

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

Su kaynaklarında insan için patojen serbest yaşayan amiplerin araştırılması

TSA-10-3340

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

**Prof. Dr. Süleyman YAZAR
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı**

**Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü**

**Doç. Dr. Salih KUK
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı**

**Ülfet ÇETİNKAYA
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı**

**Berna HAMAMCI
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı**

**Süheyla GÜCÜYETMEZ
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı**

**EYLÜL 2012
KAYSERİ**

TEŞEKKÜR

“Su kaynaklarında insan için patojen serbest yaşayan amiplerin araştırılması” isimli projemiz TSY-10-3340 kodu ile Erciyes Üniversitesi bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
<i>Acanthamoeba</i> Türleri	5
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	9
<i>Naegleria fowleri</i>	11
<i>Sappinia diploidea</i>	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
4. BULGULAR	18
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	22
6. KAYNAKLAR	24

Su Kaynaklarında İnsan İçin Patojen Serbest Yaşayan Amiplerin Araştırılması

ÖZET

Serbest yaşayan amipler (SYA) toprak ve suda yaygın olarak bulunmaktadır. Özellikle göl, gölet, nehir, yüzme havuzları, termal sular, içme su kaynakları, su arıtma tesisleri, klimalar, mineral su şişeleri ve kontakt lens kaplarında tespit edilmiştir. SYA'ların kozmopolit dağılımı ve insanın bu bölgelerde temas etme olasılığı nedeniyle bu bölgeler risk oluşturmaktadır. SYA'lar genel olarak insan sağlığını tehdit etmezler. Ancak *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia pedata* gibi SYA'lar ciddi beyin hasarına yol açan fırsatçı enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler. Bu çalışmada Kayseri ve çevresindeki kuyu suları, şebeke suları ve göl, gölet akarsulardan elde edilen su örneklerinde insan için patojen serbest yaşayan amiplerin araştırılması amaçlanmıştır. 50 kuyu suyu, 200 şebeke suyu ve 50 göl, gölet ve akarsu olmak üzere 300 su örneği Kayseri'nin farklı bölgelerinden toplanmıştır. 300 örneğin 45'i agar kültüründe amip pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR ile örneklerin 6'sı *Acanthamoeba*, 1'i ise *Naegleria* pozitif olarak değerlendirilmiş ve analizler sonucunda *Acanthamoeba* izolatlarının hepsinin T4 genotipi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kayseri, su kaynakları, serbest yaşayan amipler

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are common in soil and water causes a rare but nearly always fatal disease. FLA has been identified especially lakes, pods, rivers, swimming pools, thermal waters, drinking water sources, water treatment plants, air-conditioners, mineral water bottles, and contact lens containers. FLA is considered as cosmopolitan areas therefore these regions are known to be risky for human. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea* is also pathogen for human. *Acanthamoeba* spp. and *B. mandrillaris* are all known to be opportunistic pathogens causing infections of the central nervous system. This study aimed to investigate the presence of *Acanthamoeba* in well waters, drinking water, rivers and lakes drawn from different locations in Kayseri, Turkey. 300 samples; 50 well water, 50 rivers and lakes and 200 drinking water were collected from different locations. 45 of 300 water samples were positive for amoeba by agar culture. 6 of 300 water samples were positive for *Acanthamoeba* by PCR and 1 water sample was positive *Naegleria* by PCR. All of these *Acanthamoeba* were characterized as the T4 genotype group.

Keywords: Kayseri, water resources, free-living amoebae

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Dünyada kozmopolit bir dağılıma sahip olan ve doğada serbest yaşayan *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* ve *Naegleria fowleri* türlerindeki amipler doğada serbest olarak yaşarken insan ve diğer omurgalılarda fakültatif parazit olarak santral sinir sistemi enfeksiyonuna neden olmaktadır (1-3). *Acanthamoeba* türleri hayat döngülerinde trofozoit ve kist dönemleri bulunmaktadır. Trofozoitlerin büyüklüğü 15–50µm arasında olup türlere göre büyüklükleri değişmektedir. Bunlar da santral yerleşmiş büyük bir çekirdek ve yoğun görünümlü bir çekirdekçiğe sahiptir. Büyüklükleri 10–25µm arasında değişen kistler 2 tabakadan meydana gelmiştir. Dıştaki ektokist kırışık veya dalgalı bir görünümde, iç tabaka olan endokist ise yıldız, beşgen veya altıgen görünümündedir(1). *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* gibi hayat döngüsünde kist ve trofozoit olarak 2 şekli bulunmaktadır. Trofozoitler pleomorfik olup 12–60µm (30 µm) arasındadır. Trofozoit genellikle tek çekirdekli ve çekirdek, büyük ve merkezi olup yoğun bir çekirdekçik içermektedir. Kistler, yuvarlak veya yuvarlağa yakın görünümde olup 12-30 µm (15 µm) büyüklüğündedir. Kistler ışık mikroskopunda incelendiğinde çift katlı bir duvara sahip olup dış duvar dalgalı, iç duvar ise yuvarlak olup duvarda porlar görülmemektedir (1). *Naegleria fowleri*, biri yalancı ayaklarla hareket eden amibik, diğeri de kamçılı, iki trofozoit dönemi ve bir kist evresi vardır. İki farklı trofozoit evresine sahip olması nedeniyle ameboflagellate olarak tanımlanmaktadır. Kistler *Acanthamoeba* kistlerinden daha hassas ve kırılgan olmasına rağmen çevre şartlarına karşı daha dirençlidirler. Trofozoitler yaklaşık 10- 25µm büyüklüğündedir (4).

Acanthamoeba'nın birçok türü, *Balamuthia mandrillaris* ve *Naegleria fowleri*'nin patojen ve enfeksiyona neden oldukları bilinmektedir. *Acanthamoeba* ve *Balamuthia* türleri immun sistemi baskılanmış özellikle zayıf bireylerde kronik ve çoğunlukla ölümcül hastalığa, Granülomatöz Amibik Ensefalit gibi parazitoza neden olduğu gibi akciğer ve deri enfeksiyonlarına da neden olmaktadır. *Naegleria fowleri* türünün insan olgularında durgun ve tatlı sularda yüzme öyküsü olan sağlıklı çocuklarda ve genç erişkinlerde akut, fulminant, nekrotik, ve hemorajik meningoensefalit gibi önemli ölümcül hastalıklara neden olmaktadır (1-3). Son zamanlarda, *Sappinia diploidea* serbest yaşayan amibin sığır, bizon ve geyik dışkıları ile kontamine olmuş topraktan sağlıklı genç bir insanda ensefalite neden olduğu belirtilmektedir. Bu amiplerin neden olduğu enfeksiyonlar ölümlerle sonlanmakta ve sofistiktanılanaklarının sağlandığı gelişmiş ülkelerde bile genellikle otopsi ile tanı konulmaktadır. *N.fowleri*'nin neden olduğu PAM ve *Acanthamoeba* türleri ve *B. mandrillaris*'in neden

olduğu GAE'nin tanısında, BOS, otopsi veya biyopsi materyalleri; *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu keratitte ise kornea kazıntısı ve kaynak olması olası olan şüpheli sulardan alınan örnekler incelenmektedir. Taze hazırlanmış preparatlarda temel ayırım kriterleri, trofozoitlerin tipik amibik hareketleri ve yalancı ayakların tipi, canlı durumda iken çekirdeklerin kolaylıkla görölmesidir. *N.fowleri*'nin tansında kontraktıl vakuollerinin açılıp kapanması ve ortama distile suyun ilave edilmesi ile kamçılı şekillerin oluşması ile tanı konulabilmektedir (1-3).

“Su kaynaklarında insan için patojen serbest yaşayan amiplerin araştırılması” başlıklı proje ile Kayseri ve çevresindeki su kaynaklarında insan için patojen serbest yaşayan amipleri (SYA) araştırmak ve mikroskopik ayırımını yapmak, insanda patojen olan *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia*'ları cins ve tür spesifik primerlerle PCR ile araştırmak ve tespit edilen *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris* ve *Sappinia* izolatlarının filogenetik analizini yaparak diğır ülkelerden bildirilen izolatlarla yakınlık ve uzaklığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Kayseri ve çevresinde bulunan içme suyu kaynaklarından: 200 numune, kuyu sularından: 50 numune ve akarsu ve göletlerden 50 numune olmak üzere toplam 300 numune incelenmiştir. Pozitif olarak değeriendirilen örneklerin DNA dizi analizi ve filogenetik analizi yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Serbest yaşayan amipler (SYA), toprak ve suda yaygın olarak bulunmaktadır. Özellikle göl, gölet, nehir, yüzme havuzları, termal sular, içme su kaynakları, su arıtma tesisleri, klimalar, mineral su şişeleri ve kontakt lens kaplarında tespit edilmiştir. SYA'ların kozmopolit dağılımı ve insanların bu bölgelerde temas etme olasılığı nedeniyle insanlar için bu bölgeler risk oluşturmaktadır. SYA'lar genel olarak insan sağlığını tehdit etmezler. Ancak *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia pedata* gibi SYA'lar ciddi beyin hasarına yol açan fırsatçı enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler (1-3).

Serbest Yaşayan Patojen Amiplerin Sınıflandırılması

Protozoalar klasik olarak dört grup içerisinde sınıflandırılmaktadır. Sarcodina, Mastigofora, Sporozoa ve Ciliatlar. Bu sınıflandırma, moleküler filogenetik, biyokimyasal yollarla modern morfolojik yaklaşımlara dayalı olarak uluslararası protozoologlar tarafından terk edilmiştir (4). Yeni şemaya göre ökaryotlar altı gruba veya süper gruplara ayrılmışlardır. Bunlar; Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata ve Excavata'dır. Burada 2 süper grup altında sınıflandırılan 4 amip şu şekilde dağıtılmıştır. Amoebozoa süper grup altında: *Acanthamoeba* ve *Balamuthia* ve *Sappinia*. Excavata süper grup altında: *N. fowleri*'dir (4).

