

Türkiye'deki Sularda Serbest Yaşayan Potansiyel Patojen Amipler ve Patojenitelerinin İn Vivo Olarak Araştırılması*

Investigation of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae and Their In Vivo Pathogenicity in Water Supplies of Turkey

Süleyman YAZAR¹, Esra GÜRBÜZ¹, Mehmet Fatih SÖNMEZ², Ülfet ÇETİNKAYA³, Salih KUK¹

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Kayseri, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Histology-Embryology, Kayseri, Turkey.

³ Erciyes Üniversitesi, Halil Bayraktar Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Kayseri.

³ Erciyes University, Halil Bayraktar Vocational Health College, Kayseri, Turkey.

* Bu çalışma, TÜBİTAK (112S227 nolu proje) ve Erciyes Üniversitesi BAP (TDA-2014-5399 nolu proje) birimi tarafından desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 17.03.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.07.2016

ÖZ

Serbest yaşayan amipler (SYA) doğada, toprak ve sularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlar içerisinde hayvan ve insanlar için patojenite potansiyeli gösterenlere "serbest yaşayan potansiyel patojen amipler (SYPPA)" adı verilmektedir. SYPPA'nın özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde ölüme kadar varabilen klinik tablolara sebep olduğu bilinmektedir. İnsanlarda potansiyel patojen olduğu bilinen dört cins SYPPA (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Sappinia*) bulunmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'deki sularda SYPPA varlığının saptanması ve izole edilen amiplerin in vivo patojenitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Türkiye'nin farklı bölgelerinde (Kayseri, Bingöl, Erzurum, Elazığ, Kocaeli, Diyarbakır, İzmir) bulunan gölet, akarsu, çay ve kuyulardan alınan toplam 664 su örneği dahil edilmiştir. Örnekler ilk olarak monoksenik kültür ortamına ekilmiş ve hem mikroskopik olarak hem de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile SYA açısından değerlendirilmiştir. Pozitif olduğu belirlenen örnekler daha sonra aksenik kültür ortamına alınmış, mikroskopik olarak üremenin olduğu tespit edilen örnekler PCR ile çalışılmış ve pozitif izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Aksenik kültürden PCR ile pozitif bulunan örneklerle ait izolatların in vivo patojenitesi, immün sistemi sağlam olan ve olmayan (atimik) [BALB/c Rag2(-/-) gamma(c)(-/-)] BALB/c tipi farelere intranasal amip inokülasyonu sonrası 21. günde histopatolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Çalışmamızda, su örneklerinin 143'ü monoksenik kültürde, bu örneklerin de 41'i aksenik

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Süleyman Yazar, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039 Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 207 6666/2340, **E-posta (E-mail):** syazar@erciyes.edu.tr

kültürde pozitif bulunmuştur. Aksenik kültürde pozitif tespit edilen 41 örneğin 20'sinin üç aylık kültürü devam ettirilebilmiştir. SYA için ortak primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda, 20 örnekten sadece dokuz pozitif olarak tespit edilmiştir. Türe özgül primerler ile yapılan PCR sonucunda ise tamamı (n= 9) *Acanthamoeba* sp., sekizi *Sappinia* sp. ve beşi *Balamuthia mandrillaris* pozitif bulunurken, hiçbirisinde *Naegleria fowleri*'ye rastlanmamıştır. Histopatolojik incelemede, bu dokuz izolatla enfekte edilen her iki grup farede de beyin dokusu kesitlerinin normal olduğu; ancak immün sistemi sağlam dört ve atimik yedi hayvanın akciğer kesitlerinde hemoraji ve mononükleer hücre artışının görüldüğü saptanmıştır. Dokularda gerçek zamanlı PCR ile parazit varlığının araştırılması sonucunda; dokuz izolatla enfekte edilen immün sistemi sağlam farelerin dördüne ait kan, akciğer, beyin ve nazal mukoza örneklerinin en az birinde *Balamuthia*; dördünde *Sappinia* sp. ve yedisinde *Acanthamoeba* sp. saptanmıştır. Atimik farelerin ise, yedisinde *Balamuthia mandrillaris*, yedisinde *Sappinia* sp. ve sekizinde *Acanthamoeba* sp. pozitifliği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile ilk kez, ülkemizin çeşitli bölgelerindeki su örneklerinden, potansiyel patojen amiplerden olan *B.mandrillaris* ve *Sappinia* sp. izolasyonu yapılmıştır. Sonuç olarak, içme, kullanma ya da yüzme amacıyla faydalanılan şüpheli su kaynaklarının risk oluşturabileceği konusunda farkındalığın oluşması ve daha dikkatli davranılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Su kaynakları; serbest yaşayan amipler; in vivo patojenite; Türkiye.

