

PAPER DETAILS

TITLE: FARKLI SU KAYNAKLARINDAN IZOLE EDILEN ACANTHAMOEBA TRLERININ
MOLEKÜLER PREVALANSI VE GENOTIPLERININ BELIRLENMESI

AUTHORS: Burcu CENIKLIOGLU,nder DÜZLÜ

PAGES: 336-342

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/2355583>



Araştırma

2022; 31(3): 336-342

FARKLI SU KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *ACANTHAMOEBA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER PREVALANSI VE GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ*
MOLECULAR PREVALANCE AND GENOTYPING OF *ACANTHAMOEBA* SPECIES ISOLATED FROM VARIOUS WATER SUPPLIES

Burcu CENİKLİOĞLU¹, Önder DÜZLÜ¹

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri

ÖZ

Bu çalışma, farklı su kaynaklarından elde edilmiş *Acanthamoeba* türlerinin moleküler prevalanslarının saptanması ve 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, Sinop ve Ordu yörelerindeki çeşme suyu, havuz suları, kaplıca ve göllerden 80 örnek toplanmıştır. Su örneklerinin kültür ortamında üretilmesini takiben, DNA izolasyonu ve PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. 18S rRNA gen bölgesi yönünden pozitif belirlenen ampikonlar klonlanmış ve plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Plazmidler vektör spesifik primerlerle sekanslanarak hedef dizilimler elde edilmiştir. İlgili sekanslarla birlikte GenBank veri tabanında kayıtlı benzer izolatları içeren toplam 31 sekanslık veri seti oluşturulmuştur. Çalışmada, Sinop yöresinde %17.1, Ordu yöresinden %20 *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Filogenetik incelemelerde, elde edilen *Acanthamoeba* izolatlarının Türkiye’den ve dünyadan rapor edilen T4 genotipine ait izolatlarla aynı dalda kümelendikleri görülmüştür. İzolatlar arasında iki haplotip saptanmış ve ortalama haplotipdiversitesi 0.682 ± 0.084 olarak belirlenmiştir. 18S rRNA veri setinde, TRERUAcantha1 ve TRERUAcantha2 haplotiplerinin de bulunduğu T4 genotipindeki tüm izolatların %100 identik oldukları belirlenmiştir. Filogenetik analizlerde T4 genotipindeki izolatların monofiletik yapılanma gösterdiği saptanmıştır. T4 genotipinde oldukları saptanan izolatlarımızın %99.9 ile Almanya’da kontakt lensten izole edilen ve T13 genotipinde yer alan KaBo (KJ476522) izolatıyla en yakın benzerliği gösterdiği görülmüştür.

ABSTRACT

This study was conducted to determine the molecular prevalence of *Acanthamoeba* species isolated from various water sources and to determine their molecular characteristics for the 18S rRNA gene region. In this study, a total of 80 samples were collected from fountain water, pool water, hot springs and lakes in Sinop and Ordu provinces. Following the production of water samples in the culture medium, DNA isolation and PCR analyzes were performed. Amplicons determined positive for the 18S rRNA gene region were cloned and plasmid purification was performed. Target sequences were obtained by sequencing the plasmids with vector-specific primers. A total of 31 sequence data sets were created, containing similar isolates registered in the Gen Bank database, together with the relevant sequences. In the study, 17.1% *Acanthamoeba* positivity was found in the Sinop region and 20% in the Ordu region. In phylogenetic analyses, it has been shown that the obtained *Acanthamoeba* isolates clustered in the same cluster with the T4 genotype isolates from Turkey and the world. Two haplotypes were detected among the positive isolates and the mean haplotype diversity was 0.682 ± 0.084 . In the 18S rRNA dataset, all isolates in the T4 genotype, including the TRERUAcantha1 and TRERUAcantha2 haplotypes, were 100% identical. In phylogenetic analyzes, isolates in the T4 genotype showed a monophyletic structure. It was observed that our isolates found to be T4 genotype showed 99.9% identity with KaBo (KJ476522) isolate identity, which was isolated from contact lenses in Germany and included in the T13 genotype.

Anahtar kelimeler: 18S rRNA, *Acanthamoeba*, genotiplendirme, moleküler prevalans, su örneği

Keywords: 18S rRNA, *Acanthamoeba*, genotyping, molecular prevalence, water sample.

*Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde yürütülen aynı başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 05.04.2022
 Makale Kabul Tarihi: 30.06.2022

Corresponding Author: Prof. Dr. Önder DÜZLÜ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Talas/ Kayseri, onderduzlu@erciyes.edu.tr, ORCID: 0000-0002-6951-0901

Burcu CENİKLİOĞLU, burcu_cenikli@hotmail.com, 0000-0002-8676-3599

GİRİŞ

Acanthamoeba türleri toprak, hava, tatlı su, yüzme havuzları, musluk suyu ve okyanus çökeltileri gibi çeşitli insan ortamlarında yaşamaya uyum sağlamış ve doğada serbest yaşayan bir amiptir. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde hayatı tehdit eden granülatöz amibik ensefalite (GAE) ve kontakt lens kullananlarda görmeyi tehdit eden amip keratitine neden olan bu protozoon son zamanlarda daha fazla dikkat çekmeye başlamıştır. Nitekim, son yıllarda GAE kaynaklı ölüm oranları ve keratite bağlı göz hasarları vakalarında artış gözlemlenmiştir (1,2).

Acanthamoeba türlerinin tanımlama ve alt cins düzeyinde klasifikasyonunda sıkıntılar bulunmaktadır. *Acanthamoeba* türlerinin cins düzeyde tanımlanması morfolojik özellikler ile yapılabilmektedir. Pussard ve Pons (3), kist büyüklüğü ve diğer morfolojik özelliklerine göre *Acanthamoeba* türlerini üç morfolojik gruba ayırmıştır. Grup 1'deki *Acanthamoeba* spp. nispeten büyük kistler, belirgin yıldız şeklinde endokistler ve pürüzsüz küresel ektokistlere sahiptir. Grup 2 ve Grup 3'teki *Acanthamoeba* spp. ise daha küçük kistlere sahiptir (çapı 18 µm'den az). Grup 2'deki türler düzensiz veya buruşuk ektokistlerle yıldız şeklinde endokistleri poligonal hale getirirken, Grup 3'teki türlerinin kistleri kalaylı ve pürüzsüz veya hafif buruşmuş ektokistleri olan yuvarlak veya hafif açısız endokistlere sahiptir. Gruplandırma, amip türlerinin tanımlanmasından önce yaygın olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, kistin morfolojik özellikleri kültür koşulları ile değişebilir ve aynı suş içerisinde oldukça değişken yapıya bürünmektedir. Bu nedenle, türlerin sadece morfolojiye dayalı tanımlanması zorlukla mümkün olabilmektedir (4,5). Bu güçlüklerin üstesinden gelmek amacıyla *Acanthamoeba* türlerinin taksonomik sınıflandırılmasında izoenzim analizi, RFLP metodu ve özellikle 18S rRNA gen bölgesinin sekans analizleri gibi moleküler metotlar kullanılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Son yıllarda moleküler çalışmaların hız kazanmasıyla *Acanthamoeba* türlerinin genotiplere ayrıldıkları belirlenmiştir. Bu genotiplendirme çalışmaları sonucu birçok patojen ve apatojen türlerin tespiti yapılmış ve yeni tanı yöntemleri geliştirilerek tedavide daha etkin ilaçlar keşfedilmeye başlamıştır. *Acanthamoeba* türleri üzerindeki artan araştırma ilgileri ve dünya çapında ileri moleküler tekniklerin mevcudiyeti şüphesiz ek genotiplerin tanımlanmasına sebep olacaktır. Bu çalışmalar, *Acanthamoeba* türlerinin ekosistemdeki bakteriyel simbiyozun yanı sıra birincil ve ikincil insan enfeksiyonlarına neden olmadaki rolünü netleştirmeye yardımcı olacaktır (6).

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

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Sahası ve Su Örneklerinin Toplanması

Çalışma, Aralık 2018 ve Haziran 2019 tarihleri arasında Sinop'un Merkez ve Gerze ilçeleriyle Ordu'nun Fatsa ve Kumru ilçelerindeki çeşme suyu, havuz suları, kaplıca ve göllerden toplanmış toplam 80 örnek üzerinde yürütüldü. Çalışmanın örneklem büyüklüğü; alfa=0.05, etki büyüklüğü d=0.3 ve power'i da %80 alındığında yaklaşık 80 olarak hesaplandı. Toplanan örnekler uygun şartlarda laboratuvara intikal ettirildi. Bu çalışma kapsamında, **29/01/2016 tarih ve 04 sayılı** Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nin 8. Maddesinin "k" bendi kapsamında Etik Kurul onayına gerek bulunmamaktadır.