Acanthamoeba Türleri

Günümüze kadar *Acanthamoeba*'nın morfolojik yapılarına göre 24'ten fazla türü tanımlanmıştır (5). Bugün moleküler teknikler özellikle 18S rRNA genlerinin analizi ile *Acanthamoeba*'nın filogeni ve tür kompleksinin anlaşılmasında da yardımcı olmaktadır. Sekans farklılıklarına göre *Acanthamoeba*'nın 15 genotipi (T1-T15) olduğu saptanmıştır (6-8).

Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

Hayat döngülerinde aktif olarak bölünebilen ve beslenebilen vejetatif veya trofozoit ve kist dönemleri bulunmaktadır. Trofozoitlerin büyüklüğü 15–50µm arasında olup türlere göre büyüklükleri değişmektedir. Bunlarda santral yerleşmiş büyük bir çekirdek ve yoğun görünümlü bir çekirdekçiğe sahiptir. Sitoplazma granüler yapıda olup çok sayıda mitokondri,

ribozom, besin ve kontraktıl vakuol içermektedir. Büyüklükleri 10–25µm arasında değişen kistler 2 tabakadan meydana gelmiştir. Dıştaki ektokist kırışık veya dalgalı bir görünümde olup protein ve yağ içermektedir. İç tabaka olan endokist ise yıldız, beşgen veya altıgen görünümde olup selüloz içerir ve bu nedenle Periodik-Asit-Schiff (PAS) + dir. Kistler tek çekirdekli ve merkezi yerleşmiş yoğun bir çekirdekçiğe sahiptir (9).

Hemen hemen her yerde yaygın olarak görülen *Acanthamoeba* spp.'i dünyada oldukça kozmopolit bir dağılıma sahiptir. Bu amipleri; topraktan, tatlı ve tuzlu sulardan, şişelenmiş maden suyundan, elektrik ve nükleer santrallerin soğutma kulelerinden, havalandırmalardan ve klimalardan, jakuzi küvetlerinden, yüzme havuzlarından, diş yıkama aletlerinden, diyaliz aletlerinden, hava, bakteri, mantar ve memeli hücre kültürlerinde, lens araç gereçlerinden, kulak akıntısı, solunum salgıları, solunum şikayeti olan hastalardan veya sağlıklı bireylerin nazofaringeal mukozadan elde edilen sürüntülerden ve dışkı örneklerinden izole edilmiştir. Bunun dışında ayrıca deri, beyin, akciğer ve korneası bu parazitle enfekte olan kişilerden de izole edildiği bildirilmiştir (1-3).

Granülatöz Amibik Ensefalitinde(GAE) Klinik

Acanthamoeba'nın birkaç türünün GAE'ye (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* ve *A. divionensis*) sebep olduğu bilinmektedir. Öncelikle HIV/AIDS'li hastalarda, diyabetlilerde ve organ transplantasyonu olanlarda veya son zamanlarda tatlı sularda yüzme öyküsü olan immun sistemi zayıf kişilerde görülmektedir. GAE'nin başlangıcı yavaş ve sinsi olup haftalar hatta aylar sonrasında kronik bir hastalık olarak ortaya çıkmaktadır (1-3). GAE'ye bağlı klinik belirtiler, baş ağrısı, ense sertliği ve mental bozuklukların yanı sıra bulantı, kusma, hafif ateş, letarji, serebral ataksi, görme bozuklukları, hemiparezi, nöbet ve koma görülmektedir (10).

***Acanthamoeba* Keratitinde (AK) Klinik**

Acanthamoeba keratiti; bu amipler tarafından oluşturulan ağrılı ve görme sağlığını tehdit eden bir enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Eğer enfeksiyon tedavi edilmez ise korneada ülserasyon, görme kaybı oluşmaktadır ve sonuçta körlük ve enükleasyona neden olmaktadır. AK korneanın amiplerle direk teması sonucunda gelişir (11). Travmalar, kontak lens kullanımı ve bu amipleri içeren lens sıvılarının kullanımı bu parazitozun oluşmasında genel etmenlerdir. Kornea epitelinin minor erezyonu yumuşak veya sert kontak lens kullananlarda,

ayrıca sonradan kontamine lens sıvılarının kullanımı AK için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Acanthamoeba keratiti, yoğun oküler ağrı, kornea'nın iltihaplanması, 360° veya kısmi parasantral halka şeklinde infiltrasyon, tekrarlayan kornea epitelinin hasarı ve kornea lezyonları ile karakterizedir. Genellikle tek bir gözde görülürken bazı olgularda iki gözün birden etkilendiği rapor edilmiştir. GAE'nin aksine, kontak lens kullanan veya kullanımındaki hijyen kurallarına uyulmayışı sonucu sağlıklı bireylerde yaygın olarak görülmektedir. Üveit olgusu ölümcül GAE ile ilişkili olmasına rağmen Acanthamoeba keratiti gelişmiş hiçbir GAE olgusu rapor edilmemiştir (1). Acanthamoeba keratiti; fungal ve viral keratitlerle, özellikle de *Herpes simplex* keratiti ile karıştırılabilir. Bu nedenle gecikmeden uygun bir tedavi ile amip ortan kaldırılabilir.

Acanthamoeba Enfeksiyonlarının Patolojisi

Prodromal dönemde bilinmemekle beraber enfeksiyonun takibinden birkaç hafta veya aylar sonrasında hastalık ortaya çıkmaktadır. Zamanın geçmiş olmasından dolayı portal giriş tam olarak bilinmemektedir fakat enfeksiyonun tipine ve olası temaslar bu amiplerin çevrede yayılmasını sağlamaktadır. Acanthamoeba'nın trofozoit veya kistleri sağlıklı bireylerin nazal mukozalarından izole edilmiş ve invazyonda nazofarangeal yolun bir sebebi olduğu belirtilmektedir. Amipler vücuda derideki çatlaklardan girebilir ve amip kistlerinin inhalasyonu ile kan yoluyla beyin ve akciğerlere yayılışıyla sonuçlanmaktadır. Bir deri biyopsisinde amip trofozoit ve kistleri tespit edilmiştir (3).

İmmunoloji

Acanthamoeba doğada hemen hemen her yerde bulunmaktadır. Enfeksiyonun insan ve diğer hayvanlara trofozoit, kist veya amip antijenleri ile bulaşmaktadır. Çünkü serumda bu amiplere karşı antikor oluşmaktadır. Bununla birlikte bu doğal antikorlar sonucu enfeksiyona karşı koruyucu bağışıklık gelişip gelişmediği bilinmemektedir (1).

Patolojik Mekanizmalar

Çeşitli patojenik mekanizmalar sonucunda beyin veya kornea enfeksiyonlarında Acanthamoeba trofozoitleri oldukça zarar vericidir (1).

Tanı ve Kültür

N.fowleri'nin neden olduğu PAM ve *Acanthamoeba* türleri ve *B. mandrillaris*'in neden olduğu GAE'nin tanısında, BOS, otopsi veya biyopsi materyalleri; *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu keratitte ise kornea kazıntısı ve kaynak olması olası olan şüpheli sulardan alınan örnekler incelenmektedir. Taze hazırlanmış preparatlarda temel ayırım kriterleri, trofozoitlerin tipik amibik hareketleri ve yalancı ayakların tipi, canlı durumda iken çekirdeklerin kolaylıkla görülmesidir. *N.fowleri*'nin tansında kontraktıl vakuollerinin açılıp kapanması ve ortama distile suyun ilave edilmesi ile kamçılı şekillerin oluşması ile tanı konulabilmektedir.

Acanthamoeba spp.; *Escherichia coli* veya *Enterobacter aerogenes* bakteriler ile kaplı besleyici değeri olmayan besiyerlerinde kültürleri kolayca yapılabilmektedir. Üzerine bakteri sürülmüş pepton-yeast extract-glikoz besiyerinde çok miktarda büyüyüp geliştiğini bildirmişlerdir. Penisilin-streptomisin veya gentamisin kombinasyonu inhibisyonunda etkilidir. Yüksek konsantrasyonda proteoz pepton-yeast extract-glikoz ile zenginleştirilmiş besiyerleri bu amiplerin büyümesinde başarıyla kullanılmaktadır (1,2).

Moleküler Karakterizasyonu

Moleküler teknikler, *Acanthamoeba* genotipi tespiti için oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. Burada kornea epiteli ve gözyaşı kullanılacak örneklerdir. Konvansiyonel PCR protokolleri, çevre örnekleri ve GAE olgularında olduğu gibi AK olan kornea kazıntısından elde edilen örneklerde kullanılmaktadır (2,12).

GAE Tedavisi

GAE'nin tedavisi, kesin belirtilerinin olmaması, güvenilir bir tanı testinin olmayışı ve sıklıkla otopside tanıya gidilmesinden dolayı oldukça zordur. Ancak, birçok GAE'li hastalarda MSS enfeksiyonu olmayan *Acanthamoeba* deri enfeksiyonu olanlarda, Pentamidin izotionat, sulfadiazin, fluktosine ve fluknazol veya itrakonazol ile tedavide başarılı olduğu rapor edilmiştir. Bu tedavilerin yanı sıra MSS enfeksiyonu olmayan *Acanthamoeba* deri enfeksiyonları için klorheksidin glukonat ve ketokonazol gibi antimikrobiyal ilaçların da kullanılmasıyla tedavide başarılı olduğu bildirilmiştir (13,14).

Acanthamoeba Keratiti Tedavisi

Acanthamoeba keratiti tedavisinde; chlorhexidine, polyhexamethylene biguanide, propamidine isethionate, dibromopropamidine isethionate, neomycin, paromomycin, polymyxin B, clotrimazole, ketoconazole, miconazole ve itraconazole gibi ilaçlar kullanılmakta olduğu belirtilmektedir (13).

Korunma ve Kontrol

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda görülen GAE olgularında gerekli olan korunma yöntemleri açıkça tanımlanmamıştır. AK durumunda ise kontak lens kullanan kişilerin sağlıklı koşullarda kullanılması ve saklanması konusunda enfeksiyonun önlenmesi için kişilerin bilgilendirilmesi önemlidir. Ayrıca, lens kullananlara, yüzme sırasında, su sporu faaliyetlerinde, banyo ve jakuzi sırasında lensin takılmaması ve bu amiplerin ve yol açtıkları hastalıklar konusunda gerekli uyarılar yapılmalıdır (1).