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are found widely in soil and water in the nature. Among them in which potentially pathogenic for humans and animals are known as "potential pathogenic free-living amoebae (PPFLA)". PPFLA are characterized as the causes of clinical manifestations leading to death especially in immunosuppressed people. Four genus of PPFLA (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* and *Sappinia*) are known to be pathogenic to humans. The aims of this study were to investigate the presence of PPFLA in the water supplies in Turkey and to determine their in vivo pathogenicity. A total of 664 water samples were collected from the ponds, rivers, streams and wells found in provinces located at different regions (central, western, eastern and southeastern regions) of Turkey. These samples were initially inoculated in the monoxenic culture media and evaluated by both microscopy and polymerase chain reaction (PCR) in terms of the presence of FLA. The samples identified as positive were then cultured in axenic media, the growth of amoebae that were confirmed microscopically, were then studied with PCR for molecular characterization. The isolates that were found positive by PCR from axenic cultures were inoculated intranasally to immunocompetent and immunodeficient (athymic) [BALB/c Rag2(-/-) gamma(c)(-/-)] BALB/c mice followed by the evaluation on the 21st day by histopathological and molecular methods to investigate their in vivo pathogenicity. In our study, 143 water samples were detected as positive in monoxenic cultures and 41 of them were detected as positive in axenic cultures. Twenty of 41 samples detected as positive in axenic culture could be continued in culture for three months. As a result of PCR using primers common to SYA, only nine have been identified from 20 samples as positive. According to the result of the PCR with specific primers, all (n= 9) were positive for *Acanthamoeba* sp., eight for *Sappinia* sp. and five for *Balamuthia mandrillaris*, while none was observed *Naegleria fowleri*. Histopathologic examination revealed that both groups of mice that were infected with the nine isolates had normal brain tissue sections; but haemorrhages and mononuclear cell proliferation were determined in four immunocompetent and seven athymic animal lung sections. When the presence of parasites in tissue samples were evaluated by real-time PCR, *Balamuthia* was detected in at least one blood, lung, brain or nasal mucosa sample of the four immunocompetent mice, *Sappinia* sp. in four and *Acanthamoeba* sp. in seven immunocompetent mice infected with nine isolates. Additionally, seven *Balamuthia* sp., seven *Sappinia* sp. and eight *Acanthamoeba* sp. were detected in immunodeficient mice. In this study, *B. mandrillaris* and *Sappinia* sp. were the first isolated potentially pathogenic amoebae from water supplies located at different parts of Turkey. As a result awareness and precautions against suspicious water supplies used for drinking, daily use and swimming purposes should be treated more carefully.

Keywords: Water supplies; free-living amoebae; in vivo pathogenicity; Turkey.

GİRİŞ

Serbest yaşayan amipler (SYA), doğada toprakta ve sulara yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlar içerisinde, hayvanlar ve insanlar için patojenite potansiyeli olanlar "serbest yaşayan potansiyel patojen amipler (SYPPA)" olarak adlandırılır. SYPPA'nın, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde ölüme kadar varabilen klinik tablolara sebep olduğu bilinmektedir^{1,2}. SYPPA arasında, insanlar için patojen olabilen dört cins (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Sappinia*) tanımlanmış olup, birçok *Acanthamoeba* türü, *Balamuthia mandrillaris* ve *Naegleria fowleri*'nin ciddi enfeksiyonlardan sorumlu olduğu vurgulanmaktadır². *Acanthamoeba* ve *Balamuthia* türleri, immün sistemi baskılanmış bireylerde kronik ve çoğunlukla granülomatöz amibik ensefalit gibi ölümcül parazitoza neden olduğu gibi, akciğer ve deri enfeksiyonlarına da yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda, *N.fowleri*'nin, özellikle durgun ve tatlı sulara yüzme öyküsü olan sağlıklı çocuklar ve genç erişkinlerde, akut, fulminant, nekrotik ve hemorajik meningoensefalit gibi ölümcül hastalıklara neden olduğu; *Sappinia pedata (diploidea)*'nin ise sığır, bizon ve geyik dışkıları ile kontamine olmuş topraktan alınmasıyla sağlıklı bir genç erişkinde ensefalite yol açtığı bildirilmiştir¹⁻⁴. Sunulan bu çalışmada, Türkiye'deki sulara SYPPA'nın tespiti, morfolojik ve filogenetik tanımlanmasına ilaveten, elde edilen izolatların patojenitelerinin in vivo olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Su Örneklerinin Toplanması ve Trofozoitlerin İzolasyonu

Çalışmamızda, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden alınan izin ile (16.01.2012 tarih ve B.23.0.DMP.0.15.1-510.02-2380 sayı), Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplam 664 su örneği toplandı. Tespit edilen her bir yerden, kaynağın büyüklüğüne bağlı olarak 1-3 noktadan ikişer örnek, daha önceki çalışmamızda tarif edildiği şekilde alındı⁵.