Örnekler İçin Besi Yeri Hazırlanması ve Kültür İşlemi

Sahadan toplanan su örneklerinin kültür ortamında üretilmesi için besiyeri hazırlanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 12 gr agar (American Bacteriological Agar) 500 ml'lik distile su içerisine eklendi ve karıştırılarak süspansiyon elde edildi. 121°C'de 20 dk süresince otoklavlanan karışım petrilere dökülerek 4°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün ekim gerçekleştirilmeden önce besiyerlerine *E. coli* sürüldü. Pastör pipetiyle alınan örnekler besiyeri değeri olmayan non-nutrient agar (NNA) besiyerine ekilerek 28°C'lik etüvün içerisinde 10 gün inkübasyona bırakıldı. Üreme gözlemlenen alanlardan agar kesilerek 60°C'de sıvı hale getirildi. Çözündükten sonra 15.000 rpm'de santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı atıldı ve dipteki kısım DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

Genomik DNA İzolasyonu ve 18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Su örneklerinden *Acanthamoeba* genomik DNA'sının ekstrakte edilmesi amacıyla AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kiti (AP-MN-MS-GDNA-250, Axygen Biosciences, USA) kullanıldı ve kit prosedürü uygulandı. Takiben, *Acanthamoeba* DNA örneklerinin, 18S rRNA gen bölgesini çoğaltan JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTA CCGTGAA-3') ve JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3') primerleriyle (7) PCR işlemleri gerçekleştirildi. Termal profil ön denatürasyon: 94°C'de 5 dk; 40 siklus, denatürasyon 94°C'de 1 dk, yapışma 60°C'de 1 dk, uzama 72°C'de 1 dk ve final uzama 72°C'de 5 dk olarak ayarlandı (7).

18S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid İzolasyonu

18S rRNA gen bölgesi yönünden pozitif bulunan izolatlardan seçilen ampiklonlar ilgili gen bölgelerinin kayıpsız sekansının elde edilebilmesi amacıyla klonlandı ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutuldu. PCR ürünlerinin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın prosedürleri takip edilerek hedef 18S rRNA gen bölgesini ihtiva eden rekombinant plazmid DNA'lar elde edildi.

Sekans ve Filogenetik Analizler

Plazmid DNA'lar, pJET1.2 primerleri ile çift yönlü sekanslandı. Geneious R10 (8) yazılımı ile vektör nükleotid sekansı içerisinde insert olan hedef gen bölgesi belirlenip final dizilimler elde edildi. Elde edilen sekansların çoklu hizalamaları yapılarak moleküler karakterizasyonları sağlandı ve GenBank kayıtları gerçekleştirildi. DNA polimorfizmi ve haplotip yapısı DnaSP 5.10.01 (9) yazılımı ile belirlendi. Türü içi ve türler arası genetik farklılıklar Kimura two-parameter (K2P) uzaklık modeli (10,11) kullanılarak MEGA 7 yazılımında (12)

gerçekleştirildi. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulandı ve ML analizlerinde en uygun substitution modelin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (13) kullanıldı. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanıldı.

BULGULAR

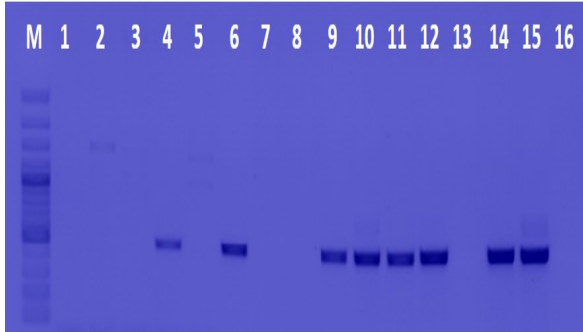
18S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyon Sonuçları

Sinop ve Ordu yörelerinden toplanarak kültür ortamında üretilen su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonları sonucu yaklaşık 423-530 bp uzunluğu arasında bant elde edilen örnekler pozitif olarak kabul edildi. Konvansiyonel PCR analizleriyle incelenen 80 su örneğinde tespit edilen *Acanthamoeba* türlerinin dağılımı Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. İncelenen su örneklerinde *Acanthamoeba* spp. Prevalansı

Örnekleme Bölgesi	Örnek Sayısı	Pozitif Örnekler (n/%)
Sinop/Merkez	21	2 (%9.5)
Sinop/Gerze	14	4 (%28.6)
Ordu/Fatsa	26	5 (%19.2)
Ordu/Kumru	19	4 (%21.1)
Toplam	80	15 (%18.8)

PCR analizleri sonucu *Acanthamoeba* pozitif belirlenen bazı izolatların 18S rRNA geninin parsiyel amplifikasyonu (450 bp) sonucu elde edilen ampikonların %1.5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil I'de verilmiştir.