Balamuthia mandrillaris

Balamuthia mandrillaris, 1993 yılında leptomyxid amiplerden farklı olarak yeni bir cins ve tür olduğu tanımlamıştır (15,16). Bu güne kadar Balamuthia cinsine ait tek tür olan *B. mandrillaris* hem hayvanlarda hem de insanlarda GAE etkenlerinden biridir.

Balamuthiasis, Acanthamoeba'nın sebep olduğu GAE olgularına benzer şekilde HIV/AIDS hastalarında, immunkompramize bireylerde ve intravenöz ilaç kullananlarda görülmektedir. Ayrıca, immün sistemi sağlam özellikle çocuk ve yaşlılarda görülebileceği rapor edilmiştir. Subakut fazı, 2 haftadan 2 yıl arasında gelişen kronik bir hastalıktır. *Balamuthia mandrillaris*'de, Acanthamoeba'da olduğu gibi deri enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Balamuthia da GAE olguları yılın herhangi bir zamanında ortaya çıkabilir. Bu nedenle mevsimsel değişikliklerle hiçbir ilişkisi yoktur (3,17).

Morfoloji ve Hayat Döngüsü

Acanthamoeba gibi hayat döngüsünde kist ve trofozoit olarak 2 şekli bulunmaktadır. Trofozoitler pleomorfik olup 12–60µm (30 µm) arasındadır. Trofozoit amiplerin bazen 2 çekirdekli olmasına rağmen genellikle tek çekirdekli. Çekirdek, büyük ve merkezi olup

yoğun bir çekirdekçik içermektedir. Kistler, yuvarlak veya yuvarlağa yakın görünümde olup 12-30 µm (15 µm) büyüklüğündedir. Kistler ışık mikroskopunda incelendiğinde çift katlı bir duvara sahip olup dış duvar dalgali, iç duvar ise yuvarlak olup duvarda porlar görülmemektedir (16).

Kültür

Balamuthia bir toprak amibi olduğundan Acanthamoeba'nın aksine üzerine bakteri sürülmüş besiyerlerinde üretilmemiştir. Fakat bunlar doku kültürlerinde ve zenginleştirilmiş aksenik besiyerlerinde üretilabilmektedir (18).

Tanı: Klinik ve Laboratuvar Metotları

Balamuthia mandrillaris, Acanthamoeba gibi BOS'ta görülmemiştir. Beyin ve deri biyopsileri tanı için önemlidir (19). *Acanthamoeba* spp. ve *Balamuthia mandrillaris*'in ikisi de birçok hastada antemortem dönemdeki beyin biyopsilerinde tanımlanmıştır. *Acanthamoeba* spp ve *Balamuthia mandrillaris* içeren doku kesitleri incelendiğinde benzer morfolojiye sahip olmalısından dolayı birbirinden ayırt etmek oldukça zordur. Ancak tavşan anti-Acanthamoeba veya anti-*B. mandrillaris* serumları kullanılarak doku kesitlerini immunfloresans analizi ile ayırt edilebilir (1,15,16).

Patogenez

Balamuthia mandrillaris'in patojenitesi hakkında bilgi azdır. Amibin insan ve hayvanlardaki MSS işgal yeteneğinin Acanthamoeba'daki benzer şekilde bazı enzimlere sahip olduğu düşünülebilir (20).

Moleküler Karakterizasyonu

Moleküler teknikler şuanda sadece bu amipleri belirlemek için değil Balamuthia cinsinin epidemiyolojisi ve filogeninin anlaşılmasına karşı bir anlayış kazanmak için kullanılmaktadır (21,22). Balamuthia için spesifik primer-pair den oluşan bir PCR probu mitokondrial 16S rRNA gen dizisi verilerinde geliştirilmiştir (18). Balamuthia enfeksiyonlarını onaylamak için geriye dönük olarak doku kesitlerinden DNA ekstraktlarından örnekler saklanmıştır (23).

Tedaviye katkıda bulunabilir şekilde yaklaşık beş saat içerisinde insanın beyin dokusundan ve MSS'den *Balamuthia* DNA'sının özel tanımlayabilir bir real-time multiplex PCR yöntemi geliştirilmiştir (24).

Balamuthia Enfeksiyonlarının Patofizyolojisi

Hastalığın patolojisi *Acanthamoeba*'ya benzemektedir. Amipler beyinin; orta beyin, talamus, beyin sapı ve beyincikte hemorajik nekrozlara sebep olacak benzer lokalizasyonlar görülmüştür. *Acanthamoeba*'nın GAE vakalarının çoğunun aksine *Balamuthia* vakaları çocuklarda ve immun yetmezliği bilinmeyen yaşlı bireylerde ortaya çıkmaktadır (3,13). *Balamuthia* hastalarında; GAE, yüzde deri lezyonları ve sinüs boşluklarında rinit veya otit enfeksiyonları görülmektedir.

MSS belirtileri başlangıçta baş ağrısı ve fotofobi ve daha sonra mide bulantısı, kusma, ateş, kas ağrısı ve nöbetler şeklinde karşımıza çıkabilmektedir. Deri lezyonlarının görünümü ve nörolojik semptomların başlangıcı arasındaki zaman dilimi 1 ay ile 2 yıl arasında değişebilmektedir. *Acanthamoeba* da olduğu gibi yavaş yavaş ve sinsice gelişen kronik bir hastalıktır. BOS da glikoz seviyesinin düşük veya normal yakın olması, protein seviyesinin yüksek olması hastalık hakkında bilgilendirici olmaktadır. Baş için BT ve MR önemli radyolojik testler olarak kullanılmaktadır (25).

İmmunoloji

Balamuthia mandrillaris antikorları balamuthiasisli hastaların yanı sıra sağlıklı bireylerde de immunofloresan ve flow sitometri teknikleri kullanılarak gösterilmiştir (26).

Tanı ve Tedavi

Balamuthia'nın neden olduğu GAE olgularının çoğunda klinik bulgular açık değildir. Steroidlerin yanı sıra antibakteriyal, antifungal ve antiviral ajanların enfeksiyonun üzerine hiçbir etkisi yoktur (1).

Epidemiyoloji

Balamuthia'nın enfeksiyon kaynağı ile ilgili spesifik bilgiler tam olarak bilinmemektedir. Bahçede kirli toprakla oynama veya rüzgar yoluyla havada bulunan kistler bir enfeksiyon kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü Balamuthia topraktan izole edilmiştir (18). Amipler vücuda muhtemelen deride bulunan çizik ve yaralardan vücuda girdikten sonra kan yoluyla beyine ulaşmakta ve burada yayılmaktadır (27). İnsana bulaşma kaynaklarından su da olası bir faktördür fakat bugüne kadar yüzme öyküsü veya su ile bulaşmasıyla ilgili bir vaka bildirilmemiştir (28,29).

Korunma ve Kontrol

Balamuthia vakalarında immun sistemi zayıf kişilerde yaygındır fakat bu amip enfeksiyonuna karşı mevcut korunma ve kontrol yöntemleri net değildir. Akut MSS hastalığı ile ilgili belirtiler oldukça dikkat gerektirir ve deri enfeksiyonları antimikrobiyal ilaçlarla tedavi edilebilir. Yeni vakaların çoğu immunkompetan çocuklarda görülmektedir ki bu da immünolojik eksikliklerin olabileceğini göstermektedir (1).

Naegleria fowleri

Naegleria fowleri, biri yalancı ayaklarla hareket eden amibik, diğeri de kamçılı, iki trofozoit dönemi ve bir kist evresi vardır. İki farklı trofozoit evresine sahip olması nedeniyle ameboflagellate olarak tanımlanmaktadır. Kistler Acanthamoeba kistlerinden daha hassas ve kırılgan olmasına rağmen çevre şartlarına karşı daha dirençlidirler. Trofozoitler yaklaşık 10-25µm büyüklüğündedir. Çoğunlukla veziküler tipte tek çekirdek ve yoğun kromatikleri olan santral yerleşmiş tek çekirdekçik bulunmaktadır. Sitoplazmada ekto ve endoplazma belirgin bir şekilde ayrılmıştır. Çok sayıda mitokondri, ribozom, besin vakuölü ve son kısma doğru kontraktıl vakuol ve protoplazmik filamentler takip etmektedir. Trofozoitler çevre şartlarının bozulmasıyla besin tüketimini azaltarak kist formuna dönüşmektedir. Kistler genellikle yuvarlak görünümündedir ve çift cidarlı duvara sahiptir dıştaki ektokist tabakası içteki endokist tabakasından daha kalındır. Kist duvarında porlar vardır fakat porları ışık mikroskobunda görmek oldukça zordur. Flagellat ve kist dönemlerinin her ikisinde birden tek bir çekirdek ve göze çarpan bir çekirdekçik vardır (2).

Naegleria fowleri dünyada yaygın olup toprak ve tatlı sulardan izole edilmiştir. SS rRNA gen sekansına bağlı olarak *Naegleria*'nın 30 dan daha fazla türe sahip olduğu keşfedilmiştir (5). Yalnızca tek tür olan *N. fowleri*'nin enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir bununla birlikte

diğer iki tür olan *N. australiensis* ve *N. italica*'nın intranasal veya intraserebral inokulasyondan sonra farelerde enfeksiyona sebep olabilmektedir. Bu türlerin insanı enfekte ettiği tespit edilmemiştir. *N. fowleri*, termofilik olup 45°C'nin üzerindeki sıcaklığı tolere edebilmektedir. Bu nedenle, bu amipler ortam sıcaklığı yüksek olmasına rağmen yılın sıcak aylarında hızla çoğalmaktadır. Enfeksiyonlar, su aktiviteleri fazla olacak olan çocuk ve genç yetişkinler arasındaki yaş gruplarında daha fazla görülmektedir. Çünkü bunların su içerisindeki amiplerle temas olasılığı daha yüksektir (1).

Kültür

Doğada amipler bakteri üzerinden beslenirler ve dokuda kist evresine geçemediğine inanılan ve patolojik örnekten alınan trofozoitler yüzeyine bakteri sürülmüş ve besleyici değeri olmayan agar besiyerlerine ekildiğinde bu ortamda üremekte ve kist evresine geçmektedir. Tatlı su havuzları, su birikintileri, göl, nehir, yüzme havuzları, kaplıcalar, enerji santrallerinin termal kirli atıklarından, hidroterapi havuzları, akvaryum, sulama kanalları, kanalizasyon hatta nasal akıntılar ve sağlıklı bireylerin boğazlarından izole edilmiştir. Ayrıca, BOS ve beyin dokusu gibi klinik örneklerden kolayca izole edilmiştir. Bununla birlikte bu amipler, osmolaritesinin yüksek olması ve hassas olmalarından deniz suyundan elde edilmemiştir (30). *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* gibi *Legionella pneumophila* türü hücre içi bakterinin gelişmesini sağlayabilmektedir.

