ve ark., 2005), T5 (Barete ve ark., 2007) ve T2 (Walochnik ve ark., 2008) genotipleri takip etmiştir. T4 genotipi AK'te de en yaygın genotiptir (Gast ve ark., 1996; Walochnik ve ark., 2008). Bununla birlikte, T3 (Ledee ve ark., 1996; Stothard ve ark., 1998), T5 (Spanakos ve ark., 2006; Ledee ve ark., 2009), T6 (Walochnik ve arkadaşları 2000a), T11 (Khan ve arkadaşları 2002), T15 (Di Cave ve ark., 2009) gibi diğer genotiplerin de bilinen birkaç göz enfeksiyonu vakasına neden olduğu bildirilmiştir (Nagyova ve ark., 2010).

İran'ın geniş bir alanı olan Gilan bölgesindeki doğal (nehirler, göller, lagünler) ve tatlı su kaynakları dahil olmak üzere toplam 27 yüzey suyu örneği toplanmıştır. Bu örneklerde serbest yaşayan *Acanthamoeba*'nın yaygınlığını belirlemek için su örneklerini analiz edilmiştir. Önce örnekler filtre edilmiş daha sonra *Escherichia coli* ekilmiş besleyici olmayan agar plakalarına transfer edilmişlerdir. Yeterli süre inkübe edilen örnekler uygun şekilde toplanarak DNA ekstraksiyonu, PZR ile teşhis edilmiştir. Yirmi yedi örnekten toplam 19'u (%70.3) *Acanthamoeba* türleri için morfolojik olarak pozitif olup bunların 14'ü (%73.7) JDP1 ve JDP2 primerleri kullanılarak yapılan PZR yöntemiyle doğrulanmıştır. Yine Mahmoudi ve ark. (2015) tarafından İran'da Guilan, Mazandaran (İran'ın kuzeyinde), Alborz ve Tahran (başkent) gibi dört vilayetten alınan 49 yüzey suyu örneğinde serbest yaşayan amipleri (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* ve *Saccamoeba limax*) moleküler tekniklerle saptanmıştır. JDP1 ve JDP2 primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda 49 örneğin 18'inde *Acanthamoeba* türlerine rastlanmıştır. Sekans analizi sonucunda 16 örneğin T4 genotipine, iki örneğinde T5 genotipine ait olduğu tespit edilmiştir. Niyyati ve ark. (2009); Rahdar ve ark. (2012) tarafından daha önce İran'da akarsular, durgun sular ve toprak gibi çevresel örneklerde T2, T4 ve T6 genotipleri bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise Samsun ilinden alınan 37 farklı istasyondan toplam 192 çevresel su örneğinin 98'inde (%51) *Acanthamoeba* türlerine rastlanmıştır. Toplamda 98 örneğin 85'i T4 genotipine, 3 örneğinde T5 genotipine ait olduğu bulunmuştur. Bu noktada çalışmanın daha önce dünyada en yaygın bulunan *Acanthamoeba* genotipinin T4

olduğunu bildiren çalışmalarla (Walochnik ve ark., 2000b; Schroeder ve ark., 2001; Ledee ve ark., 2003; Booton ve ark., 2005, De Jonckheere 2007) benzerlik göstermiştir. Aynı zamanda belirlenen *Acanthamoeba* genotiplerinin T4 ve T5 genotiplerine ait olması Mahmoudi ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmaya da benzerlik göstermiştir. Yine 2015 yılında Macaristan'da 20 halk havuzunda 9 *Acanthamoeba* pozitif örneğin 7'si T4, 2'si T15 genotipinde (Kiss ve ark., 2014), Pakistanda su ve toprak örneklerinde T4 ve T15 genotipleri (Tanveer ve ark., 2015), Tayvan'da yapılan çalışmada T4 and T2 genotipi (Kao ve ark., 2015) baskın genotipler olarak bulunmuştur. Daha sonraki yıllarda, Kuzey doğu Tayland'ta doğal su kaynaklarından alınan örneklerin 7'sinin T4, 1'inin T3 ve 2'sinin T5 (Thammaratana ve ark., 2016), Uganda'da çevresel ve musluk sularından alınan örneklerde T1, T2, T4, T5, T6 ve T11 (Sente ve ark., 2016), Mısır'da çevresel sulardan alınan örneklerde T4, T3 (Tawfeek ve ark., 2016), Tunus'ta hastaneden alınan (cerrahi servisler, yoğun bakım ünitesi, ameliyathane ve su deposundaki tanklar) sularda T4, T10 ve T11, Çin'in Yanji bölgesinden alınan musluk suyu ve toprak örneklerinden T4, T5 ve T16 (Xuan ve ark., 2017) genotiplerine rastlanmıştır.

Dünyada *Acanthamoeba* keratitin çoğunun 18S rRNA dizileme sonuçlarına göre T4 genotipinde olduğu belirlenmiştir (Booton ve ark., 2009; Visvesvara ve ark., 2007; Grün ve ark., 2014). Türkiye'de *Acanthamoeba*'ya bağlı birçok *Acanthamoeba* keratiti vakası bildirilmiştir. Birinci AK olgusu Akyol ve ark. (1996), ikinci olgu ise Akisu ve ark. (1999) tarafından genotiplendirme çalışması yapılmadan bildirilmiştir. Demirci ve ark. (2006) beş yaşındaki erkek çocuktan aldıkları göz sürüntüsü örneğinde genotiplendirme yapmadan *Acanthamoeba* spp.'nin varlığını göstermişlerdir. Kontakt lensi olmayan bir olgudan genotiplendirme yapılarak *A. castellanii* (T4) saptanmıştır (Ertabaklar ve ark., 2007). Bunu takiben Özkoç ve ark. (2008) kontakt lensi olmayan ancak küçük bir travma öyküsüne sahip bir olguda *Acanthamoeba castellanii* T4 genotipini saptadıklarını bildirmişlerdir. Ertabaklar ve ark. (2009) kontakt lens kullanan, gözlerinde kızarıklık, bulanık görme, batma ve yanma şikayetlerine sahip 23 yaşındaki bir olguda *A. castellanii* (T4 genotipi) olduğunu bildirmişlerdir. Yünlü (2015) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 500 kişiden aldığı göz kapağı sürüntü örneğinde serbest yaşayan amiplerin varlığını araştırmıştır. Örneklerden birinde *Acanthamoeba* spp. (%0.2), birinde ise *Hartmannella* spp. (%0.2) olduğunu

bildirilmiştir. Kılıç ve ark. (2004) Ankara’da yaptıkları bir çalışmada çevresel kaynaklardan alınan örneklerde T2, T3, T4, T7 genotipinde *Acanthamoeba* türlerinin varlığını belirtmişlerdir. Ertabaklar ve ark. (2007) İzmir ilinde çeşme suyunda T4, lens saklama kabından ise T9 genotipini göstermişlerdir. Yünlü (2015) tarafından 24 farklı klima sistemlerinden elde edilen örneklerin 18’inde serbest yaşayan amip pozitif bulunmuştur. Bunların 4’ünün *Acanthamoeba* spp., 4’ünün *Naegleria* spp., ve 10’nun da *Hartmannella* spp., olduğu gösterilmiştir.