Örneklerden monoksenik ve aksenik kültürler daha önce tarif edildiği şekilde yapıldı⁵. Ekim yapıldıktan 2 hafta sonra amip morfolojisi görülmeyen kültürler negatif kabul edilerek dışlandı. Pozitif olarak tespit edilen örneklerdeki amiplerin ön tanımlanması; trofozoit yapılarına, kistlerin morfolojik kriterlerine ve hareket tiplerine göre yapıldı.

Genomik DNA İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyon

Agardaki amip trofozoitleri pastör pipetiyle alınarak fosfatlı tamponda (PBS) tekrar süspansiyon edildi. Süspansiyon 6000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve peletten genomik DNA izolasyonu, QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firma önerisine göre yapıldı.

Moleküler karakterizasyon için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulandı. PCR'da *N.fowleri* için 18S rDNA hedef bölgesi için özgül Nae3-F, Nae3-R⁶; *Acanthamoeba* sp. için 18S rDNA hedef bölgesi için özgül JDP1, JDP2⁷; *B.mandrillaris* için 16S rDNA hedef bölgesi için özgül Balspec, Balspec 16S⁸; *Sappinia* sp. için özgül SappF1576, SappR1736⁹ primerleri kullanıldı. Ayrıca SYA ortak primer olarak 18S rDNA hedef bölgesi için özgül

P-FLA-F, P-FLA-R¹⁰ kullanıldı. PCR karışımı ve ısı döngü protokolü daha önceden bildirildiği şekilde uygulandı⁵⁻⁹. PCR ürünleri etidyum bromür ile boyanarak %2'lik agaroz jelde görüntüledi. Agaroz jelde yürütülen ve görüntülenen PCR örnekleri Wizard® PCR Preps DNA Purification System (A7170 Promega Co., ABD) kullanılarak üretici firma önerisine göre saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA örneklerinin dizi analizi, hizmet alımı ile yaptırıldı ve elde edilen diziler ile filogenetik analiz yapıldı.

İzolatların In Vivo Patojenitesinin Araştırılması

Deney hayvanlarında in vivo patojenite çalışmaları, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınan onay (10.08.2011 tarih ve 11/88 karar no) ile gerçekleştirildi. İzole edilen amiplerin patojenitesi, istatistiksel değerlendirme amacıyla, immün sistemi sağlam 5 BALB/c ve immün sistemi bozuk 5 BALB/c Rag2(-/-) gamma(c)(-/-) (atimik) farede araştırıldı. Her fareye 1×10^4 amip intranasal olarak verildi. Farelerin klinik bulguları (zayıflama, kilo kaybı ve ataksi gibi santral sinir sistemi tutulum bulguları) günlük olarak takip edildi ve klinik semptomlar başladığında hayvanlara ötenazi uygulandı. Hayvan deneyleri, amip inokülasyonunu takiben 21. gün bitirildi ve sağ kalan hayvanlar ötenazi yapılarak in vivo patojenite açısından değerlendirildi. Bu amaçla, doku örnekleri aksenik kültüre ekildi; dokulardaki parazit varlığı ve yükü sırasıyla histopatolojik ve moleküler yöntemlerle araştırıldı.

Histopatolojik inceleme

Deney sonunda ketamin+ksilazin anestezisi altında dekapite edilen farelerden akciğer, beyin ve olfaktor mukozada amip araştırılması için burun dokuları alındı. Dokular, 15 gün %4'lük formaldehit solüsyonu içinde tutularak tespit edildi; daha sonra %10'luk formik asit solüsyonu içinde 15 gün boyunca dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işleminden sonra rutin histolojik doku takip aşamalarından geçirilen dokular parafine gömüldü. Akciğer ve beyin dokuları da formaldehit ile tespit edildikten donra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitlere histopatolojik inceleme için hematoksil-eozin (H&E) boyama yapıldı.

Dokularda parazit varlığı ve parazit yükünün tespiti

Beyin, akciğer, kan ve nazal mukoza doku örneklerinde parazit varlığı ve yükü, gerçek zamanlı PCR (rtPCR) ile araştırıldı. Bunun için öncelikle RNA izolasyonu yapıldı, RNA'dan cDNA sentezi yapılarak cDNA'lar RtPCR işlemine kullanıldı. Rt-PCR işlemi; 2X SYBR-Green'den 10 µl, 20 pmol primerlerden 2 µl, cDNA'dan 5 µl ve distile sudan 3 µl olacak şekilde, Tablo I'de gösterilen primerler kullanılarak Tablo II'deki protokole göre gerçekleştirildi.