Primer Amibik Meningoensefalit (PAM)

N. fowleri tatlı sularda yüzme veya dalma öyküsü olan sağlıklı çocuk ve genç yetişkinlerde, akut fulminant meningoensefalite neden olan bir parazittir. PAM özellikle sağlıklı bireylerde görülmektedir. *Acanthamoeba* ve *Balamuthia* gibi oportunistik olarak bilinmez fakat bir patojendir. Tipik PAM olguları, yaz aylarında kişilerin yüzme havuzlarında, göllerde ki su aktivitelerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. PAM'ın çarpıcı özelliği bu amiple maruz kaldıktan sonra semptomların hızlı başlangıçlı olmasıdır. Hastalık çok hızlı bir şekilde ilerlemekte, erken tanı ve müdahale olmaz ise bir hafta ya da daha kısa sürede ölüm gerçekleşmektedir (3,31).

Klinik ve Laboratuvar Tanısı

Akut nörolojik semptomları ve tatlı suya dalma veya yüzme öyküsü olan genç yetişkin ve çocuklarda PAM'dan şüphelenilmelidir. Naegleria'nın bulaşmasından yaklaşık 5-7 gün içerisinde PAM ile ilgili klinik bulgular ortaya çıkmakta hatta 24 saatten daha kısa sürede de görülebilmektedir. Çünkü akut piyonejik veya bakteriyel meningoensefalitin klinik özelliklerinin PAM'dan hiçbir farklılığı yoktur. Bu nedenle doktorun hastanın geçen hafta boyunca tatlı suya veya kaplıcaya girme öyküsünün olup olmadığı hakkında bilgisi olmalıdır. PAM enfeksiyonu ani başlangıçlıdır ve bifrontal veya bitemporal şiddetli baş ağrısı, yüksek ateş ve ense sertliği ile karakterize olup ilerleyen zamanda bulantı, kusma, sinirlilik ve huzursuzluk görülmektedir. Ense sertliği genellikle Kernig ve Brudzinsk belirtileri ile ortaya çıkar. Fotofobi klinik belirtilerinin sonunda görülebilir bunu; koma, nöbet, konfüzyon, letarji, diplopi, garip davranışları içeren nörolojik bozuklar takip etmekte ve 1 hafta içerisinde ölümle sonlanmaktadır. Kranial sinir felci (üçüncü, dördüncü ve altıncı kranial sinirler), beyin ödemi ve herniyasyonu işaret edebilir (31).

Alınan taze BOS örneği hemen mikroskop altında incelenerek aktif hareket eden trofozoitlerle tanı konulabilir aynı zamanda optik fast-kontrast mikroskoplarda tercih edilebilir. BOS örneklerinde eğer trofozoitler varsa bunlar Giemsa veya Wright boyaları ile boyanarak kalıcı preparatlar elde edilebilir. Amipler konak hücrelerinden nükleus içerisine yerleşmiş büyük merkezi çekirdekçiklerinin olmasıyla açıkça ayırt edilebilir. Bunlarda Gram boyama kullanışlı değildir. Ölüm nedeni genellikle beyin herniyasyonu ile kafa içi basıncını artmasıdır, başlıca sebebi kardiopulmoner ve akciğer ödemidir (3,31).

Patogenezi

Burundan giren Naegleria trofozoitleri kriptiform plaklarından portal dolaşım ile geçerek MSS de koku alma loplarına yerleşmektedir. Su aktiviteleri sırasında burundan giren amiplerin koku alma loplarındaki nöroepitel hücreleri tarafından fagosite edilme yetenekleri olduğuna inanılmaktadır. PAM enfeksiyonunun inkübasyonu, inokulumun büyüklüğüne ve enfektif amibin her bir suşunun virulansına bağlı olarak değişmektedir (1,3).

İmmunoloji

Naegleriosis ani gelişen bir hastalık ve çoğunlukla birkaç hafta içinde ölümcül olabildiğinden, bağışıklık sistemin bu amibe karşı etkili bir yanıt oluşturabilmesi için yeterli zamanın olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle PAM enfeksiyonlarında serolojik testlerin kullanımı da sınırlıdır (2).

Moleküler Teknikler

Hastaların beyin ve MSS den elde edilen örneklerin yanı sıra çevreden (su ve toprak) alınan örneklerle amip kültürleri yapılarak, *N. fowleri*'nin tür identifikasyonu için izoenzim analizleri gibi biyokimyasal teknikler geliştirilmiştir (32). Son zamanlarda, DNA analizleri için çevreden alınan örneklerin yanı sıra amiplerin üretildiği kütlülerden alınan örneklerle PCR ve nested PCR yöntemleri gibi moleküler yöntemler geliştirilmiştir (5,33,34). *N. fowleri*'nin 5.8S rRNA gen analizi ve 1ve 2 (ITS1, ITS2) internal transkripsiyonuyla ayırt edilebilir spesifik genotipleri gösterilmiştir. Klinik izolatlarda ki ITS analizlerine bağlı olarak *N. fowleri*'nin 2 suşu gösterilmiştir. California da farklı zamanlarda aynı kaplıcaya giden 2 PAM hastasından elde edilen izolatlarda aynı tip2 genotipine rastlandığı bildirilmiştir(33). Son zamanlarda antemortem PAM hastaların BOS ve beyin doku örneklerinden *N. fowleri* DNA'sını tanımlayan real-time multiplex PCR yöntemi geliştirilmiştir. bu test, Amerika Birleşik devletlerinde olduğu bilenen bütün 3 genotipi tanımlamaktadır (24). Doğal çevrede çeşitli Naegleria tür ayrımını yapabilmek için hızlı hassas ve ayırıcı yeni teknikler geliştirilmiştir ki bunlar; tek kullanımlık primer set, real-time PCR için DNA arasını boyayan SYT09 ve ITS'i kuşatan 5.8S rRNA genin melting-curve analizi gibi yöntemlerdir (35).

Tedavi ve Prognoz

PAM dan dolayı çok az hasta hayatta kalmıştır. Tedavide amphotericin B ve miconazolün sinerjik bir etkisi olduğuna fakat rifampisinin amipler üzerine etkisiz olduğuna inanılmaktadır (1).

Korunma ve Kontrol

Naegleria fowleri termofilik bir amiptir bu nedenle su sıcaklığının 30 °C üzerine çıktığı zamanlarda hızla çoğalmaktadır. Küresel ısınma sonucunda olası sıcaklığın artışıyla *N. fowleri* PAM olgularının önceden rapor edilmemiş ülkelerde bile görülebileceği bildirilmektedir (34). *N. fowleri* suyun klorlanmasına duyarlı olduğundan özellikle yaz aylarında yüzme havuzlarının yeterli klorlama ile kontrol altına alınabilir. Bununla birlikte; göl, akarsu ve doğal su kaynaklarının klorlanması mümkün olmadığından *N. fowleri* çoğalması olasıdır (4).

Sappinia diploidea

Gelman ve ark, 38 yaşında sağlıklı bir erkekte *Sappinia diploidea* tarafından ilk ve tek amibik ensefalit olgusunu bildirmişlerdir. Amibin, yan yana yapışık duran iki çekirdeğinin varlığı karakteristik özelliğidir. Kistler beyin dokusunda görülmemiştir. *Sappinia diploidea*'nın, tatlı sudan, topraktan, memeli dışkılarından izole edilmiş olmasına rağmen hiçbir insan veya hayvan hastalıklarıyla karıştırılmamıştır. Avrupa, kuzey Amerika, Mısır, orta doğu, Batı Hint Adaları ve Japonya da keşfedilmiştir. Trofozoitlerin büyüklüğü yaklaşık 40–80 mm oval veya dikdörtgen şeklindedir. Zaman zaman yüzeyinin kırışık olmasıyla basık a görülebilmektedir. Sitoplazmada kontraktıl ve besin kofulları mevcuttur. Olgun kistler 15–30 mm boyunda ve yuvarlaktır. *Sappinia diploidea*, üzeri bakteri kaplı besin içeriği olmayan besiyerlerinde üretilirler (1).

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin toplanması ve incelenmesi: Örnekler, Kayseri ve çevresindeki yerleşim yerlerinde bulunan içme, kullanma suyu kaynaklarından elde edilmiştir. Bu amaçla Kayseri merkez ve çevresindeki yerleşim alanlarında tespit edilen; içme suyu kaynaklarından 200 numune, kuyu sularından 50 numune ve akarsu ve göletlerden 50 numune olmak üzere toplam 300 numune toplanmıştır. Örnekler 50 ml’lik plastik falkon tüplerine gölet ya da akarsularda su yüzeyinin 2 cm’lik bölümünden, çeşme, pınar gibi yerlerden direkt olarak tüpe akıtılarak alınmıştır.

Kültür: Örneklerin her biri 1.2 µl porlara sahip selüloz nitrat filtreden (Sartorius stedim) geçirildi. İkiye bölünen filtre kağıdı *Escherichia coli* ile kaplanmış Page’nin amip solüsyonuyla (2.5 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 0.5mM Na₂HPO₄, 40 µM CaCl₂.6H₂O ve 20 µM MgSO₄.7H₂O) hazırlanmış %1.5’luk besleyici değeri olmayan agar (1,5 g agar 1000 ml Page’nin amip solüsyonunda çözdürüldü ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı) (BDOBY) plaklarına ters bir şekilde konuldu. Örnekler 2 hafta 37 °C de inkübe edildikten sonra herhangi bir üremenin olup olmadığı ışık mikroskopuyla incelendi.

DNA izolasyonu: Besleyici değeri olmayan besiyerinde üreme olduğu gözlenen bölgelerden agar kesilerek alınmış ve 55°C’de tamamen çözünmesi beklenmiştir. Çözündükten sonra 18.000 rpm 10 dakika santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı atılıp dipteki kısımdan Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) prosedürüne göre DNA izolasyonu yapılmıştır.