Türkiye’de yapılan tüm çalışmalar değişik kaynaklardan (su, klima göz sürüntüleri vb. gibi) farklı genotiplerde *Acanthamoeba* türlerine rastlanıldığını göstermektedir. *Acanthamoeba* türlerinin epidemiyolojisi, tür ayrımlarının yapılması, patojenliklerinin belirlenmesi ve patojen türlerinin dağılımı için genotiplendirme çalışmalarına ağırlık verilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Ertabaklar ve ark., 2009; Yünlü ve ark., 2015). Bu noktada sunulan çalışmanın çevresel su örneklerinde *Acanthamoeba* türlerinin dağılımını gösteren Karadeniz Bölgesi’ndeki ilk genotiplendirme çalışması olarak bu alandaki boşluğu doldurmak adına oldukça önemlidir.

Daha önce *A. castellanii*’nin (T4 genotipi) Özkoç ve ark. (2008); Ertabaklar ve ark. (2009) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada belirlenen T4 genotipi ise Haplotip I (*Acanthamoeba triangularis*-AF316547; %5.1), Haplotip II (*Acanthamoeba polyphaga*-AF019051; %29.6), Haplotip III’e (*Acanthamoeba* sp.EU168069; %62.24) aittir.

Acanthamoeba kistlerinin toprak, yüzey suları ve durgun sular gibi çevresel kaynaklardan izole edilmesi, bu çevresel kaynakların bu amipin insanlara ve diğer memelilere iletilmesi için potansiyel öneme sahip olduğunu göstermiştir (Shin ve Im 2004; Edagawa ve ark., 2009, Lass ve ark., 2014). Suda, toprakta ve diğer çevresel örneklerde yüksek oranda *Acanthamoeba* spp., özellikle bağışıklık yetersizliği olan ve kontakt lens kullanan kişiler için halk sağlığı açısından önemli bir risktir (Lorenzo-Morales ve ark., 2015).

Acanthamoeba’nın insanlarda hastalık oluşturan farklı bakterilerle beraber bulunması bu patojenler için rezerv görevi yaptığı ve patojenin sağkalımını arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır (Cabral ve Cabral, 2003).

Dünya çapında bir sağlık sorunu olup su yoluyla bulaşabilen koleranın etkeni, *V. cholerae* ve serbest yaşayan *Acanthamoeba* türleri içme suları su dahil birçok ortamlarında bulunurlar. *Acanthamoebae*'nin bakteriyel büyümeyi ve sağkalımı desteklediği gösterilmiştir. Aynı zamanda *Acanthamoeba* türlerinin bakterileri klorinasyon, antikorlar (Lipp ve ark., 2002) ve antibiyotiklerin etkilerinden koruduğu da tespit edilmiştir (Abd ve ark., 2005; Abd ve ark., 2007; Abd ve ark., 2009). Shanan ve ark., (2011) Sudan'daki farklı kolera endemik bölgelerinden topladıkları su örneklerinden PZR yöntemiyle hem *V. cholerae* hem de *Acanthamoeba* türlerini tespit etmişlerdir. Çalışmada *Acanthamoeba* türlerinin *V. cholerae* O1 ve O139'un büyümesini ve hayatta kalmasını arttırdığını vurgulanmıştır. *Acanthamoeba* enfeksiyonunun yaygınlığındaki artış son yıllarda acanthamobiasise karşı farkındalığın artmasına; HIV virüsü taşıyıcıları ve kanser hastaları gibi bağışıklık sistemini baskılayan tedavilerin her geçen gün daha fazla uygulanıyor olmasına bağlanmaktadır (Cabral ve Cabral, 2003; Yünlü ve ark., 2015).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada Samsun ilinden alınan su örneklerinde *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesi ilk defa yapılmıştır.

Samsun ilinde belirlenen 32 istasyondan (Samsun, Terme, Çarşamba, Tekkeköy, Bafra) alınan 192 su örneğinin 98'inde PZR ile *Acanthamoeba* spp'nin varlığı tespit edilmiştir. İstasyonlar arasında Terme ilçesindeki sulara en yüksek oranda (%64.4) *Acanthamoeba* türleri ile bulaşlı olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Samsun merkez (%41.7), Çarşamba (%40), Tekkeköy (%38.9) ve Bafra (%33.3) ilçeleri takip etmiştir.

Sekans analizi sonucunda pozitif su örneklerinin 5'i (%5) Haplotip I (*A. triangularis*), 29'u (%29.6) Haplotip II (*A. polyphaga*), 61'i (%62) Haplotip III (*Acanthamoeba* sp.) ve 3'ü (%3) Haplotip IV olarak belirlenmiştir. Tüm istasyonlar bir arada değerlendirildiğinde araştırma alanında en yaygın *Acanthamoeba* genotipinin T4 (*Acanthamoeba* sp., *A. polyphaga*, *A. triangularis*) olduğu ve %3 oranında olsada T5 genotipine de rastlanıldığı belirlenmiştir.

Dünyada *Acanthamoeba* keratiti en çok T4 genotipinden kaynaklanmaktadır. Çalışmada araştırılan sulara en fazla T4 genotipine rastlanması AK'nin bölgede yaşayan ve buradaki sularla temas halinde olan insanlar ve hayvanlar için risk oluşturabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Acanthamoeba türlerinin yüzey suları, termal sular, deniz suyu, toprak, hava, besinler, içme suları, ambalajlı kaynak suları, distile sular, klorlu yüzme havuzu suları, kontakt lens saklama kapları ve solüsyonları gibi geniş bir alanda bulunması bu etkenin hızla yayılmasına neden olabilir. Bu nedenle gerek çevresel kaynaklardan gerekse klinik örneklerden *Acanthamoeba* spp'nin hızlı ve güvenilir bir yöntemle belirlenmeleri, AK teşhisi ve tedavisi için son derece önemlidir.