BULGULAR

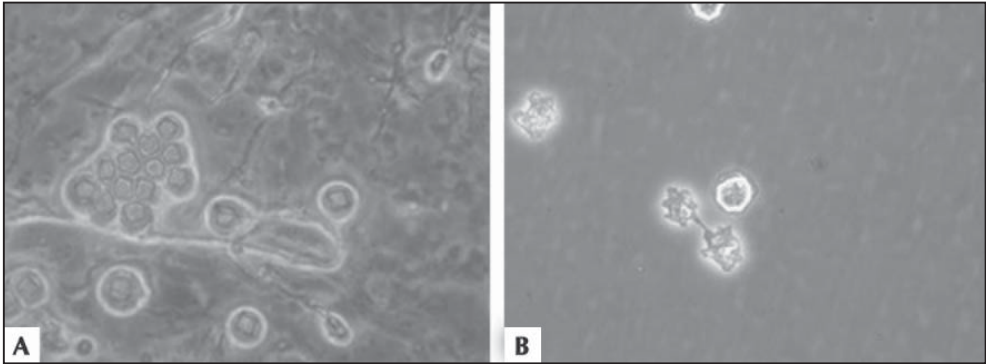
Çalışmaya alınan 664 su örneğinin 143'ü monoksenik kültürde, bu örneklerin de 41'i aksenik kültürde pozitif bulunmuştur (Resim 1A). Aksenik kültürde pozitif tespit edilen 41 örneğin 20'sinin kültürü 3 ay devam ettirilebilmiştir (Resim 1B).

Tablo I. Gerçek zamanlı PCR primerleri

Primerin Adı	Dizilimi
<i>Balamuthia mandrillaris</i> Left	5- ACAGGATTAGAGACCCTGGTAGTC-3
<i>Balamuthia mandrillaris</i> Right	5- GCTTAGTCATCCACTATCTAAATGGAC-3
<i>Acanthamoeba</i> sp. Left	5- CAGCGATTAGGAGACGTTGA-3
<i>Acanthamoeba</i> sp. Right	5- GAAAAGCGAAGCACGATCC-3
<i>Naegleria fowleri</i> Left	5- GTTGTGCTTAAAGCGGGCTA-3
<i>Naegleria fowleri</i> Right	5- ACTCTGCAGTCCCATGCTAAA-3

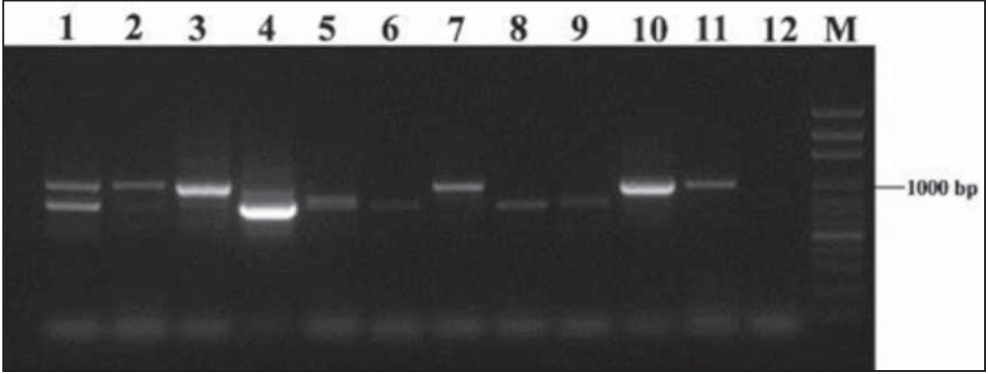
Tablo II. Gerçek zamanlı PCR protokolü

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
95	5 dk	1
95	10 sn	45
60	10 sn	
72	10 sn	
95	5 sn	1
65	1 dk	1
40	30 sn	1



Resim 1. Serbest yaşayan amiplerin (SYA) saptandığı su örneği: (A) Monoksenik kültür; (B) Aksenik kültür.

SYA için ortak primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda, 20 izolattan sadece 9'u pozitif olarak tespit edilmiştir (Resim 2). Kullanılan FLA primerleri, SYA türüne bağlı olarak 500-1500 baz çifti (bç) arasında PCR ürünü elde edilmesine olanak sağladığından¹⁰, çalışmada elde edilen 500-1500 bç arasındaki PCR ürünleri serbest yaşayan amip olarak değerlendirilmiş, diğer bantların özgül olmadığı kabul edilmiştir. PCR ile pozitif tespit edilen örnekler ve örneklerin alındığı bölgeler Tablo III'de görülmektedir. Elde edilen 9



Resim 2. P-FLA primeri ile elde edilen sonuçlar. Hat 1-9: Pozitif örnekler; Hat 10, 11: Pozitif kontrol; M: Moleküler belirteç (100 bç); 12: Negatif kontrol.