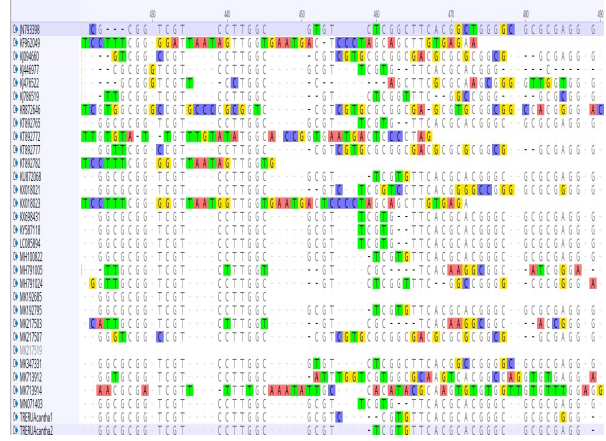
Şekil I. *Acanthamoeba* izolatlarının parsiyel 18S rRNA gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen ampikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 4, 6, 9-12, 14: Pozitif örnekler; 1-3, 5, 7, 8, 13: Negatif örnekler; 15: Pozitif kontrol; 16: No DNA

18S rRNA Geninin Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Elde edilen plazmidler vektör spesifik primerlerle çift yönlü sekanslanmıştır. Nükleotid dizileri vektör sekansı ile hizalanmış ve 18S rRNA gen bölgesinin sekansları elde edilmiştir. *Acanthamoeba* izolatlarından %100 identik olanlardan sadece bir tanesinin GenBank kaydı gerçekleştirilmiştir. İlgili sekanslar, GenBank veri tabanında Blastn analizlerine tabii tutularak Türkiye ve

Dünyanın farklı bölgelerinden veri tabanına kaydedilmiş izolatları içeren ve toplam 31 sekanstan oluşan 18S rRNA veri seti oluşturulmuştur.

18S rRNA gen bölgesine göre çalışmamızda elde ettiğimiz *Acanthamoeba* izolatları ile farklı coğrafik bölgelerden ve farklı kaynaklardan (toprak, su, lens vb.) izole edilen *Acanthamoeba* suşları arasında birçok nükleotid varyasyonu saptanmıştır (Şekil II).