Yapılan genotiplendirme çalışmaları enfeksiyona neden olan *Acanthamoeba* spp'nin beyin ve göz gibi farklı organlara yerleşmesindeki özgünlüğü ve türlerin patojenitesi arasında farklılıkların olup olmadığı gibi sorulara cevap aramaktadır. Bu noktada çalışmamızda çevresel kaynaklardan izole edilen *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesi ile bölgedeki AK teşhisi için önemli bir yol alınabileceği düşünülmektedir. T4 ve T5 genotiplerinin herikisi de gözde meydana gelen enfeksiyonlardan sorumlu olan genotiplerdir. Çalışılan bölgede bu genotiplere

rastlanılması özellikle bağışıklık sitemini baskılayan hastalıklara sahip olanların, kontakt lens kullanan bireylerin ve hatta herhangi bir hastalığı olmayan bireylerin de bu sularla teması sırasında oldukça dikkat etmeleri önerilebilir.

Acanthamoeba enfeksiyonları için (GAE, AK, Kutanöz *Acanthamoebiasis*) etkili ve kontrol altına almaya yönelik tedavilerin olmaması nedeniyle enfeksiyon ağırlı ve acılı seyretmektedir. Özellikle dayanıklı kistlerin tedavi sonrasında tekrar enfeksiyonlara neden olması hastalığın devam etmesini ve tehlikenin boyutunu arttırmaktadır. *Acanthamoeba* bakterilerin taşınması için konak olarak görev yaparak bakterilerin neden olduğu hastalıkların riskini de arttırmaktadır. Bu bakteriler arasında insanlar için patojen olan *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli* O157 ve *V. cholerae* gibi önemli bakteriyel etkenler bulunmaktadır. Buna göre, bakteriyel hastalıkların yayılma riskini azaltmak için de etkili bir şekilde hem *Acanthamoeba* hem de bakterinin tespiti ve kontrol altına alınması gerekmektedir.

AK'nin en önemli nedenlerinden biri olan kontakt lenslerin uzmanlık alanı olmayan pek çok kişi tarafından satışının mümkün olması ve bunu kullanan insanların risk faktörlerini bilmemesi hastalığın yayılmasına neden olabilir. Bu noktada sağlık otoriteleri ve çalışanlarının *Acanthamoeba* patogenezi ve bu parazitten kaynaklı oküler riskleri göz önünde bulundurarak halkı ve özellikle kozmetik amaçlı lens kullananları bilinçlendirmeleri gerekmektedir.

Çalışmada araştırma yapılan alandaki yüzey sularının denize karışması, bu suların aynı zamanda tarımda ve hayvancılıkta kullanılması tespit edilen *Acanthamoeba* türlerinin bölgedeki önemini vurgulamaktadır. Hem yüzey suları hem rekreasyonel sular ve kaplıcalar pek çok insan tarafından kullanıldığı için potansiyel su kaynaklı patojenler hakkında halk uyarılmalı ve bu alanlarda periyodik olarak patojenlerin izlemesi gerekmektedir.

Sonuçlarımız AK vakalarıyla ilişkili olduğuna inanılan T4 genotipine ait *Acanthamoeba* suşlarının, Samsun ilinde incelenen yüzey suyu örneklerinde bulunduğu dair kanıt sağlamaktadır. Karadeniz bölgesinde daha önce hiç çalışılmayan farklı istasyonlarda daha fazla sayıda su örneklerinde de *Acanthamoeba* suşlarının çeşitliliği, bunların prevalansı, genotiplendirilmesi ve patojenik potansiyeli ile ilgili çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKÇA

- Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., & Sandstrom, G. (2009). *Vibrio cholerae* requires neither capsule nor LPS O side chain to grow inside *Acanthamoeba castellanii*. *J Med Microbiol*, 58, 125-131.
- Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G. B., & Sandstrom, G. (2007). *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol*, 60(1), 33-39.
- Abd, H., Weintraub, A., & Sandstrom, G. (2005). Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ Microbiol*, 7(7), 1003-1008.
- Abduz, A., Abdul, A., Pakrashi, S., & Ghosh, D. (2012). Experimental parasitology evaluation of antileishmanial activity of South Indian medicinal plants against *Leishmania donovani*. *Experimental Parasitol*, 132(2), 180-4.
- Aghajani, A., Dabirzadeh, M., Maroufi, Y., & Hooshyar, H. (2016). Identification of *Acanthamoeba* genotypes in pools and stagnant water in ponds in sistan region in Southeast Iran. *Türkiye Parazitoloji Derneği*, 40, 132-6.
- Akın Polat, Z., Özçelik, S., Vural A., & Saygı, G. (2007). Akselik Kültürlerde *Acanthamoeba* Trofozoitleri Üzerindeki Gözlemler ve Bunların Farklı Boyalarla Boyanma Özellikleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(1), 7-13.
- Akın, M., & Akın, G. (2007). Suyun önemi, Türkiye’de su potansiyeli su havzaları ve su kirliliği. *Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi*, 47(2), 105-118.
- Akısü, Ç., Baka, M., Durak, I., & Orhan, V. (1999). A case of *Acanthamoeba* keratitis; light and electron microscope findings. *Acta Parasitol Turc*, 23, 340-42.
- Akyol, N., Aşçı, Z., & Kükner, S. (1996). *Acanthamoeba* keratitis: The first reported case from Turkey. *Ophthalmic Practice*, 2, 46-48.
- Akyurt, M., Al-Rabghi, O. M., Najjar, Y. S. H., & Alp, T. (1993). Heat Exchangers for Waste-Heat Recovery. *Energy & Environment*, 4(3), 284-306.
- Al-Herrawy, A. Z., Heshmat, M., Abu Kabsha, S. H., Gad, M. A. & Lotfy, W. N. (2017). Occurrence of *Acanthamoeba* species in the Damanhour Drinking Water Treatment Plant, Behera Governorate (Egypt). *Reports in Parasitology*, 4,15-21, doi:10.2147/ RIP.S85106.
- Alotaibi, M. A. (2011). Interaction of Free-living protozoa with water-borne human pathogenic viruses and protection from disinfection. Yüksek Lisans Tezi, Leicester Üniversitesi, İngiltere.
- Altıntaş, K. (2005). Tıbbi Genel Parazitoloji Ve Protozooloji kitabı. Eskicim Kitapevi.
- Alves, J. M., Gusmao, C. X., Teixeira, M. M., Freitas, D., Foronda, A., & Affonso, H. T. (2000). Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the

- characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Braz J Med Biol Research*, 33, 19–26.
- Anisah, N., Amal, H., Kamel, A. G., Yusof, S., Noraina, A. R., & Norhayati, M. (2005). Isolation of *Acanthamoeba* spp. from conjunctival sac of healthy individuals using swab. *Tropical Biomedicine*, 22, 11-4.
- Anonim. (2016a). Suyun Önemi. <http://www.suadasu.com/suyun-onemi-29s.html> (Erişim tarihi: 26.12.2016).
- Anonim. (2016b). DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>-(Erişim tarihi: 01.03.2017).
- Anonim. (2017a). Granülomatöz Amibik Ensefalite. https://en.wikipedia.org/wiki/Granulomatous_amoebic_encephalitis (Erişim Tarihi: 21.04.2017).
- Anonim. (2017b). Parazitler- *Acanthamoeba* - Granülomatöz Amibik Ensefalite (GAE); Keratitis. <https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/epi.html>. (Erişim tarihi: 18.04.2017).
- Aydın, E. (2008). Bazı *Salvia* genusu üyelerinin *Acanthamoeba castellanii* tedavisindeki kullanım potansiyelleri ve sitotoksik aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas.
- Barete, S., Combes, A., De Jonckheere, J. F., Datry, A., Varnous, S., Martinez, V., Ptacek, S. G. Caumes, E., Capron, F., Francès, C., Gibert, C., & Chosidow, O. (2007). Fatal Disseminated *Acanthamoeba lenticulata* Infection in a Heart Transplant Patient. *Emerging Infectious Diseases*, www.cdc.gov/eid, 13, 5.
- Barker, J., & Brown, M. R. (1994). Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 140, 1253–1259.
- Başbüyük, M. (1992). Göksu Deltası Su Kirlilik Düzeyi ve Su Kalitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Beattie, T. K., & Tomlinson, A. (2009). The effect of surface treatment of silicone hydrogel contact lenses on the attachment of *Acanthamoeba castellanii* trophozoites. *Eye Contact Lens*, 35, 316–319.
- Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Verelst, L., & Ollevier, F. (2007). Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol Research*, 100, 1249–1256.
- Berberoğlu, U., & Güngör, Ç. (2013). Yüzey suyu ve sulama amaçlı atık sularda fekal kirlilik düzeyleri ile helmint yumurta ve protozoa kistlerinin araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70(4), 191 – 200.

- Berk, S. G., Gunderson, J. H., & Newsome, A. L. (2006). Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol*, 40, 7440-7444.
- Booton, G. C., Kelly, D. J., Chu, Y. W., Seal, D. V., Houang, E., Lam, D. S., Byers, T. J., & Fuerst, P. A. (2002). 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol*, 40, 1621-1625.
- Booton, G. C., Visvesvara, G. S., Byers, T. J., Kelly, D. J., & Fuerst, P. A. (2005). Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol*, 43, 1689-1693.
- Booton, G., Joslin, C., & Shoff, M. (2009). Genotype identification of *Acanthamoeba* sp. Isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, 28:673-6.
- Cabral, F. M., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* ssp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviewe*. 273-307.
- Carnt, N. (2016). Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*, 123(5), 984-990.
- Çetin, M. (2011). Çevre ve Su Kirliliğinde Makine Yağları, Çevre Etkileri ve Çözüm Önerileri. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4 (1), 41-47.
- Chappell, C. L., Wright, J. A., Coletta, M., & Newsome, A. L. (2001). Standardized method of measuring *Acanthamoeba* in sera from healthy human subjects. *Clin Diag Lab Immunol*, 8, 724–730.
- Chawla, A., Armstrong, M., & Carley, F. (2014). *Acanthamoeba* keratitis an increasing incidence. *Contact Lens Anterior Eye*, (37): 120.
- Cheung, N., Nagra, P., & Hammersmith, K. (2016). Emerging trends in contact lensrelated infections. *Current Opinion Ophthalmology*, 27(4):32-327.
- Chu, D.M., Miles, H., Toney, D., & Ngyuen, C. (1998). Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitol Research*, 84(9), 746–774.
- Çivi, S., Marakoğlu, K., & Bitirgen, M. (2006). Su ile Bulaşması Muhtemel Enfeksiyon Hastalıklarının Epidemiyolojisi ve Maliyet Analizi. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 10(3), 111-116.
- Çolakoğlu, E. (2009). Ortak bir değer olarak su ve su etiği. *Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 5(9), 109–116.

- Corsaro, D., & Venditti, D. (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Research*, 107, 233–238
- Critchley, M., & Bentham, R. (2009). The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. *J Appl Microbiol*, 106, 784-789.
- Dağlı, H. (2005). İçme suyu Kalitesi ve İnsan Sağlığına Etkileri, Bizim İller Bankası, Aylık Yayın Organı. 3, 16-21.
- De Almeida, I., Alviano, D. S., Vieira, D. P., & Alves, P. B. (2007). Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol Res*, 101(2), 443-52.
- De Jonckheere, J. F. (2007). Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona. *Eur J Protistol*, 43, 9–15.
- De Jonckheere, J. F., & Michel, R. (1988). Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol Research*, 74, 314-316.
- Delioğlu, B. K. (2012). Yeşilırmak Ve Tersakan Çayı (Samsun-Amasya)'Ndan Alınan Yüzeysel Su Örneklerinde *Cryptosporidium Parvum*'un LAMP Tekniği İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.
- Demirci, G., Ay, G. M., Karabas, L. V., Altintas, O., Tamer, G. S. & Çağlar, Y. (2006). *Acanthamoeba* keratitis in a 5-years- old boy with out a history of contact lens wearer in Turkey. *Parasitol Research*, 100, 241-46.
- Di Cave, D., Monno, R., Bottalico, P., Guerriero, S., D'Amelio, S., & D'Orazi, C. (2009). *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28, 607–612.
- Doğan, S., Yazar, S., & Kuk, S. (2013). Toprakta serbest yaşayan ve insanda parazitlenebilen bazı amiplerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 23, 187-191.
- Dykova, I., Lom, J., Schroeder-Diedrich, J. M., Booton, G. C., & Byers, T. J. (1999). *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Journal of Parasitology*, 85, 1106-1113.
- Edagawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Kusuhara, Y., & Karanis, P. (2009). Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Research*, 105:1109–1117.