Tablo III. PCR ile serbest yaşayan amip pozitifliği tespit edilen örnekler ve kaynakları

Örnek (izolat) no.	Örneklerin alındığı	
	il	Kaynak
1	Kayseri	Erciyes Üniv. yapay gölet
2	Bingöl	Bingöl nehri
3	Erzurum	Karasu nehri
4	Elazığ	Elazığ-Diyarbakır yolu Küçükdere
5	Kocaeli	Yuvacık su birikintisi
6	Diyarbakır	Sulama göleti
7	Diyarbakır	Yukarı Kuyulu kuyu suyu
8	Kocaeli	Akarsu
9	İzmir	Nif çayı

izolat, türe özgül primerler ile PCR analizine tabi tutulmuş ve tamamı *Acanthamoeba* sp., 8'i *Sappinia* sp. ve 5'i *Balamuthia mandrillaris* pozitif bulunurken, hiçbirisinde *N.fowleri*'ye rastlanmamıştır.

Yapılan DNA dizi analizinde, Kayseri Erciyes Göleti ve Elazığ-Diyarbakır yolu küçük dereden alınan örneklerin *Acanthamoeba* sp. 18S rRNA geninin kısmi parçasına ait 761 nükleotidlik DNA dizisi, AB425948, AF260722 ve AF019060 referans izolatlarla karşılaştırıldığında 190, 203, 213 ve 214. nükleotidlerde farklılıklar saptanmıştır. Bu DNA dizisinin; *Acanthamoeba* sp.'ye ait AB425948DNA dizisi ile %98, *A.hatchetti*'ye ait AF260722DNA dizisi ile %99, *A.hatchetti*'ye ait AF019060DNA dizisi ile %98 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. İki örnek dışında diğer örneklerden dizi analizi ise, yeterli kantitasyonda DNA sağlanamadığından yapılamamıştır.

Doku örneklerinin kültür sonuçlarına bakıldığında; *Balamuthia* ile enfekte edilen atimik bir hayvanın nazal ve akciğer doku örnekleri dışındakiler kültürde üretilmemiştir.

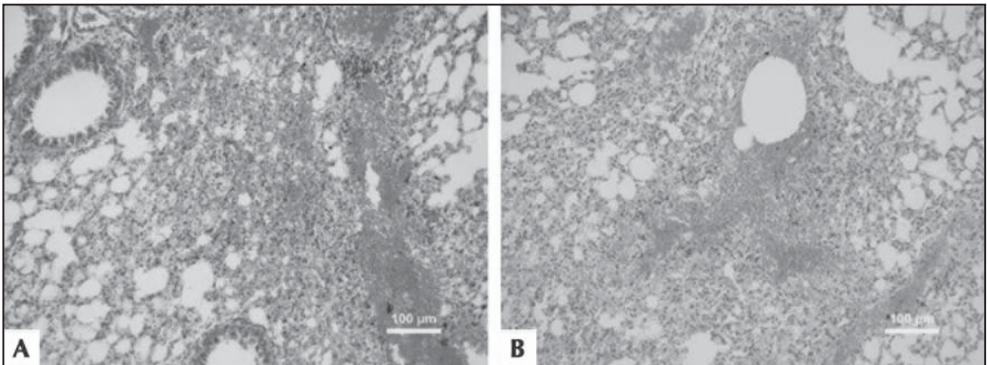
Üreyen fakat kültür devamlılığı sağlanamayan izolatın *Balamuthia* olduğu Rt-PCR ile doğrulanmıştır.

Histopatolojik incelemelerde; 9 izolatla enfekte edilen gerek immün sistemi sağlam gerekse atimik farelerin beyin dokusu kesitlerinde bulbus olfaktorius ve diğer beyin dokularının; nazal mukozanın kesitlerinde ise olfaktor mukozanın normal histolojik yapı sergilediği saptanmıştır. Akciğer doku kesitleri incelendiğinde; 4, 5, 7 ve 8 nolu izolatlarla enfekte edilen sağlıklı farelerin akciğer dokusunda damarlarda konjesyon, hemoraji ve mononükleer hücre artışı saptanırken (Resim 3A); 3-9 nolu izolatlarla enfekte edilen atimik farelerin akciğer kesitlerinde hemoraji ve mononükleer hücre artışı saptanmıştır (Resim 3B) (Tablo IV).