PCR ve kullanılan primerler: *Acanthamoeba* spp. *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* ve *Sappinia* spp. PCR’ı için kullanılan primerler ve elde edilen DNA büyüklüğü ve referanslar Tablo 1’de, PCR şartları ise Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 1: PCR için kullanılan primerler ve elde edilen DNA büyüklüğü			
Parazit	Kullanılan Primerler	Büyüklük	Referans
<i>Acanthamoeba</i> spp.	JDP1 (5'-GGCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3')	423-551 bp	36
<i>Naegleria fowleri</i>	Nae3-F (5'-CAAACACCGTTATGACAGGG-3') Nae3-R (5'-CTGGTTTCCCTCACCTTACG-3')	141-323 bp	37
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	Balspec-F (5'-CGCATGTATGAAGAAGACCA-3') Balspec-R(5'-TACCTATATAATTGTCGATATACCA-3')	230 bp	21
<i>Sappinia</i> spp.	Sapp-F (5'-TCTGGTCGCAAGGCTGAAAC-3') Sapp-R (5'-GCACCACCACCCTTGAAATC-3')	160bp	38

Tablo 2: PCR şartları

<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	<i>Sappinia</i> spp.
--------------------------	--------------------------	--------------------------------	----------------------

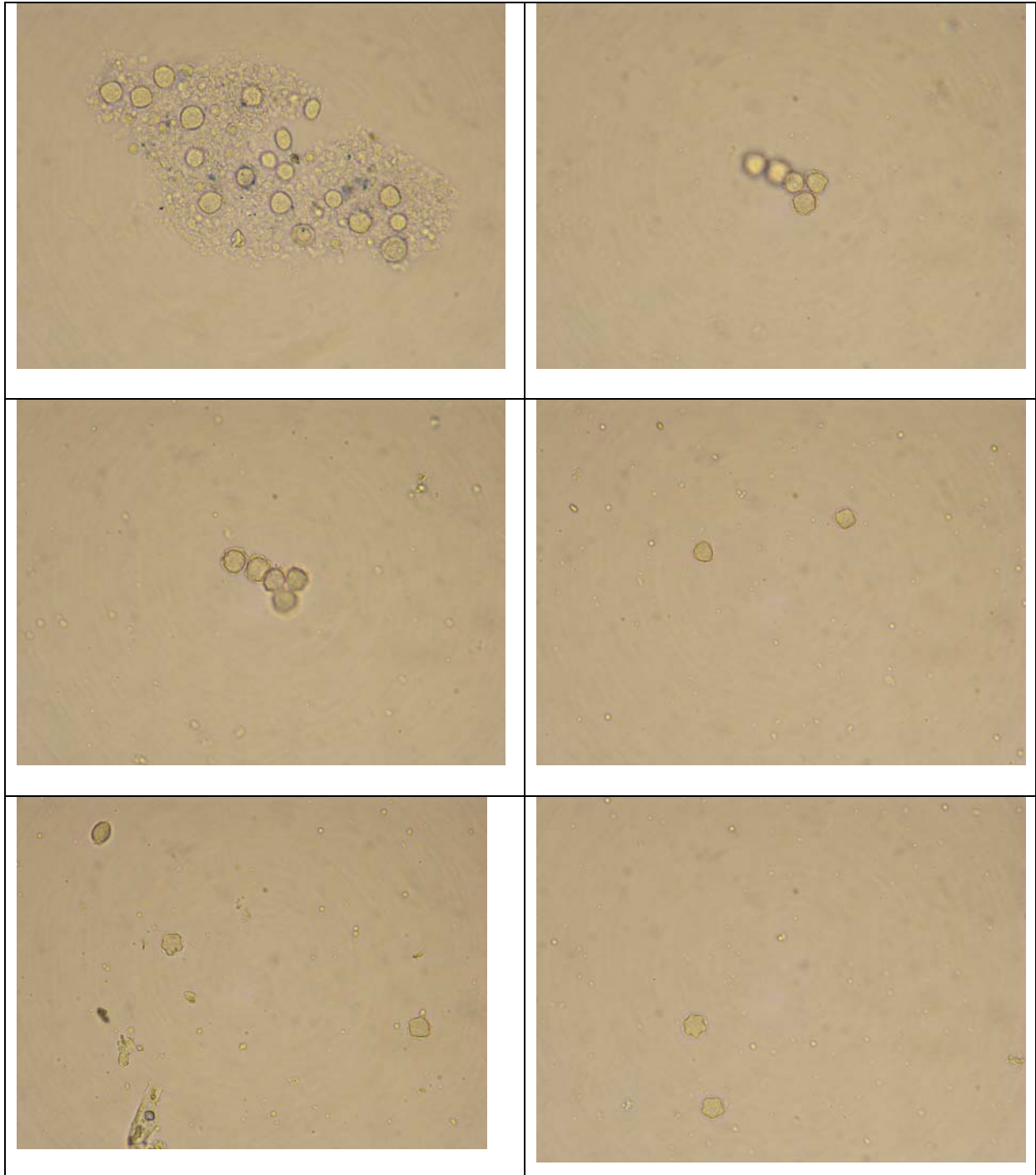
Başlangıç ısısı	95°C 7 dk	95°C 5 dk	94°C 15 dk	95°C 5 dk
Ayrılma	95°C 1 dk,	95°C 1dk	94°C 1 sn	95°C 1dk
Bağlanma	60°C 1 dk,	57°C 1 dk	58°C 5 sn	55°C 1 dk
Uzama	72°C 2 dk	72°C 1 dk	72°C 15 sn	72°C 1 dk
Döngü Sayısı	45	50	35	40
Son uzama	72°Cde 15 dk	72°C 15 dk	72°C 1,5 dk	72°C 15 dk

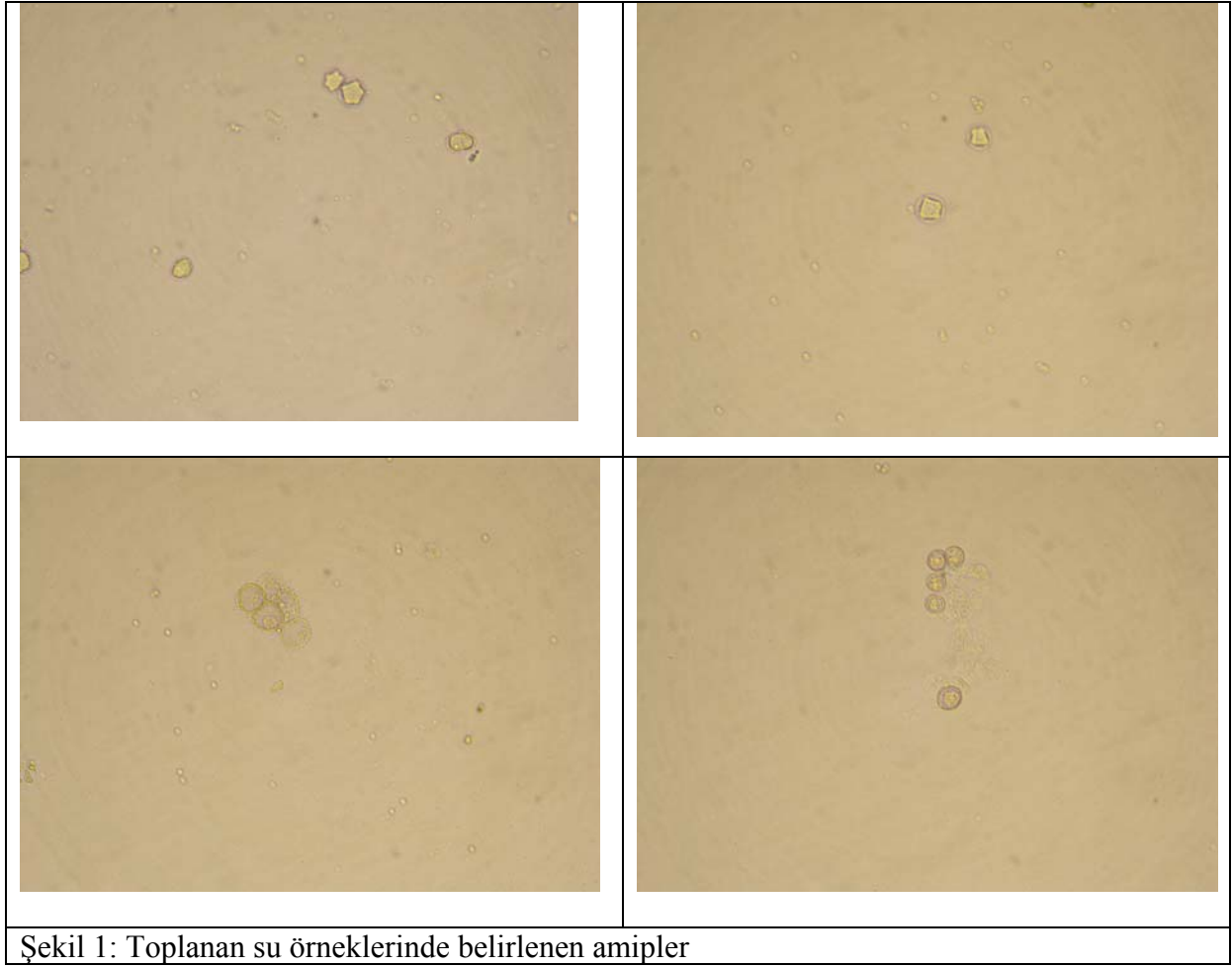
PCR reaksiyonlarında; 2x Master mix (Vivantis), 2µl 20 pmol SYA spesifik F, R primerden, 1µl genomik DNA'dan oluşan 25µl'lik karışım hazırlandı. Tablolarda belirtilen PCR şartları ve primerler kullanılarak elde edilen ürünler etidyum bromidle boyanmış % 1.5'luk agaroz jelde görüntülenerek fotoğraflandı.