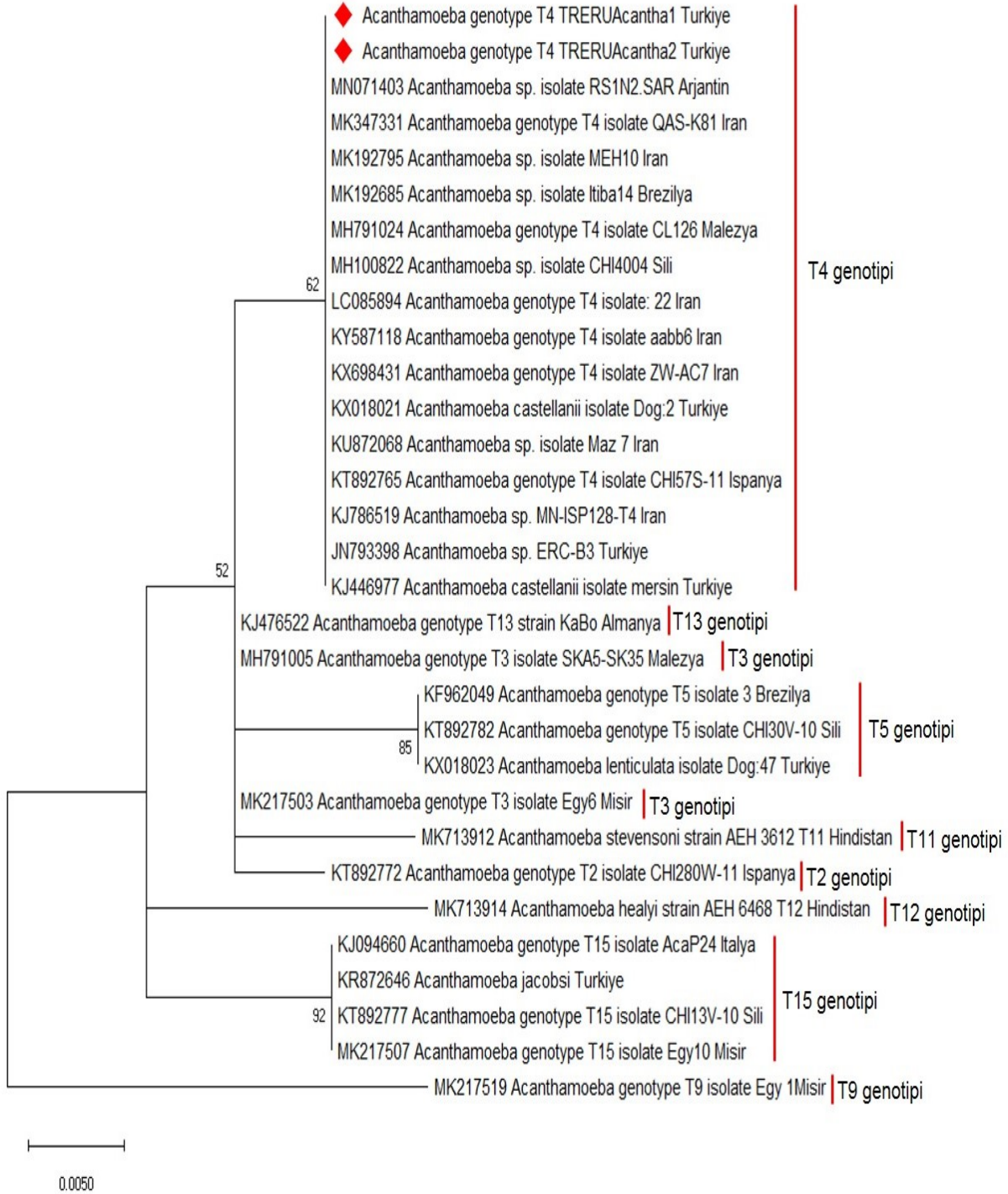


Şekil II. Su örneklerinde belirlenen *Acanthamoeba* izolatları ile Dünyadaki ve Türkiye'deki diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesindeki nükleotid farklılıkları

Filogenetik ağaçta (Şekil III), *Acanthamoeba* izolatlarımızın Türkiye'den ve dünyadan bildirilen T4 genotipine ait izolatlarla birlikte kümelendikleri saptanmıştır. *Acanthamoeba* izolatları arasında 2 haplotip (TRERUAcantha1-2) saptanmış ve ortalama haplotip diversitesi 0.682 ± 0.084 olarak belirlenmiştir. 18S rRNA veri seti içerisinde TRERUAcantha1 ve TRERUAcantha2 izolatlarının da yer aldığı T4 genotipi içerisindeki tüm izolatların birbirleriyle %100 identik oldukları tespit edilmiştir. Genotip bazında grupta yapıldığında ise T4 genotipindeki izolatlarla T5, T15, T13, T2, T3, T9, T11 ve T12 genotipleri arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla 0.051 ± 0.015 , 0.029 ± 0.011 , 0.012 ± 0.007 , 0.033 ± 0.012 , 0.020 ± 0.009 , 0.034 ± 0.013 , 0.020 ± 0.009 ve 0.047 ± 0.015 olarak tespit edilmiştir. ML analizlerinde T4 genotipindeki izolatların monofiletik yapılanma gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz iki izolatımızın da yer aldığı T4 genotipindeki izolatların en yakın benzerliği, %99.9 ile T13 genotipinde bulunan ve Almanya'da kontakt lensle izole edilen KaBo (KJ476522) izolatıyla gösterdiği görülmüştür.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Acanthamoeba türlerinin teşhisinde mikroskopik inceleme ve kültürün yanı sıra son yıllarda moleküler yöntemlerde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Mikroskopik inceleme yöntemi diğer teşhis yöntemlerine göre duyarlılığı düşük olmasına rağmen gerek çabuk sonuç vermesi gerekse diğerlerine nazaran daha ucuz maliyetli olması sebebiyle tanıda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak mikroskopik yönteminin gerek uzmanlık gerektirmesi gerekse yanlış pozitiflikler saptayabilmesi nedeni ile bu yöntemin yerini genellikle kültür metodu almaktadır. Ancak her iki yöntemin de spesifite ve sensitivite



Şekil III. Su örneklerinde saptanan *Acanthamoeba* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer bazı *Acanthamoeba* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine göre filogenetik ağacı. (Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir. ◆: Ordu ve Sinop izolatları)

moleküler yöntemlere göre daha düşük bulunmuştur. Bu kapsamda son yıllarda *Acanthamoeba* türlerinin tür ve genotip tayinlerinin yapılabilmesi için DNA barkodlanmasına dayalı teşhis yöntemleri geliştirilmiştir. Dünyada *Acanthamoeba* türlerinin DNA barkodlaması amacıyla en sık kullanılan referans gen bölgelerinin başında 18S rRNA gen bölgesi gelmektedir. Yapılan moleküler çalışmalarda *Acanthamoeba* türlerine

ait 22 farklı genotip (T1-T22) ve 20'nin üzerinde *Acanthamoeba* türü tespit edilmiştir (14-16).