Dokularda Rt-PCR ile parazit varlığının araştırılması sonucunda, immün sistemi sağlıklı olan ve olmayan (atimik) farelerin çeşitli doku örneklerinde *Acanthamoeba sp.*, *Balamuthia* ve *Sappinia* pozitifliği saptanmış; ancak her iki gruptaki farelerin tüm örnekleri *Naegleria* açısından negatif sonuç vermiştir (Tablo IV) (Şekil 1).

TARTIŞMA

Toprak ve sulara yaygın olarak bulunan “serbest yaşayan amipler (SYA)”, tesadüfi olarak insana bulaştıklarında, özellikle immün sistem yetersizliği olan kişilerde ölüme kadar varabilen ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedirler¹¹. Bu nedenle, içme, kullanma ya da yüzme amacıyla faydalanılan çeşitli su kaynakları potansiyel bir risk oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, serbest yaşayan potansiyel patojen amipler (SYPPA) ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sınırlıdır ve bunların in vitro sitotoksitesi ve in vivo patojenitesi konusundaki veriler yeterince aydınlatıcı değildir. Gianinazzi ve arkadaşları¹² 2009 yılında, İsviçre’deki yüzme havuzları, nehir, göl ve göletlerden alınan 24 farklı örnekten elde edilen 17 izolatın beşini *Naegleria sp.*, dördünü *Vannella sp.*, üçünü *Echinamoeba cf. exundans*, üçünü *Ventamoeba (Hartmannella) sp.*, birini *Protacanthamoebica cf. Bohemica* ve birini *Acanthamoeba cf. castellanii* olarak tanımlamışlar ve bu izolatlardan hiçbirinin in vitro sitotoksitesinin olmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında, 2010 yılında İsviçre’de dört kaplıcadan elde ettikleri 31 örnekte SYA’nın varlığını ve

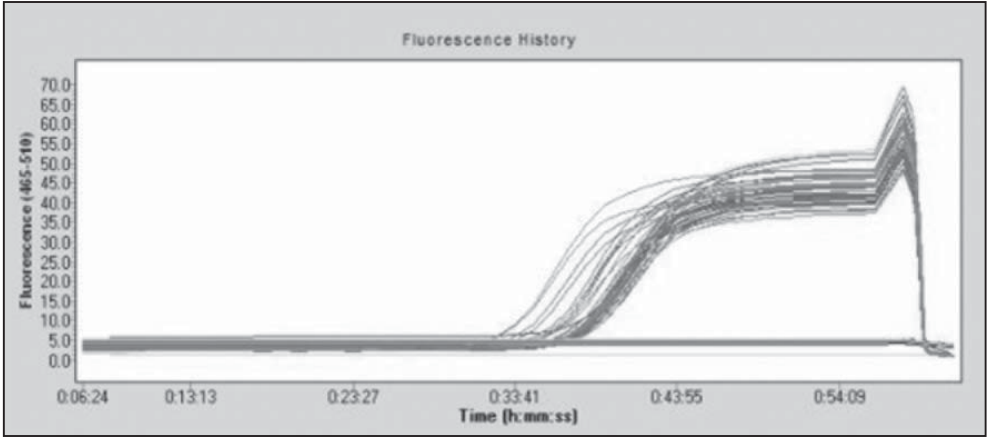


Resim 3. Akciğer kesiti: (A) Damarlarda konjesyon, hemoraji ve mononükleer hücre artışı; (B) Hemoraji ve mononükleer hücre artışı.

Tablo IV. Serbest yaşayan amip izolatlarıyla enfekte edilen, immün sistemi sağlam ve atimik farelerin doku örneklerinde histopatolojik bulgular ve Rt-PCR ile saptanan parazit varlığı