- El-Sayed, N. M., Ismail, K. A., Ahmed, S. A., & Hetta, M. H. (2012). In vitro amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancreaticum maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitol Research*, 110, 1985–92.
- Ergüden, C. (2015). Uçucu Yağların *Acanthamoeba* Spp. Kist Ve Trofozoitleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ertabaklar, H., Dayanır, V., Apaydın, P., Ertuğ, S., & Walochnik, J. (2009). *Acanthamoeba keratiti*. *Türk Parazitolojisi Dergisi*, 33, 283-85.
- Ertabaklar, H., Türk, M., Dayanır, V., Ertuğ, S., & Walochnik, J. (2007). *Acanthamoeba keratitis* due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Research*, 100, 241–6.
- Fallah, E., Jafarpour, Z., Mahami-Oskouei, M., Haghghi, A., Niyatti, M., Spotin, A., & Khesri, A. (2017). Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolates from surface resting waters in Northwest Iran. *Iran J Parasitol*, 12(3), 355-363.
- Ford, T. E. (1999). Microbiological Safety of Drinking Water: United States and Global Perspectives. *Environ. Health Perspect*, 107, 191-206.
- Fuerst, P. A., Booton, G. C., & Crary, M. (2015). Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), 69–84.
- Gardiner, P. (2000). Peppermint (*Mentha piperita*). Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research, 1–22.
- Gast, R.J., Ledee, D.R., Fuerst, P.A., Byers, T.J. (1996). Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(6), 498–504.
- Geisen, S., Fiore-Donno A.M., Walochnik, J., & Bonkowski, M. (2014). *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitol Research*, 113, 3151–3158, DOI 10.1007/s00436-014-3976-8.
- Gökpınar, S. & Aydenizöz, M. (2010). Göze yerleşen protozoonlar ve artropodlar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34(2), 137-144.
- Gray, T. B., Cursons, R. T. M., Sherwan, J. F., & Rose, P. R. (1995). *Acanthamoeba*, bacterial and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br J Ophthalmol*, 79, 601-605.
- Greub, G., & Raoult D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17:413–433

- Grün, A. L., Stemplewitz, B., & Scheid, P. (2014). First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. *Parasitol Research*, 113, 2395–2400.
- Gülabi, B.B. (2016). Samsun İlinden Alınan Su Örneklerinde Blastocystis Türlerinin Moleküler Teknikler Kullanılarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuclear. Acids Symp*, 41, 95-98.
- Haller, L., Pote, J., Loizeau, J. l., & Wildi, W. (2008). Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. Elsevier Ltd. All Rights Reserved. doi:10.1016/j.ecolind.2008.08.001.
- Haviland, W.A. (2002). Kültürel Antropoloji (Çev: Hüsamettin İnaç, Seda Çiftçi). No: 143. Sosyoloji Serisi: 3. İstanbul: Kaktüs Yayınları.
- Hepsağ, E. (2003). Köyceğiz-Dalyan Lagün Havzası Su Kaynaklarının Su Kalitesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Hewett, M. K., Robinson, B. S., Monis, P. T. & Saint, C. P. (2003). Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool*, 42, 325–329.
- Horn, M., & Wagner, M. (2004). Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol*, 51, 509–514.
- Horn, M., Fritsche, T. R., Gautom, R. K., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the Paramecium caudatum symbiont Caedibacter caryophilus. *Environ Microbiol*, 1, 357–367
- Huang, S. W., & Hsu, B. M. (2010). Survey of Naegleria and its resisting bacteria— Legionella in hot spring water of Taiwan using molecular method. *Parasitology Research*, 106(6), 1395–1402.
- Illingworth, C. D., & Cook, S. D. (1998). *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmol*, 42, 493-508.
- İTASHY. (2014a). İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik 07.3.2013 Tarihli ve 28580 Sayılı Resmî Gazete, Ankara.
- İTASHY. (2014b). İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik 07.3.2013 Tarihli Ve 28580 Sayılı Resmî Gazete., Ankara.
- John, D. T. (1998). Opportunistic Amoebae. “Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections”. Edward Arnold Ltd. London. 5(3), 179-192.

- John, D. T. (2005). Opportunistic Amebae. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 40, 22-36.
- Jonathan, R., Sharon, R., William, M. D., Ritterband, D. C., Yoder, J. S., Ayers, T., Shah, R. D., Samper, M. E., Shih, C. Y., Schmitz, A. D. & Brown, A. (2014). Clinical characteristic of *Acanthamoeba* keratitis infections in 28 states, 2008 to 2011. *Cornea*, 33, 8-161.
- Kanber, P. (2007). Aydın ili Bazı Yeraltı ve Yerüstü Su Kaynaklarının Kirlilik Durumlarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Kao, P. M., Hsu, B. M., Hsu, T. K., Liu, J. H., Chang, H. Y., Ji, W. T., Tzeng, K. J., Huang, S. W., & Huang, Y. L. (2015). Seasonal distribution of potentially pathogenic *Acanthamoeba* species from drinking water reservoirs in Taiwan. *Environ Science Pollut Research*, 22(5), 3766-73.
- Kao, P. M., Hsu, B. M., Chen, N. H., Huang, K. H., Huang, C. C., Ji, D. D., Chen, J. S., Lin, W. C., Huang, S. W., & Chiu, Y. C. (2012). Molecular detection and comparison of *Acanthamoeba* genotypes in different functions of watersheds in Taiwan. *Environ Monit Assess*, 184, 4335-4344.
- Karakavuk, M., Akyurt, M., Şahar, E. A., Karakuş, M. Aldemir, D., Döndüren, Ö., Özdemir, H. G., Can, H., Gürüz, A. Y., Dağcı, H., & Döşkaya, M. (2017). First time identification of *Acanthamoeba* genotypes in the cornea samples of wild birds; Is *Acanthamoeba* keratitis making the predatory birds a target. *Experimental Parasitology*, 183, 137-142.
- Karanis, P., Sotiriadou, V., Kartashev, C., Kourenti, N., Tsvetkova, K. & Stojanova, K. (2006). Occurrence of Giardia and Cryptosporidium in Water Supplies of Russia and Bulgaria. *Enviromental Research*, 102, 260-71.
- Karaytuğ, T. (2015). Gediz Nehri'ndeki Su Kirliliğinin *Daphnia magna* Toksikite Testleri Kullanılarak Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kayıkçı, S. (2015). Akkaya Barajı Havzasındaki Su Kirliliğinin Havza Yönetimi Yaklaşımıyla Değerlendirilmesi. Yüksek Lisan Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde.
- Kaynak, B. (2017). *Ornithogalum sigmoideum* ve *Trachystemon orientalis'* in *Acanthamoeba castellanii* Kistleri Ve Trofozoitleri Üzerine İn Vitro Amoebisidal Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ordu.
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health, FEMS. *Microbiol Rev*, 30(4), 564-95.