DNA dizi analizi ve filogenetik analiz: Agaroz jelde görüntülenen DNA, jelden Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan DNA'ların dizi analizi hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar GENBANK'a yüklenerek BLAST analizi, MEGA 5 programıyla filogenetik analizi yapıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada; direkt mikroskopik inceleme ile 50 kuyu suyunun 7'sinde (%14), akarsu ve göletlerden elde edilen 50 su örneğinin 25'inde (%50), şebeke sularından elde edilen 200 örneğin 13'ünde (%6,5) farklı morfolojik özelliklerde amipler tespit edilmiştir. Toplanan örneklerin hepsi besleyici değeri olmayan agarda kültüre edilmiş ve direkt mikroskopide pozitif bulunan örneklerin hepsinde üreme olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). Kültürlerden PCR'ı yapılan örneklerin 5'i (%1,7) *Acanthamoeba*, 1'i (%0,3) ise *Acanthamoeba*+*Naegleria* pozitif bulunmuştur (Şekil 2,3). Su örneklerine göre pozitiflik oranları Tablo 3'te verilmiştir.

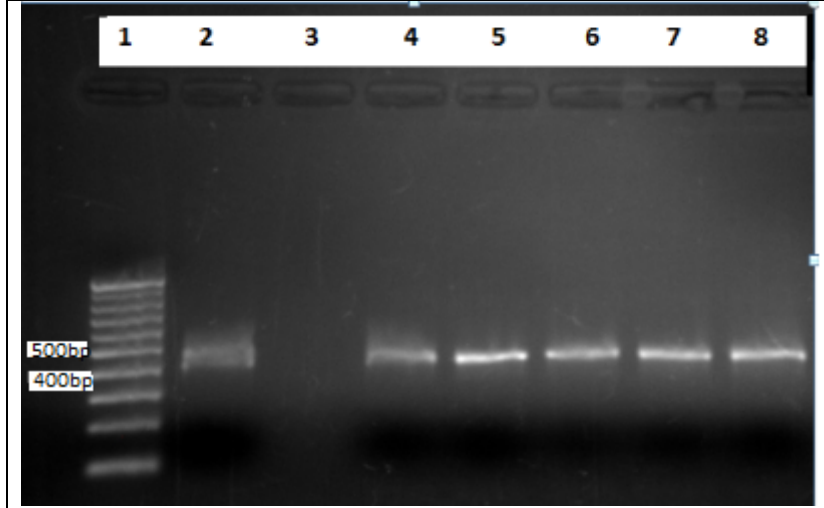




Şekil 1: Toplanan su örneklerinde belirlenen amipler

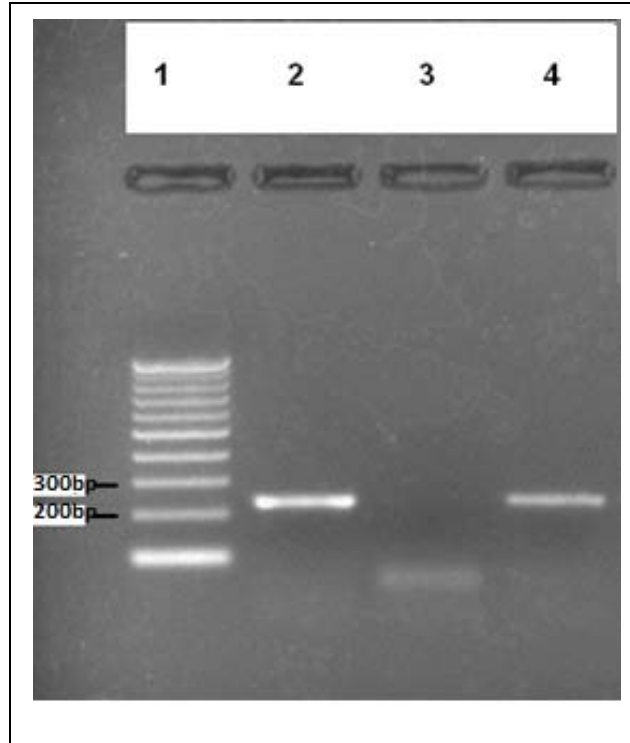
Tablo 3: Su örneklerine göre pozitiflik oranları

Bölgeler	Direkt mikroskopi	Katı besiyeri	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	<i>Sappinia</i> spp.
Kuyu suları(n:50)	7	7	5	1	-	-
Akarsu ve gölet(n:50)	25	25	-	-	-	-
Şebeke suyu (n:200)	13	13	1	-	-	-
Toplam (n:300)	45	45	6	1	-	-



Şekil 2: *Acanthamoeba sp.* pozitif olarak belirlenen kuyu suları: 1.100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis); 2.Pozitif kontrol 423-551 bp *Acanthamoeba castellanii*; 3.Negatif kontrol; 4-8. *Acanthamoeba sp.* pozitif su örnekleri

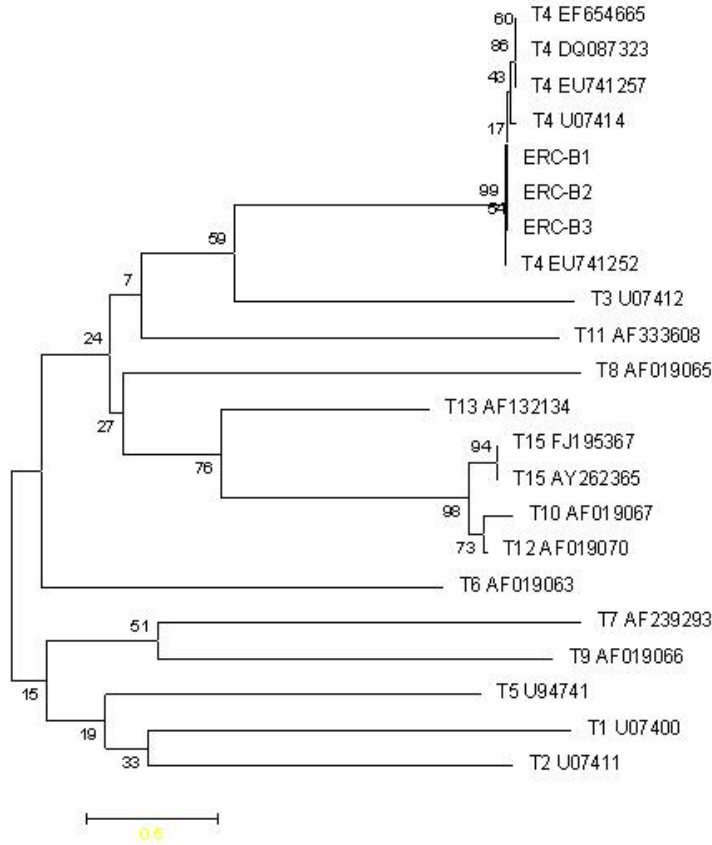
Örnek alınan sularının sıcaklığı 0.8 °C ile 19.7 °C arasında değişirken, amip tespit edilen sularının sıcaklığı ise 3.8- 17.7 °C arasında değişmekte idi.



Şekil 3: *Naegleria fowleri* pozitif olarak belirlenen kuyu suları: 1.100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis); 2.Pozitif kontrol 3.Negatif kontrol; 4.Pozitif kuyu suyu örneği

Çalışmada sulardan elde edilen üç *Acanthamoeba* izolatu, ERC-B1-3 olarak adlandırıldı. ERC-B1-3 izolatlarının 18S rRNA dizi sonucu, GENBANK'tan elde edilen *Acanthamoeba* T1-T15 genotipleri ile MEGA version 5 programında Maximum Composite Likelihood distance estimates ve Neighbour-Joining algorithm kullanılarak karşılaştırıldı. Bootstrap değeri 1000 replikasyon olarak analiz edildi. Analiz sonucunda kuyu sularından elde edilen izolatların, referans *Acanthamoeba* T4 genotipler DQ087323, U07416 ve T1-T15 genotipleri ile karşılaştırılmasıyla üçünün de T4 genotipinde olduğu görüldü (Şekil 4).

Bu çalışmada elde edilen üç izolatın PCR sonrası elde edilen DNA dizilerinin analizi sonucunda GENBANK'a submit edilen ERC-B1, ERC-B2 ve ERC-B3 sırasıyla JN793396, JN793397 ve JN793398 şeklinde numaralandırıldı (EK 1).



Şekil 4. Çalışmada elde edilen üç izolatın filogenetik analizi. 1000 bootstrap replications, Bar Index: 0.5

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanların birçok yaşam alanında tespit edilen ve insanda ciddi patolojiler sebep olan SYPPA'lar hakkında gerek dünya gerekse ülkemizde sınırlı sayıda çalışma vardır.

Schuster (30), çevre sularından, *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türlerini izole ettiğini, fakat *Balamuthia* izole edemediğini; Tsvetkova ve arkadaşları (39), Bulgaristan da göl, nehir ve sıcak su kaynaklarından alınan 280 örnekten 171'inden *Acanthamoeba* spp. ve *Hartmannella* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Caumo ve Rott (40) 65 farklı yüzme havuzundan aldıkları su örneklerinin 13(%20)'ünde SYA'ları izole ettiklerini ve bu amiplerin hepsinin morfolojik olarak *Acanthamoeba* cinsine ait olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *Acanthamoeba* türlerinden 9'unun T5, 3'ünün T4, 1 tanesinin T3 genotipinde olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde ise oldukça sınırlı sayıda bulunan çalışmaların büyük bir kısmı vaka raporu şeklindedir. Sivas'ta yapılan bir tez çalışmasında kuru toprak örneğinde ve bir su birikintisinin altındaki çamur ve etrafındaki toprak örneğinden yapılan ekimlerde, *Acanthamoeba* ve bir örnekte 'leptomyxid' izole edildiği, fakat laboratuvar farelerinde yapılan deneylerde bunların patojen etki göstermedikleri bildirilmiştir. Aynı zamanda pozitif bulunan çamur örneği üzerindeki su birikintisinden alınan örnekte ise üreme olmadığı bildirilmiştir. Çeşmeden akan kaplıca suyunda herhangi bir amibe rastlanmazken, suyun aktığı küvetin dibinden aldıkları kazıntı örneğinde *Naegleria* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada kükürtlü kaplıca sularının oluşturduğu dereden aldıkları örnekte ise *Acanthamoeba* türlerinin ve değişik cinsteki amiplerin ürediği bildirilmiştir (41). İzmir'de yapılan başka bir çalışmada ise, yakınması olmayan 54 hastanın sağ ve sol lensi kullanım süresi olan beşinci hafta sonunda *Acanthamoeba* spp. ve bakteriyel kontaminasyon açısından incelenmiştir. İncelenen bu örneklerinden birinden *Acanthamoeba* spp. trofozoit ve kistlerinin üretildiği bildirilmiştir (42). 2004 yılında Kılıç ve arkadaşları (43) Ankara'da çevresel örneklerde, *Acanthamoeba* keratitinde T4 izolatlarının üstünlüğünün daha fazla virulansa ya da daha sık bulunmasına bağlı olup olmadığını belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, 28 toprak, 2 su örneği incelemiş ve bunlardan 18'in de *Acanthamoeba* ürediği, pozitif bulunan örneklerden 10'unun T2, 5'inin T3, 2'sinin T4 ve birinin T7 genotipinde olduğunu, ayrıca bunlardan T3 ve T4'ün diğerlerine göre daha fazla patojenik özellik gösterdiğini bildirmiştir.