Örnek no.	Histopatolojik bulgular (Akciğer dokusu)			Rt-PCR ile parazit varlığı	
	Sağlıklı fare	Atimik fare	Sağlıklı fare	Atimik fare	Atimik fare
1	N	N	<ul style="list-style-type: none"> Kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Akciğerde <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Tüm örneklerde <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Tüm örneklerde <i>Sappinia</i>
2	N	N	<ul style="list-style-type: none"> Beyinde <i>Acanthamoeba</i> sp. NM'de <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Tüm örneklerde <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Tüm örneklerde <i>Sappinia</i>
3	N	Hemoraji ve MNH artışı	<ul style="list-style-type: none"> Akciğer, kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyinde <i>Acanthamoeba</i> sp. Kan, akciğer ve beyinde <i>Balamuthia</i> Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyinde <i>Acanthamoeba</i> sp. Kan, akciğer ve beyinde <i>Balamuthia</i> Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i>
4	Konjesyon, hemoraji ve MNH artışı	Hemoraji ve MNH artışı	<ul style="list-style-type: none"> Kan ve akciğerde <i>Acanthamoeba</i> sp. Akciğerde <i>Balamuthia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Kan, akciğer ve beyinde <i>Balamuthia</i> Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Kan, akciğer ve beyinde <i>Balamuthia</i> Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i>
5	Konjesyon, hemoraji ve MNH artışı	Hemoraji ve MNH artışı	<ul style="list-style-type: none"> Akciğer ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> Kanda <i>Acanthamoeba</i> sp. Beyin, kan ve NM'de <i>Balamuthia</i> Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Kanda <i>Acanthamoeba</i> sp. Beyin, kan ve NM'de <i>Balamuthia</i> Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i>
6	N	Hemoraji ve MNH artışı	<ul style="list-style-type: none"> NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Akciğerde <i>Balamuthia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, kan ve NM'de <i>Balamuthia</i> Beyin, kan ve NM'de <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, kan ve NM'de <i>Balamuthia</i>
7	Konjesyon, hemoraji ve MNH artışı	Hemoraji ve MNH artışı	<ul style="list-style-type: none"> Beyin ve akciğerde <i>Acanthamoeba</i> sp. NM'de <i>Balamuthia</i> Kan ve beyinde <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, akciğer, kan ve NM'de <i>Balamuthia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Beyin, akciğer, kan ve NM'de <i>Balamuthia</i>
8	Konjesyon, hemoraji ve MNH artışı	Hemoraji ve MNH artışı	<ul style="list-style-type: none"> Beyinde <i>Balamuthia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Kan ve beyinde <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Kan ve akciğerde <i>Acanthamoeba</i> sp. Beyin, akciğer, kan ve NM'de <i>Balamuthia</i> Tüm örneklerde <i>Sappinia</i>
9	N	Hemoraji ve MNH artışı	<ul style="list-style-type: none"> Beyinde <i>Balamuthia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Kan, akciğer ve beyinde <i>Balamuthia</i> Tüm örneklerde <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Kan ve NM'de <i>Acanthamoeba</i> sp. Kan, akciğer ve beyinde <i>Balamuthia</i> Tüm örneklerde <i>Sappinia</i>

MNH: Mononükleer hücre; N: Normal; NM: Nazal mukoz.



Şekil 1. İmmün sistemi sağlıklı ve atimik farelerden elde edilen dokuların *Acanthamoeba* primerleri ile yapılan Rt-PCR sonucu

patojenitesini araştırmışlar ve örneklerdeki amiplerin morfolojik ve filogenetik olarak *Stenoamoeba* sp., *Vermamoeba vermiformis*, *Echinamoeba exundans* ve *Acanthamoeba healyi* ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir³. Bu çalışmada, L929 fibroblast kültüründe in vitro sitotoksik etki gösteren izolatin, morfolojik ve filogenetik çalışmalarla *A.healyi* olduğu gösterilmiş; bu izolatin Rag2-immünoşüpresif farelerde ciddi beyin patolojisine sebep olduğu da in vivo deneylerde belirlenmiştir³.

Ülkemizde, sularda SYA'nın araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan ilki, 1979 yılında Erzurum'da kar altından alınan toprak örneğinden bir *Acanthamoeba* türünün izole edildiği çalışma olup, üretilen bu türün, fareler için patojen olmadığı bildirilmiştir¹³. Ülkemizdeki ilk *Acanthamoeba keratiti* olgusu ise, 1996'da Elazığ'dan rapor edilmiş, bunu diğer birçok olgu raporu izlemiştir¹⁴⁻¹⁸. Sivas'ta yapılan bazı çalışmalarda; toprak, tatlı su, kaplıca suyu, çamur ve saksı toprağı örneklerinden *Acanthamoeba*, *Naegleria* ve *Leptomyxid* cinsi amiplerin izole edildiği bildirilmiştir¹⁹⁻²¹. Ankara'da yapılan bir çalışmada, 28 toprak ve iki su örneği *Acanthamoeba* varlığı açısından incelenmiş; sıcak su kaynağından alınan iki örnekte T2 genotipi *Acanthamoeba* tespit edilmiştir²². Bu iki izolatin sitotoksitesite potansiyeli, insan kornea epitel hücrelerinde LDH salınım testi ile araştırılmış ve birinin zayıf sitotoksik, diğerinin ise sitotoksik olduğu kanısına varılmıştır²².