Türkiye'de ve dünyada *Acanthamoeba* türlerinin prevalansı ve genotiplendirilmeleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Kilic ve ark. (17), Ankara yöresinde iki su örneği ile bitki saksılarından topladıkları 28 toprak örneğinin 18'inde, 18S rRNA gen bölgesine göre farklı genotiplerde (T2, T3, T4 ve T7) pozitiflik belirlemişler-

dir. Ertabaklar ve ark. (18), İzmir’de bir hastanın göz korneasında T4 genotipini, toprak, lens kutusu ve sudan aldıkları örneklerde ise T9 ve T4 genotiplerini rapor etmişlerdir. Özkoç ve ark. (19) İzmir’de, Ertabaklar ve ark. (20) ise Aydın’da bir hastada T4 genotipindeki *A. castellanii* türünü bildirmişlerdir. Kayseri yöresinde yapılan çalışmalardan Doğan ve ark. (21) toprak örneklerinde %40, Kuk ve ark., (22) ise eriyen kar suları, yağmur suları ve çeşme sularında %19.23 oranında *Acanthamoeba* (T4 genotipi) pozitifliği rapor etmişlerdir. Sivas’ta yapılan çalışmalarda Yünlü ve ark. (23) 500 hastada %0.2, Özçelik ve ark. (24) ise hastane ortamındaki klimalardan toplanan örneklerde %17 *Acanthamoeba* spp. pozitifliği bildirmişlerdir. Ege Bölgesi’nde ölmüş yabancı kuşlarda yapılan bir çalışmada (25) kuşların kornealarından elde edilen isolatların PCR ve sekans analizleri sonucu T4 ve T5 genotiplerine ait oldukları bildirilmiştir. Yazar ve ark. (26), Türkiye’nin farklı bölgelerinde bulunan gölet, akarsu, çay ve kuyulardan alınan toplam 664 su örneğinin 18S rRNA gen bölgesine özgü primerlerle yapılan PCR sonucunda ise dokuz örneğin *Acanthamoeba* sp. olduğunu saptamışlar ve sekans analizlerinde pozitif isolatlarının *Acanthamoeba* sp. (AB425948) ve *A. hatchetti* (AF019060) isolatlarıyla %98, *A. hatchetti* (AF260722) izolatuyla ise %99 identiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. *Acanthamoeba* türlerinin su ve toprak gibi çevresel örneklerde prevalansları ve moleküler karakterizasyonlarıyla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında bu konuda çok sayıda çalışmanın olduğu dikkati çekmiştir (27-42). 2012 yılında Tayvan’da yapılan bir çalışmada (27), nehirden örnekleme yapılan toplam 211 su örneğinin PCR ile yapılan analizlerinde farklı genotiplerde (T4, T5 ve T15) %16.1 oranında *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Benzer şekilde PCR ile yapılan moleküler çalışmalarda; İran’da (28) 27 su örneğinde %70.3, İspanya’da (29) 24 toprak örneğinde %64.5, Uganda’da (30) 324 çevre ve 84 musluk suyunda sırasıyla %33 ve %42.9 ve yine İran’da (31) 22 farklı istasyonlardan toplanan 50 su örneğinde %68 oranlarında *Acanthamoeba* pozitiflikleri rapor edilmiştir. Aynı şekilde nehir ve çeşme sularından alınan örneklerde Amerika Birleşik Devletleri’nde %7, Jamaika’da %26.4, Almanya’da %79 ve Bulgaristan’da %94, İspanya’da %21, Nikaragua’da %22.5, Japonya’da %26.3, Brezilya’da %36.1 ve Meksika’da %59.5 oranlarında *Acanthamoeba* pozitifliği bildirilmiştir (32-38). Bunun yanında; Geisen ve ark. (39) Hollanda, Tibet ve Sardunya’da toprak örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* türlerinin T2, T4, T13 ve T14 genotiplerinde, Valladares ve ark. (40) İspanya’da köpeklerden elde ettikleri isolatların T4 genotipinde, Mahmoudi ve ark. (41) İran’da su örneklerinden elde ettikleri isolatların T4 ve T5 genotiplerinde, benzer şekilde Aghajani ve ark. (38) İran’da su örneklerindeki isolatların T3, T4 ve T5 genotiplerinde, Al-Herrawy ve ark. (42) Mısır’da su örneklerindeki *Acanthamoeba* isolatların T3, T4, T5, T11 ve T15 genotiplerinde yer aldıklarını rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmamızda, Sinop ve Ordu yörelerindeki farklı su kaynaklarından toplanan su örnekleri incelenmiştir. Örneklem bölgesi olarak bu odakların tercih edilmesindeki sebep *Acanthamoeba* türlerinin gerek varlığı gerekse moleküler karakterleri ile ilgili olarak bu yöre-