1996 yılında Türkiye’de ilk *Acanthamoeba keratiti* olgusunu bildirmiş olup (44) 1999 (45) ve 2006 (46) yıllarında da *Acanthamoeba keratiti* olgusu bildirilmiş fakat bu üç raporda da genotiplendirme yapılmamıştır. 2007 yılında Ertabaklar ve arkadaşları (47) 22 yaşında kontak lens kullanmayan ve korneada travma öyküsü olmayan bir erkek hastanın kornea kazıntısında *Acanthamobae* tespit ettiklerini ve bunun T4 genotipi olduğunu bildirilmişlerdir. Ayrıca aynı bölgeden aldıkları 3 farklı örnekte (lens saklama kutusu, musluk suyu ve toprak örneği) *Acanthamobae* tespit ettiklerini, bunlardan musluk suyundan alınan örnektekini *Acanthamobae* genotip T4 olarak diğer iki bölgeden alınan ise genotip T9 olarak tanımlamışlar. Bu çalışmada ilk kez Türkiye de T9 genotipi bildirdiklerini belirtmişlerdir. 2008 yılında Ozkoç ve arkadaşları (48) kontak lens kullanmayan fakat minör travma öyküsü olan iki hastanın birinde *Acanthamobae* genotip T4 diğerinde ise *Paravahlkampfia* spp. bildirilmiştir. 2009 yılında Ertabaklar ve arkadaşları (49) kontakt lens kullanan *Acanthamoeba keratiti* olgudan izole edilen örneği “T4” genotipinde “*Acanthamoeba castellanii*” olarak tanımlanmıştır.

Gianinazzi ve arkadaşları 2009 (50) yılında yaptıkları bir çalışmada sıcaklıkları 9.2 ile 29.3 arasında değişen 20 örneğin 18(%90)’inde; 2010 (51)’da yaptıkları farklı bir çalışmada 4 farklı kaplıcadan sıcaklıkları 33 ile 40 °C arasında değişen toplam 31 su örneği incelemiş ve bu örneklerin 9 (%29)’unda SYPPA’ları belirlediklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda sıcaklıkları 0.8 °C ile 19.7 °C arasında değişen kuyu suları incelenmiş ve bunların %20.6’sında SYPPA’lar belirlenmiştir. Örnekleri aldığımız kuyu suyu sıcaklıklarının düşük olmasının, SYA pozitifliğine etki edebileceğini düşünmekteyiz.

Yaptığımız literatür taramasına göre, bu çalışmanın kuyu sularında SYPPA’larla ilgili ilk çalışma olduğu tespit edilirken, bu çalışma ile Kayseri ve çevresindeki şebeke, kuyu ve göl-gölet sularında SYPPA varlığı gösterilmiş ve bu amiplerin izolasyonu ve genotiplendirilmesi yapılmıştır.

Sonuç olarak: “Su kaynaklarında insan için patojen serbest yaşayan amiplerin araştırılması” başlıklı proje ile içme suyu kaynaklarından 200 numune, kuyu sularından 50 numune ve akarsu ve göletlerden 50 numune olmak üzere toplam 300 numune toplanmış ve serbest yaşayan amipler açısından değerlendirilerek hedeflenen amaca ulaşmıştır.

Bu proje sonrasında; çalışmadan elde edilen sonuçlarla makale yazma çalışmasına başlanmıştır. Daha fazla sayıda örneklerin test edilmesi ve tespit edilen izolatların in-vitro

sitotoksosite ve in-vivo patojenitelerinin araştırılarak çalışmanın daha geniş su kaynaklarına uygulanması gerektiği kanaatindeyiz. Bu amaçla desteklenmesi için sunulan “Türkiye’deki Sularda Serbest Yaşayan Potansiyel Patojen Amiplerin İn vitro Sitotoksosite ve İn vivo Patojenitesinin Araştırılması” başlıklı 259.780 TL bütçeli bir projemiz TÜBİTAK tarafından kabul edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Martinez AJ, Visvesvara GS** 1997. Free-living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 7: 583–598.
2. **Schuster FL, Visvesvara GS** 2004a. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34: 1001–1027.
3. **Visvesvara GS, Maguire JH** 2006. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Tropical Infectious Diseases*, Vol. 2 (Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds), pp. 1114–1125. Churchill Livingstone.
4. **Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA et al.** 2005. The new higherlevel classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399–451.
5. **De Jonckheere JF** 2004. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist* 155: 89–103.
6. **Gast RJ** 2001. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol* 48: 609–615.
7. **Khan NA** 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30: 564–595.
8. **Köshler M, Leitner B, Blaschitz M, Michel R, Aspöck H, Walochnik J** 2006. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). *Parasitol Res* 98: 86–93.
9. **Visvesvara GS, Booton GC, Kelley DJ, Fuerst P, Sriram R, Finkelstein A, Garner MM** 2007. In vitro culture, serologic and molecular analysis of *Acanthamoeba* isolated from the liver of a keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). *Vet Parasitol* 143: 74–78.
10. **Shirwadkar CG, Samant R, Sankhe M, Deshpande R, Yagi S, Schuster FL, Sriram R, Visvesvara GS** 2006. *Acanthamoeba* encephalitis in patient with systemic lupus, India. *Emerg Infect Dis* 12: 984–986.
11. **Seal DV** 2003. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye* 17: 893–905.
12. **Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelley DJ, Fuerst PA** 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* 43: 1689–1693.
13. **Schuster FL, Visvesvara GS** 2004b. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates* 7: 41–51.
14. **Seijo Martinez M, Gonzalez-Mediero G, Santiago P, Rodriguez de Lope A, Diz J, Conde C, Visvesvara GS** 2000. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol* 38: 3892–3895.
15. **Visvesvara GS, Martinez AJ, Schuster FL, Leitch GJ, Wallace SV, Sawyer TK, Anderson M** 1990. Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J Clin Microbiol* 28: 2750–2756.
16. **Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ** 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol* 40: 504–514.
17. **Martinez AJ, Visvesvara GS** 2001. *Balamuthia mandrillaris* infection (editorial). *J Med Microbiol* 50: 205–207.
18. **Schuster FL, Dunnebacke TH, Booton GC et al.** 2003. Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J Clin Microbiol* 41:3175–3180.
19. **Jayasekera S, Sissons J, Tucker J, Rogers C, Nolder D, Warhurst D, Alsam S, White JM, Higgin EM, Khan NA** 2004. Postmortem culture of *Balamuthia mandrillaris* from the brain and cerebrospinal fluid of a case of granulomatous amoebic meningoencephalitis, using human brain microvascular epithelial cells. *J Med Microbiol* 53: 1007–1012.

20. **Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL** 2001. Balamuthia mandrillaris: in vitro cultivation and isoenzyme electrophoresis reveal differences in certain strains. Proceedings of the IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebs, (Billot-Bonef S, Cabanes PA, Marciano – Cabral F, Pernin P, Pringuez E, eds), pp. 166–171. John Libbey Eurotext, Montrouge, France
21. **Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA** 2003a. Identification of Balamuthia mandrillaris by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *J Clin Microbiol* 41: 453–455.
22. **Booton GC, Schuster FL, Carmichael JR, Fuerst PA, Byers TJ** 2003b. Balamuthia mandrillaris: identification of clinical and environmental isolates using genus-specific PCR. *J Eukaryot Microbiol* 50: 508–509.
23. **Yagi S, Booton GC, Visvesvara GS, Schuster FL** 2005. Detection of Balamuthia mitochondrial 16S rRNA gene DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 43: 3192–3197.
24. **Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ** 2006. A multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris and Naegleria fowleri. *J Clin Microbiol* 44: 3589–3595.
25. **Bravo FG, Cabrera J, Gottuzo E, Visvesvara GS** 2006. Cutaneous manifestations of infection by free-living amebas. Tropical Dermatology (Tyring SK, Lupi O, Hengge UR, eds), pp. 49–55. Elsevier Inc., Philadelphia.
26. **Huang ZH, Ferrante A, Carter RF** 1999. Serum antibodies to Balamuthia mandrillaris, a free-living amoeba recently demonstrated to cause granulomatous amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 179: 1305–1308.
27. **Deetz TR, Sawyer MH, Billman G, Schuster FL, Visvesvara GS** 2003. Successful treatment of Balamuthia amoebic encephalitis: presentation of two cases. *Clin Infect Dis* 37: 1304–1312.
28. **Finnin PJ, Visvesvara GS, Campbell BE, Fry DR, Gasser RB** 2007. Multifocal Balamuthia mandrillaris infection in a dog in Australia. *Parasitol Res* 100: 423–426.
29. **Foreman O, Sykes J, Ball L, Yang N, De Cock H** 2004. Disseminated infection with Balamuthia mandrillaris in a dog. *Vet Pathol* 41: 506–510.
30. **Schuster FL** 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* 15: 342–354.
31. **Martinez AJ** 1985. Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
32. **Moss DM, Brandt FH, Mathews MM, Visvesvara GS** 1988. High-resolution polyacrylamide gradient gel electrophoresis (PGGE) of isoenzymes from five Naegleria species. *J Protozool* 38: 26–31.
33. **Zhou L, Sriram R, Visvesvara GS, Xiao L** 2003. Genetic variations in the internal transcribed spacer and mitochondrial small subunit rRNA gene of Naegleria spp. *J Eukaryot Microbiol* 50: 522–526.
34. **Cogo PE, Scaglia M, Gatti S, Rossetti F, Alaggio R, Laverda AM, Zhou L, Xiao L, Visvesvara GS** 2004. Fatal Naegleria fowleri meningoencephalitis, Italy. *Emerg Infect Dis* 10: 1835–1837.
35. **Robinson BS, Monis PT, Dobson PJ** 2006. Rapid, sensitive, and discriminating identification of Naegleria spp. by realtime PCR and melting-curve analysis. *Appl Environ Microbiol* 72: 5857–5863.
36. **Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA and Byers TJ** 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: 1903–1911.
37. **Schild M, Gianinazzi C, Gottstein B and Müller N** 2007. PCR-based diagnosis of Naegleria sp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections, *J Clin Microbiol* 45: 564–567.
38. **Qvarnstrom Y, Da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS** 2009. Molecular confirmation of Sappinia pedata as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 199(8):1139-42.
39. **Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS and Müller N** 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria, *Parasitol Res* 92, 405–413.
40. **Caumo K and Rott MB** 2011. Acanthamoeba T3, T4 and T5 in swimming-pool water from Southern Brazil. *Acta Tropica* 117, 233-235.
41. **Akın Z** 2000. Toprak ve su örneklerinden özgür yaşayan amiplerin soyutulması, tanımlanması, özelliklerinin belirlenmesi ve patojenlerinin araştırılması. C Ü Sağ Bil Enst Parazitoloj Prog Yüksek Lisans Tezi, Sivas.
42. **Dağcı H, Gül S, Emre S, Türk M, Sönmez G, Tünger A, Yağcı A** 2001. Planlı değişim kontakt lenslerin Acanthamoeba ve bakteriyel kontaminasyon yönünden değerlendirilmesi. *İnfek Derg*, 15: 357-362.