- Khan, N. A., Jarroll, E. L. & Paget, T. A. (2001). *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr Microbiol*, 43, 204–208.
- Khan, N. A., Naveed, A., & Timothy, A. P. (2002). Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 44, 444-449.
- Kılıc, A., Tanyuksel, M., & Sissons, J. (2004). Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4, and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol*, 49, 246–252.
- Kim, K. S., Mathers, W. D., Alexandrakis, G., Sutphin, J. E., & Wiles, C. D. (1997). Polymerase chain reaction for *Acanthamoeba* keratitis, primer selection and inhibitory factors. *Investig. Ophthalmol. Viciol Science*, 38(2), 5016
- Kiss, C., Barna, Z., Vargha, M., & Török, J. K. (2014). Incidence and molecular diversity of *Acanthamoeba* species isolated from public baths in Hungary. *Parasitol Research*, 113, 2551–2557.
- Kobayashi, T., Higuchi-Watanabe, N., Shiraishi, A., Uno, T., & Ohashi, Y. (2015). Miraflow, soft contact lens cleaner: activity against *Acanthamoeba* spp. *Eye Contact Lens*, 41, 4-240.
- Kong, H. H., Kim, T. H., & Chung, D. I. (2000). Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba* healyi isolated from GAE. *Journal of Parasitology*, 86, 12-17.
- Kong, H. H., Shin, J. Y., Yu, H. S., Kim, J., Hahn, T. W., Hahn, Y. H., & Chung, D. I. (2002). Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) and 18S small-subunit ribosomal DNAPCR-RFLP analyses of *Acanthamoeba* isolated from contact lens storage cases of residents in Southwestern Korea. *J Clin Microbiol*, 40, 1199–1206
- Kuk, S., Yazer, S., & Doğan, S. (2013). Toprakta serbest yaşayan ve insanda parazitlenebilen bazı amiplerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 23, 187-191.
- Larkin, D. F. P., & Easty, D. L. (1990). Experimental *Acanthamoeba* keratitis: I. Preliminary findings. *Br J Ophthalmol*, 74, 551-555.
- Lass, A., Szostakowska, B., Idzińska, A. & Chomicz, L. (2014). The first genotype determination of *Acanthamoeba* potential threat to human health, isolated from natural water reservoirs in Poland. *Parasitol Research*, 113:2693–2699.
- Ledee, D. R., Hay, J., Byers, T. J., Seal, D. V., & Kirkness, C. M. (1996). *Acanthamoeba griffini* Molecular characterization of a new corneal pathogen. *Invest Ophthalmol Viciol Science*, 37(4), 544–50.

- Ledee, D. R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., & Fell, J. (2009). Molecular identification of T4 and T5 genotypes in *Acanthamoeba* keratitis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 1485–1462.
- Ledee, D. R., Vooton, G. C., & Awwad M. H. (2003). Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Invest Ophthalmol Viciol Science*, 44, 1142-9.
- Lehmann, M. O., Green, S. M., Morlet, N., Keys, M. F., Matheson, M. M., Dart, J. K. G., McGill, J. I., & Watt. P. J. (1998). Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Investig. Ophthalmol. Viciol Science*, 39, 1261–1265.
- Lipp, E. K., Huq, A. & Colwell, R. R. (2002). Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin Microbiol Rev*, 15(4):757-770.
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A. & Walochnik, J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment.
- Lorenzo-Morales, J., Lindo, J. F., Martinez, E., Calder, D., Figueruelo, E., Valladares, B. & Ortega-Rivas, A. (2005). Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann Trop Med Parasit*, 99, 751–758.
- Madencioğlu, D. (2014). Endemik *Dorystoechas hastata* boiss., heldr. ex bentham uçucu yağının bazı *Acanthamoeba* türleri üzerine amebisid etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İzmir.
- Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galván-Díaz, A. L., & Izquierdo, F. (2014). Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Research*, 113(8), 2845–50.
- Magnet, A., Galván, A. L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez Vadillo, C., Pérez-Irezábal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., Da Silva, A. J., & Del Aguila, C. (2012). Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Research*, 111, 383–392.
- Mahmoudi, M. R., Rahmati, B., Seyedpour, S. H. & Karanis P. (2015). Occurrence and molecular characterization of free-living amoeba species (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, and *Saccamoeba limax*) in various surface water resources of Iran. *Parasitol Research*, 114, 4669–4674.
- Mahmoudi, M. R., Taghipour, N., Eftekhar, M., Haghighi, A., & Karanis, P. (2012). Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitol Research*, 110, 473–477.