Sunulan bu çalışma, ülkemizde sularda SYPPA'nın araştırılması üzerine yapılan en geniş tabanlı çalışma olma özelliği taşımaktadır. Diğer taraftan, tespit edilen izolatların patojenite özelliklerinin in vivo olarak değerlendirildiği ilk kapsamlı çalışmadır. Çalışmamızda, örneklerin hiçbirisinde *Naegleria* sp. bulunamamasına rağmen, toplanan su örneklerinin kültüründe *Acanthamoeba*, *Balamuthia* ve *Sappinia* üretilmiştir. Türkiye'de su örneklerinde ilk kez bu çalışmada; potansiyel patojen SYA olan *B.mandrillaris* ve *Sappinia* izole edilmiştir. Bu izolatların hayvanlara nazal yolla inoküle edilmesi ile gerçekleştirilen in vivo deneyler sonucunda ise, kan, akciğer, beyin ve nazal mukoza örneklerinin en az birinde Rt-PCR ile SYPPA tespit edilmiştir. Bu potansiyel patojenlerin, söz konusu kaynaklardan

insan ve hayvanlara bulaşabileceği göz önünde bulundurularak; su kaynaklarının gerek hayvanlar gerekse insanlar tarafından kullanımında dikkatli olunması, özellikle de kırsal kesimde yaşayanların konu hakkında bilinçlendirilmesi uygun olacaktır. Ayrıca, SYPPA'nın neden olabileceği klinik semptomların akılda tutularak, hekimler ve ilgili laboratuvar branşı çalışanlarının dikkatlerinin konuya çekilmesinin, insan sağlığına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Muchesa P, Mwamba O, Barnard TG, Bartie C. Detection of free-living amoebae using amoebal enrichment in a wastewater treatment plant of Gauteng Province, South Africa. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 575297.
2. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50(1): 1-26.
3. Gianinazzi C, Schild M, Zumkehr B, et al. Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Exp Parasitol* 2010; 126(1): 45-53.
4. Adamska M, Leonska-Duniec A, Lanocha N, Skotarczak B. Thermophilic potentially pathogenic amoebae isolated from natural water bodies in Poland and their molecular characterization. *Acta Parasitol* 2014; 59(3): 433-41.
5. Kuk S, Yazar S, Doğan S, Çetinkaya Ü, Şakalar Ç. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water. *Turk J Med Sci* 2013; 43(1): 12-7.
6. Schild M, Gianinazzi C, Gottstein B, Müller N. PCR-based diagnosis of *Naegleria* sp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 564-7.
7. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al. 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* 2001; 39(5): 1903-11.
8. Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 453-5.
9. Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 2009; 199(8): 1139-42.
10. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, et al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* 2004; 92(5): 405-13.
11. Saygi G, Polat Z. Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar. *C. Ü. Tıp Fakültesi Derg* 2003; 25(3): 140-9.
12. Gianinazzi C, Schild M, Wuthrich F, et al. Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Res Microbiol* 2009; 160(6): 367-74.
13. Saygi G. Erzurum'da topraktan *Acanthamoeba* türünün soyutlanması. *Türkiye Parazitoloj Derg* 1979; 2:109-14.
14. Akyol N, Aşçı Z, Kükner S. *Acanthamoeba* keratitis: the first reported case from Turkey. *Ophthalmic Practice: Asia Ed* 1996; 2:46-8.
15. Demirci G, Ay GM, Karabas LV, et al. *Acanthamoeba* keratitis in a 5-year-old boy without a history of contact lens usage. *Cornea* 2006; 25(3): 356-8.
16. Ertabaklar H, Dayanir V, Apaydın P, Ertuğ S, Walochnik J. Case report: *Acanthamoeba* keratitis. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2009; 33(4): 283-5.
17. Koltas IS, Eroglu F, Erdem E, Yagmur M, Tanır F. The role of domestic tap water on *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers and validation of laboratory methods. *Parasitol Res* 2015; 114(9): 3283-9.

18. Erdem E, Evcil Y, Yagmur M, Eroglu F, Koltas S, Ersoz R. Non-contact lens use-related *Acanthamoeba* keratitis in southern Turkey: evaluation of risk factors and clinical features. *Eur J Ophthalmol* 2014; 24(2): 164-72.
19. Akın, Z. Toprak ve su örneklerinden özgür yaşayan amiplerin soyutulması, tanımlanması, özelliklerinin belirlenmesi ve patojenitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 2000. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
20. Akın Z, Saygı G. Çevreden izole ettiğimiz *Acanthamoeba* ve *Neogleria* türleri üzerinde çalışmalar. *Türkiye Parazitol Derg* 2003; 27(2): 116-21.
21. Akın Z, Saygı G. Toprak ve çamur örneklerinden *Acanthamoeba* türü ile izole edilen 'Leptomyxid' amip. *Türkiye Parazitol Derg* 2003; 27(3): 191-4.
22. Kılıç A, Tanyuksel M, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitologica* 2004; 49 (3): 246-52.