lerden bildirilen bir rapora rastlanmamış olmasıdır. Çalışmamızda incelenen 80 su örneğinin 15’inde (% 18.8) *Acanthamoeba* pozitifliği tespit edilmiştir. Sinop yöresinde pozitiflik %17,1, Ordu yöresinde ise %20 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarının genel olarak Türkiye ve dünyadan bildirilen oranlarla yakınlık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda filogenetik analizlerde Sinop ve Ordu yörelerinden toplanmış su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* isolatlarının Türkiye’den ve dünyadan bildirilen T4 genotipine ait isolatlarla aynı kümede yer aldıkları görülmüş olup bu isolatların monofiletik yapılanma gösterdiği tespit edilmiştir. Türkiye’de toprak ve farklı su kaynaklarından izole edilen *Acanthamoeba* türleri arasında T4 genotipinin en sık görülen genotip olduğu, bu genotipin yanı sıra nadir de olsa T2, T3, T7 ve T9 genotiplerinin de bildirildiği göz önüne alındığında, bu çalışmada elde ettiğimiz filogenetik analiz sonuçlarının Türkiye’den bildirilen genotip sonuçlarını destekler nitelikte olduğu kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmayla; i) Sinop ve Ordu yörelerindeki farklı su kaynaklarında ilk kez *Acanthamoeba* prevalansı bildirilmiş, ii) Pozitif isolatların 18S rRNA gen bölgesinin moleküler karakterleri ortaya çıkarılarak genotipleri belirlenmiş, iii) Dünyadan benzer isolatlarla filogenetik yakınlıkları saptanmış, iv) Türkiye’nin biyolojik varlıkları olarak Genbank kayıtları gerçekleştirilmiş, v) 18S rRNA gen bölgesinin *Acanthamoeba* türlerinin genotiplendirilmesinde önemli ve belirleyici bir marker olduğu teyit edilmiş, vi) Çalışmada örnekleme yapılan çeşme suyu, havuz suları, kaplıca ve göller ile temas halindeki bölge insanları için gerek *Acanthamoeba* keratiti gerekse granüloamatöz amibik ensefalit gibi enfeksiyonlar yönünden risk potansiyelleri ortaya konulmuştur.

Çıkar Çatışması:Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Teşekkür: Pozitif kontrol DNA’sı temininde yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi’nden Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ, Ege Üniversitesi’nden Dr. Öğr. Üyesi Mehmet AYKUR ve İstanbul Üniversitesi’nden Doç. Dr. Miray ONAN ile laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Erciyes Üniversitesi’nden Arş. Gör. Gamze YETİŞİMİŞ’e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. Eye Contact Lens 2007; 33: 1-8.
2. Patel DV, McGhee CN. *Acanthamoeba* keratitis: A comprehensive photographic reference of common and uncommon signs. Clin Experiment Ophthalmol 2009; 37: 232-238.
3. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystiqueet taxonomiedu genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica 1977; 8: 557-598.
4. Sawyer T. *Acanthamoeba griffini* a new species of marine amoeba. J Protozool 1971;18: 650-654.
5. Visvesvara GS. Classification of *Acanthamoeba*. Rev Infect Dis 1991;13: 369-372.
6. Khan NA. *Acanthamoeba*: Biology and increasing

- importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30: 564-595.
7. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. J Clin Microbiol 2001; 39: 1903-1911.
 8. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 2012; 28: 1647-1649.
 9. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 2009; 25: 1451-1452.
 10. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980; 16: 111-120.
 11. Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford: Oxford University; 2005.
 12. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 2016; 33: 1870-1874.
 13. Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol 2008; 25: 1253-1256.
 14. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of human and animals. Int J Parasitol 2004; 34: 1-27.
 15. Corsaro D, Walochnik J, Venditti D, et al. Rediscovery of *Nucleophaga amoebae*, a novel member of the Rozellomycota. Parasitol Res 2014; 113: 4491-4498.
 16. Dodangeh S, Kialashaki E, Daryani A, et al. Isolation and molecular identification of *Acanthamoeba* spp. from hot springs in Mazandaran province, northern Iran. J Water Health 2018; 16: 807-813.
 17. Kilic A, Tanyuksel M, Sissons J. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4, and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. Acta Parasitol 2004; 49: 246-252.
 18. Ertabaklar H, Türk M, Dayanir V, Ertug S, Walochnik J. *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. Parasitol Res 2007; 100: 241-246.
 19. Özkoç S, Tuncay S, Delibaş SB, et al. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* spp. from two clinical samples. J Med Microbiol 2008; 57: 392-396.
 20. Ertabaklar H, Dayanir V, Apaydin P, Ertug S, Walochnik J. *Acanthamoeba* keratitis. Türkiye Parazit Derg 2009; 33: 283-285.
 21. Doğan S, Yazar S, Kuk S. Toprakta serbest yaşayan ve insanda parazitlenebilen bazı amiplerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Sağlık Bil Derg 2013; 23: 187-191.
 22. 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: 12-17.
 23. Yünlü Ö, Özçelik S, Arıcı MK. Göz kapaklarından ve konjunktivadan alınan sürüntü örneklerinde *Acanthamoeba* ve diğer serbest yaşayan amiplerin araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2015; 39: 194-199.
 24. Özçelik S, Coşkun KA, Yünlü Ö, Alim A, Malatyalı E. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. Türkiye Parazit Derg 2017; 36: 198-203.
 25. Karakavuk M, Akyurt M, Sahar EA, et al. First time identification of *Acanthamoeba* genotypes in the cornea samples of wild birds; Is *Acanthamoeba* keratitis making the predatory birds a target. Exp Parasitol 2017; 183: 137-142.
 26. Yazar S, Gürbüz E, Sönmez FM, Çetinkaya Ü, Kuk S. Türkiye'deki sularda serbest yaşayan potansiyel patojen amipler ve patojenitelerinin in vivo olarak araştırılması. Mikrobiyol Bul 2019; 50: 449-459.
 27. Kao PM, Hsu BM, Chen NH, et al. Molecular detection and comparison of *Acanthamoeba* genotypes in different functions of watersheds in Taiwan. Environ Monit Assess 2012; 184: 4335-4344.
 28. Mahmoudi MR, Taghipour N, Eftekhari M, Haghighi A, Karanis P. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. Parasitol Res 2012; 110: 473-477.
 29. Reyes-Batlle M, Cheridah D, Carmen M, et al. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Parasitol Res 2014; 113: 1383-1388.
 30. Sente C, Erume J, Naigaga I, et al. Occurrence and genetic characterization of *Acanthamoeba* spp. from environmental and domestic water sources in Queen Elizabeth Protected Area, Uganda. Parasites & Vectors 2016; 9: 127.
 31. Fallah E, Jafarpour Z, Mahami-Oskoue M, et al. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolates from surface resting waters in Northwest Iran. Iran J Parasitol 2017; 12: 355-363.
 32. Lorenzo-Morales J, Lindo JF, Martinez E, et al. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. Ann Trop Med Parasit 2005; 99: 751-758.
 33. Leiva B, Cladotter E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amoebae in water sources of León, Nicaragua. Rev Biol Trop 2008; 56: 439-446.
 34. Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhara Y, Karanis P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. Parasitol Res 2009; 105: 1109-1117.
 35. Magliano AC, da Silva FM, Teixeira MM, Alfieri SC. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. Exp Parasitol 2009; 123: 231-235.
 36. Bonilla-Lemus P, Ramírez-Bautista GA, Zamora-Munoz C, et al. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. Exp Parasitol 2010; 126: 54-58.
 37. Kao PM, Hsu BM, Chen CT, et al. Identification and

- quantification of the *Acanthamoeba* species and genotypes from reservoirs in Taiwan by molecular techniques. *Acta Tropica* 2014; 132: 45-50.
38. Aghajani A, Dabirzadeh M, Maroufi Y, Hooshyar H. Identification of *Acanthamoeba* genotypes in pools and stagnant water in ponds in sistian region in Southeast Iran. *Türkiye Parazitolo Derg* 2016; 40: 132-136.
 39. Geisen S, Fiore-Donno AM, Walochnik J, Bonkowski M. *Acanthamoeba* everywhere: High diversity of *Acanthamoeba* in soils. *Parasitol Res* 2014; 113: 3151-3158.
 40. Valladares M, Batlle MR, Carmen M, et al. Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Archive Microbiol* 2015;197: 639-643.
 41. Mahmoudi MR, Rahmati B, Seyedpour SH, Karanis P. Occurrence and molecular characterization of free-living amoeba species (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, and *Saccamoeba limax*) in various surface water resources of Iran. *Parasitol Research* 2015;114: 4669-4674.
 42. Al-Herrawy AZ, Heshmat M, Abu Kabsha SH, Gad MA, Lotfy WN. Occurrence of *Acanthamoeba* species in the damanhour drinking water treatment plant, Behera Governorate (Egypt). *Reports in Parasitology* 2017; 4:15-21.