- Malatyali, E., Tepe, B., Degerli, S., Berk, S., & Akpulat, H. A. (2011). In vitro amoebicidal activity of four Peucedanum species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Research*, 110, 167–174.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 273-307.
- Markel, E. K., Voge, M., & Jhon, D. T. (1992). Medical parasitology. *WB Saunders Co Philadelphia*, (7), 22-96.
- Martinez, A. J., & Janitschke, K. (1985). *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infectio*, 13, 251-256.
- Maschio, V. J., Chies, F., Carlesso, A. M., Carvalho, A., Rosa, S. P., Van Der Sand, S. T., & Rott, M. B. (2015). *Acanthamoeba* T4, T5 and T11 isolated from mineral water bottles in southern Brazil. *Curr Microbiol.* 2015 Jan;70(1):6-9.
- Matsuzaki, Y., Kakinoki, Y., Nakamura, M., & Nishihara, T. (2014). Lamiaceae peppermint oil with surfactant showing equal antifungal activity against *Candida albicans* to rosemary chemotype CINEOL. *Advances in Infectious Diseases*, 4:58–65.
- Mattana, A., Biancu, G., Alberti, L., & Accardo A. (2004). In vitro evaluation of the effectiveness of the macrolide rokitamycin and chlorpromazine against *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(12), 4520–770.
- Mazur, T., & Hadaś, E. (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol*, 46(2), 106–8.
- Mitscherlich, G. (1995). Die Welt in der wir leben. Entstehung – Entwicklung, heutige Stand. Rombach Ökologie, Rombach Verlag, Freiburg.
- Nagyova, V., Nagy, A., Janecek, S., & Timko, J. (2010). Morphological, physiological, molecular and phylogenetic characterization of new environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from the region of Bratislava, Slovakia. *Biologia*, 65, 81–91, doi: 10.2478/s11756-009-0217-1.
- Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaie, S., Rahimi, F., Mohebbali, M., Maghsood, A. H., Motevalli-Haghi, A., Martín-Navarro, C. M., Farnia, S., Valladares, B., & Rezaeian, M. (2009). Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp Parasitol*, 121:242–245.
- Öksüz S. (2010). Türkiye’de Su Kirliliği İzleme Çalışmaları ve Avrupa Birliği ile Karşılaştırılması, Çevre ve Orman Uzmanlık Tezi, ÇOB, Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü, Ölçüm ve İzleme Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Olgun, E. (2010). Mogan Gölünün Azot ve Fosfor Kirliliği Açısından İncelenmesi, Çevre ve Orman Uzmanlık Tezi, ÇOB, Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü, Ölçüm ve İzleme Dairesi Başkanlığı, Ankara.

- Omana-Molina, M. A., Gonzalez-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., BernalEscobar, A., Duran-Diaz, A., Mendez-Cruz, A.R. & Martinez-Palomo, A. (2014). Silicone hydrogel contact lenses surface promote *Acanthamoeba castellanii* trophozoites adherence: qualitative and quantitative analysis. *Eye Contact Lens*, 40(3), 132-139.
- Özcel, M. A. (2007). Tıbbi Parazit Hastalıkları Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:22, S: 309-310.
- Özcel, M. A., Turgay, N., İnci, A. & Köroğlu, E. (2007). Tıbbi ve veteriner immunoparazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, s: 93-97.
- Özçelik, S., Coşkun, K. A., Yünlü, Ö., Alim, A. & Malatyalı, E. (2017). The prevalence, isolation and morfotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. *Türk Parazitol Dergisi*, 36: 198-203.
- Özkoç, S., Tuncay, S., Delibaş, S. B., Akisu, C., Ozbek, Z., Durak, I., & Walochnik J. (2008). Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* spp. from two clinical samples. *J Med Microbiol*, 57, 392-396.
- Pacella, E., Torre, G. L., Giusti, M., & Lombardi, A. M. (2013). Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Ophthalmol*, 7, 991-4.
- Page, F. C. (1991). Nackte Rhizopoda. In: D. Matthes (eds) Protozoenfauna, Band 2. G. Fischer, Stuttgart-New York, 297 pp.
- Page, M. A. & Mathers, W. D. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: a 12-yaer experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. *Journal of Ophthalmology. Parasitol Research*, 115(4), 1705-9.
- Polat, Z. A., Özçelik, S., Vural, A., & Saygı, G. (2007a). Aksenik kültürlerde *Acanthamoeba* trofozoitleri üzerindeki gözlemler ve bunların farklı boyalarla boyanma özellikleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(1), 7-13.
- Polat, Z. A., Tepe, B., & Vural, A. (2007b). In vitro effectiveness of Thymus sipyleus subsp. sipyleus var. sipyleus on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. *Parasitol Research*, 101(6), 1551–1555.
- Pussard, M., & Pons, R. (1977). Morphologi edelaparoiky stiqueet taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Proc National Acad Science USA*, 13:557–598.
- Radford, C. F., Lehmann, O. J., & Dart, J. K. G. (1998). *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England. *Br J Ophthalmol*, 82, 1387-1392.
- Rahdar, M., Niyayati, M., Salehi, M., Fegghi, M., Makvandi, M., Pourmehdi, M., & Farnia, S. (2012). Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in Ahvaz City, Khuzestan Province, Southern Iran. *Iran J Parasitol*, 7, 22–26.

- Reyes-Batlle, M., Cheridah D., Carmen, M., López-Arencibia, A., Cabello-Vilchez, A. F., Ana, C. G., Córdoba-Lanús, E. John, F. L., Valladares, B., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morale, J. (2014). Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Reseach*, 113, 1383–1388, DOI 10.1007/s00436-014-3778-z
- Rodriguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Crit Reveal Microbiol*, 20, 225-241.
- Saygı, G. & Polat, Z. (2003). Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitolar. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(3), 140-149.
- Saygı, G. (2002). Temel Tıbbi Parazitoloji. II. Baskı. Sf 45. Es-Form Ofset Ltd Şti. Sivas.
- Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A., & Byers, T. J. (2001). Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*, 39, 1903–1911.
- Schroeder, J. M., Booton, G. C., Hay, J., Niszl, I. A., Seal, D. V., Markus, M. B., Fuerst, P. A., & Byers, T. J. (2001). Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*, 39(5), 1903-11.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int Parasitol*, 34, 1001-1027.
- Seal, D. (2003). *Acanthamoeba* keratitis update- incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye Contact Lenses*, 17, 893-905.
- Sente, C., Erume, J., Naigaga, I., Magambo, P.K., Ochwo, S., Mulindwa, J., Namara, B. G., Charles, D. K., Sebyatika, G., Muwonge, K., & Ocaido, M. (2016). Occurrence and genetic characterisation of *Acanthamoeba* spp. from environmental and domestic water sources in Queen Elizabeth Protected Area, Uganda. *Parasites & Vectors*, 9, 127.
- Shanan, S., Abd, H., Hedenström, I., Saeed, A., & Sandström, G. (2011). Detection of *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba* species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan. *BMC Research Notes*, 4, 109.
- Shin, H. J., & Im, K. I. (2004). Pathogenic free-living amoebae in Korea. *Korean J Parasitol*, 42, 93–119.

- Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit & Vectors*, 5(1), 6.
- Society, T. R. (2014). Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order amoebida. *Philosophical transactions of the royal society*, 259, 435–76.
- Sönmez Tamer, G., & Manavay, G. (2003). Olgu sunumu: *Acanthamoeba* keratiti. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı. Konya. S: 224.
- Spanakos, G., Tzanetou, K., & Miltasakakis, D. (2006). Genotyping of pathogenic *Acanthamoeba* isolated from clinical samples in Greece: report of o isolate presenting T5 genotype. *Parasitol Intantional*, 55, 147-9.
- Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C. L., Fuerst, P. A. & Byers, T. J. (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Eukaryot Microbiol*, 45, 45–54.
- Tanveer, T., Hameed, A., Gul, A., & Matin, A. (2015). Quick survey for detection, identification and characterization of *Acanthamoeba* genotypes from some selected soil and water samples across Pakistan. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(2), 227–230.
- Tanveer, T., Hameed, A., Muazzam, A. G., Jung, S. Y., Gul, A., & Matin, A. (2013). Isolation and molecular characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotypes from diverse water resources including household drinking water from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Parasitol Research*, 112, 2925–2932.
- Taş, B., Candan, A. Y., Can, Ö. & Topkara, S. (2010). Ulugöl Ordu'nun Bazı Fiziko Kimyasal Özellikleri. *Journal of Fisheries Sciences*, 4(3), 254-263.
- Tawfeek, H., Magda, M., El-Sokkary, R., Mohamed, M., & Manar, G. (2016). Multidrug-resistant bacteria among patients with ventilator-associated pneumonia in an emergency intensive care unit, Egypt. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 22(12), 894-903.
- Terzi, G. (2005). Gıda kaynaklı protozoon enfeksiyonların insan sağlığı açısından önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(2), 47-55.
- Thammaratana, T., Laummaunwai, P., & Boonmars, T. (2016). Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from natural water sources in the northeastern part of Thailand.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4637-4680.

- Tombul, F. (2014). Uluslararası Antlaşmalar Çerçevesinde Meriç Havzasında Su Yönetimi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 15(2), 147 – 155.
- Toroğlu, E., Toroğlu, S., & Alaeddinoğlu, F. (2006). Aksu Çay'ında (Kahramanmaraş) Akarsu Kirliliği. *Coğrafi Bilimler Dergisi*, 4(1), 93-103.
- Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, M. S., & Muller, N. (2004). The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Research*, 92, 405–413.
- Valladares, M., Batlle, M. R., Carmen, M., Atteneri, M. N., Alexis, L. A., Carolina, D. G., Martínez, W. E., Carretero, J. E., Basilio, P., Valladares, J., & Lorenzo, M. (2015). Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Archives of Microbiology*, 197(5), 639–643.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic Free-Living Amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappina diploidea*. *FEMS Immunology Medicine Microbiology*, 50, 1-26.
- Vodkin, M. H., Howe, D. K., Visvesvara, G. S., & McLaughlin, G. L. (1992). Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J. Protozool*, 39, 378–385.
- Walochnik, J., Aichelburg, A., Assadian, O., Steuer, A., Visvesvara, G., & Vetter, N. (2008). Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virusnegative patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 338–340.
- Walochnik, J., Haller-Schober, E. M., Kölli, H., Picher, O., Obwaller, A., & Aspöck, H. (2000b). Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3932–3936.
- Walochnik, J., Obwaller, A. & Aspöck, H. (2000a). Correlations between morphological, molecular biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol*, 66(10), 4408-4413.
- Winck, M. A., Caumo, K., & Rott, M. B. (2011). Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol*, 63, 464–469.
- Xuan, Y., Shen, Y., Ge, Y., Yan, G., & Zheng, S. (2017). Isolation and identification of *Acanthamoeba* strains from soil and tap water in Yanji, China. *Environ Health Prev Medical*, 22(1), 58.
- Yakut, M., & Özden, A. (2008). Amip, Amebiasis ve İlişkili Hastalıklar. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara.

- Yaman, S. (2010). Çevre kirliliğinin tanımlanması. Gazi üniversitesi, <http://w3.gazi.edu.tr/web/alperal/cevre1.html>, (Erişim tarihi: 20.04.2018).
- Yang, Y. F., Matheson, M., Dart, J. K. G., & Cree, I. A. (2001). Persistence of *Acanthamoeba* antigen following *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*, 85(3), 277–280.
- Yanık, T., & Atamanalp, M. (2001). Balık Yetiştiriciliğinde Su Kirliliğine Giriş. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Erzurum.
- Yünlü, Ö., Özçelik, S., & Arıcı, M. K. (2015). Göz kapaklarından ve konjunktivadan alınan sürüntü örneklerinde *Acanthamoeba* ve diğer serbest yaşayan amiplerin araştırılması. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 39, 194-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İlknur KOYUN

Doğum Tarihi: 06.09.1992

Öğrenim Durumu: Lisans

İletişim Bilgileri: ilknurkoyunn@hotmail.com

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Atatürk Üniversitesi	2015
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Ordu Üniversitesi	2018

Alman Sertifika Bilgileri

- Pedagojik Formasyon Sertifikası (2015)
- ISO 9001:2015 KALİTE YÖNETİM SİSTEMİ Dünya Kalite Derneği - 05.2017
- ISO 14001:2015 Çevre Yönetim Sistemi Dünya Kalite Derneği - 05.2017
- ISO 22000:2015 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Dünya Kalite Derneği - 05.2017
- OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Dünya Kalite Derneği - 05.2017
- Stratejik Yönetim Dünya Kalite Derneği - 05.2017
- ISO 19011:2011 İç Denetçi Dünya Kalite Derneği - 05.2017

Yayınlar

1. Kolören Z, Taş B, Koyun İ. Occurrence of *Acanthamoeba* Species in Various Water Sources of Giresun in Black Sea, Turkey. Uluslararası Ekoloji Sempozyumu, 11-13 Mayıs 2017, Kayseri.
2. Kolören Z, Taş B, Kolören O, Koyun İ. Amoebicidal potential of *Cystoseira barbata* on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites. Uluslararası Ekoloji Sempozyumu, 11-13 Mayıs 2017, Kayseri.
3. Taş B, Kolören Z, Kolören O, Karaman Ü, Koyun İ. The amoebicidal effects of *Corallina officinalis* against *Acanthamoeba castellanii* trophozoites. Uluslararası Ekoloji Sempozyumu, 11-13 Mayıs 2017, Kayseri.
4. Kolören Z, Taş B, Kolören O, Koyun İ. In Vitro Amoebicidal Activity of Turkish *Ulva intestinalis* extract on *Acanthamoeba castellanii*. Uluslararası Ekoloji Sempozyumu, 11-13 Mayıs 2017, Kayseri.