43. **Kilic A, Tanyuksel M, Sissons J, Jayasekera S, Khan N 2004.** Isolation of Acanthamoeba isolates belonging to T2, T3, T4, and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol* 49: 246–252.
44. **Akyol N, Aşçı Z, Kükner S 1996.** Acanthamoeba keratitis: The first reported case from Turkey. *Ophthalmic Practice Asia Ed 2*: 46-48
45. **Akisu Ç, Tuğlu İ, Baka M, Durak İ, Orhan V 1999.** Acanthamoeba keratitli bir olgu: ışık ve elektron mikroskopi bulguları. *Türkiye Parazitoloj Derg* 23(3): 340-342.
46. **Demirci G, Ay GM, Karabas LV, Altintas O, Tamer GS, Çağlar Y 2006.** Acanthamoeba keratitis in a 5-year-old boy without a history of contact lens usage. case reports. *Cornea* 25(3): 356-358.
47. **Ertabaklar H, Türk M, Dayanır V, Ertug S, Walochnik J 2007.** Acanthamoeba keratitis due to Acanthamoeba genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res* 100(2): 241-246.
48. **Özkoç S, Tuncay S, Delibaş SB, 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.
49. **Ertabaklar H, Dayanır V, Apaydın P, Ertug S, Walochnik J 2009.** Olgu Sunumu: Acanthamoeba Keratiti. *Türkiye Parazitoloj Derg* 33(4): 283-285.
50. **Gianinazzi C, Schild M, Wüthrich F, Ben Nour N, Fuchslin HP, Schürch N, Gottstein B, Müller N 2009.** Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Res Microbiol* 160(6):367-74.
51. **Gianinazzi C, Schild M, Zumkehr B, Wüthrich F, Nüesch I, Ryter R, Schürch N, Gottstein B, Müller N 2010.** Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Exp Parasitol* 126(1):45-53.

EK 1

Çalışmada elde edilen izolatlardan GENBANK'a submit edilenler

Acanthamoeba sp. ERC-B1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN793396.1

FASTA Graphics PopSet

Go to:

LOCUS JN793396 401 bp DNA linear INV 08-NOV-2011

DEFINITION Acanthamoeba sp. ERC-B1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JN793396

VERSION JN793396.1 GI:355477211

KEYWORDS .

SOURCE Acanthamoeba sp. ERC-B1

ORGANISM Acanthamoeba sp. ERC-B1

Eukaryota; Amoebozoa; Centramoebida; Acanthamoebidae;

Acanthamoeba;

unclassified Acanthamoeba.

REFERENCE 1 (bases 1 to 401)

AUTHORS Kuk,S., Yazar,S., Dogan,S. and Cetinkaya,U.

TITLE Investigation of brackish water of Turkey for potentially pathogenic free-living amoebae

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 401)

AUTHORS Kuk,S., Yazar,S., Dogan,S. and Cetinkaya,U.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-SEP-2011) Department of Medical Parasitology, Erciyes

Kayseri University Faculty of Medicine, Talas Bulvari, Melikgazi, 38039, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..401

/organism="Acanthamoeba sp. ERC-B1"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="ERC-B1"

/db_xref="taxon:1109609"

/PCR_primers="fwd_name: jdp1, fwd_seq:

ggcccagatcgttaccgtgaa, rev_name: jdp2, rev_seq:

tctcacaagctgctagggagtc"

rRNA

<1..>401

/product="18S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 caattttctg ccaccgaata cattagcatg ggataatgga ataggaccct gtcctcctat
61 tttcagttgg ttttggcagc gcgaggacta gggtaatgat taatagggat agttgggggc
121 attaatattt aattgtcaga ggtgaaattc ttggatttat gaaagattaa cttctgcgaa
181 agcatctgcc aaggatgttt tcattaatca agaacgaaag ttaggggatc gaagacgatc
241 agataccgtc gtagtcctaa ccataaacga tgccgaccag cgattaggag acgttgaata
301 caaaacacca ccacggcgcg ggtcgtcctt ggcgtgtctc ggcttcacgg ctggggcgcg
361 cgagggcggt ttagcccggg ggcaccgggt aatgactccc t

```

//

Acanthamoeba sp. ERC-B2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN793397.1

FASTA Graphics PopSet

Go to:

LOCUS JN793397 401 bp DNA linear INV 08-NOV-2011

DEFINITION Acanthamoeba sp. ERC-B2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JN793397

VERSION JN793397.1 GI:355477212

KEYWORDS .

SOURCE Acanthamoeba sp. ERC-B2

ORGANISM Acanthamoeba sp. ERC-B2

Eukaryota; Amoebozoa; Centramoebida; Acanthamoebidae;

Acanthamoeba;

unclassified Acanthamoeba.

REFERENCE 1 (bases 1 to 401)

AUTHORS Kuk,S., Yazar,S., Dogan,S. and Cetinkaya,U.

TITLE Investigation of brackish water of Turkey for potentially pathogenic free-living amoebae

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 401)

AUTHORS Kuk,S., Yazar,S., Dogan,S. and Cetinkaya,U.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-SEP-2011) Department of Medical Parasitology, Erciyes

University Faculty of Medicine, Talas Bulvari, Melikgazi,

Kayseri

38039, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..401

/organism="Acanthamoeba sp. ERC-B2"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="ERC-B2"

/db_xref="taxon:1109610"

/PCR_primers="fwd_name: jdp1, fwd_seq:

ggcccagatcgtttaccgtgaa, rev_name: jdp2, rev_seq:

tctcacaagctgctagggagtgca"

rRNA

<1..>401

/product="18S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 caattctctg ccaccgaata cattagcatg ggataatgga ataggaccct gtcctcctat
61 tttcagttgg ttttggcagc gcgaggacta gggtaatgat taatagggat agttgggggc
121 attaatattt aattgtcaga ggtgaaattc ttggatttat gaaagattaa cttctgcgaa
181 agcatctgcc aaggatgttt tcattaatca agaacgaaag ttaggggatc gaagacgatc
241 agataccgtc gtagtcctta ccataaacga tgccgaccag cgattaggag acgttgaata
301 caaaacacca ccatcggcgc ggtcgtcctt ggcgtgtctc ggcttcacgg ctggggcgcg
361 cgagggcggt ttagcccggg ggcaccgggt aatgactccc t
```

//

Acanthamoeba sp. ERC-B3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JN793398.1

FASTA Graphics PopSet

Go to:

LOCUS JN793398 387 bp DNA linear INV 08-NOV-2011

DEFINITION Acanthamoeba sp. ERC-B3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JN793398

VERSION JN793398.1 GI:355477213

KEYWORDS .

SOURCE Acanthamoeba sp. ERC-B3

ORGANISM Acanthamoeba sp. ERC-B3
Eukaryota; Amoebozoa; Centramoebida; Acanthamoebidae;
Acanthamoeba;

unclassified Acanthamoeba.

REFERENCE 1 (bases 1 to 387)

AUTHORS Kuk,S., Yazar,S., Dogan,S. and Cetinkaya,U.

TITLE Investigation of brackish water of Turkey for potentially
pathogenic free-living amoebae

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 387)

AUTHORS Kuk,S., Yazar,S., Dogan,S. and Cetinkaya,U.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-SEP-2011) Department of Medical Parasitology,
Erciyes

University Faculty of Medicine, Talas Bulvari, Melikgazi,

Kayseri

38039, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..387

/organism="Acanthamoeba sp. ERC-B3"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="ERC-B3"

/db_xref="taxon:1109611"

/PCR_primers="fwd_name: jdp1, fwd_seq:

ggcccagatcgtttaccgtgaa, rev_name: jdp2, rev_seq:

tctcacaagctgctagggagtca"

rRNA

<1..>387

/product="18S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 cgaatacatt agcatgggat aatggaatag gaccctgtcc tcctattttc agttgggtttt
61 ggcagcgcgga ggactagggg aatgattaat agggatagtt gggggcatta atatttaatt
121 gtcagagggtg aaattcttgg atttatgaaa gattaacttc tgcgaaagca tctgccaaagg
181 atgttttcat taatcaagaa cgaaagttag gggatcgaag acgatcagat accgtcgtag
241 tcttaaccat aaacgatgcc gaccagcgat taggagacgt tgaatacaaa acaccaccat
301 cggcgcggtc gtccttggcg tgtctcggct tcacggctgg ggcgcgcgag ggcgggttag
361 cccggtggca ccggtgaatg actccct
```

//