

TOPRAKTA SERBEST YAŞAYAN VE İNSANDA PARAZİTLENEBİLEN BAZI AMİPLERİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU I

SOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME FREE-LIVING AMOEBIA IN SOIL WHICH CAN BE PARASITISING IN HUMAN

Süheyla DOĞAN<sup>1</sup>, Süleyman YAZAR<sup>1</sup>, Salih KUK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD., Kayseri

Özet

Serbest yaşayan amiplerden *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Vahlkampfia* ve *Hartmannella*; toprakta, musluk suyu, göl, nehir, yüzme havuzu gibi çeşitli su kaynaklarında, havada, lens solüsyonlarında bulunabilmektedir. Doğada serbest olarak yaşayan bu amiplerin bir kısmı insanlarda ciddi hastalıklara yol açabilmektedir. Bu çalışmada; Kayseri'nin çeşitli bölgelerinden alınan toprak örneklerinde serbest yaşayan potansiyel patojen amip türlerinin izolasyonu ve genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. Toplam 20 farklı bölgeden alınan birer örnek selüloz nitrat filtreden geçirilip *Escherichia coli* ile kaplanmış besleyici değeri olmayan agar plaklarına aktarılmıştır. 37 °C'de kültürü yapılan örneklerin iki hafta boyunca üremeleri gözlenerek, pozitif olduğu düşünülen örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* spesifik primerlerle PCR'ı yapılan toplam 20 toprak örneğinin sekizinin *Acanthamoeba*, üçünün *Naegleria* pozitif olduğu belirlenirken, örneklerin hiçbirinde *Balamuthia* saptanmamıştır. Bu çalışma ile insan sağlığı açısından tehdit oluşturabilecek serbest yaşayan bazı amip türlerinin varlığı Kayseri'deki toprak örneklerinde gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Serbest yaşayan amipler, PCR, besleyici değeri olmayan agar, Kayseri

GİRİŞ

Toprak ve suda yaygın olarak bulunan serbest yaşayan amipler (SYA) dünyada kozmopolit bir dağılıma sahiptir. Bu amiplerden *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* ve *Sappinia* cinslerine ait bazı türler insan ve hayvan vücuduna girdiklerinde başta beyin hasarı olmak üzere ciddi patolojilere

Abstract

*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella* of the free-living amoeba are commonly encountered in soil, air, lens solutions and water sources such as tap water, lakes, rivers and swimming pools. Some of those free-living amoeba may cause serious diseases in human. The main objective of this study is to isolate and genotype the free-living potential pathogen amoeba species in the soil samples obtained from different regions of Kayseri. Each of the total 20 samples are passed through cellulose nitrate filter and transported to the non nutritional plates and coated with *Escherichia coli* agar. The samples which are cultured at 37 °C are observed for two weeks in order to observe the reproduction and isolate the DNA samples that are thought to be positive. Eight of the 20 samples which are undergoing PCR with specific primers were *Acanthamoeba* positive and three of them were *Naegleria* positive. Besides, *Balamuthia* was not detected in any of the samples. In conclusion, in this study the presence of some free-living amoeba species which may threaten human health is shown in the soil samples obtained from Kayseri.

**Key words:** Free living amoeba, PCR, non nutritional agar, Kayseri

re sebep olabilmektedir (1). SYA'lardan *Acanthamoeba* spp. ve *Balamuthia* spp. türleri immun sistemi baskılanmış kişilerde akciğer ve deri enfeksiyonlarının yanı sıra kronik ve çoğunlukla ölümcül granülomatöz amibik ensefalite (GAE) de neden olmaktadır (2). *Naegleria fowleri*

Makale Geliş Tarihi : 19.01.2012

Makale Kabul Tarihi:11.12.2013

Corresponding Author: Dr. Süleyman Yazar Parazitoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 38039, TURKEY.

Tel: + 90 352 207 66 66/ 23401

Fax: 00 90 352 4375285

e-mail: syazar@erciyes.edu.tr

ise durgun ve tatlı sularda yüzme öyküsü olan sağlıklı çocuklarda ve genç erişkinlerde akut, fulminant, nekrotik ve hemorajik seyirli ölümcül primer amibik meningoensefalite (PAME) neden olmaktadır (3). Son zamanlarda, *Sappinia diploidea*'nın sığır, bizon ve geyik dışkıları ile kontamine olmuş topraktan, sağlıklı genç bir insanda ensefalite neden olduğu bildirilmiştir (4).

Bu çalışmada; Kayseri'nin çeşitli bölgelerinden alınan toprak örneklerinde serbest yaşayan potansiyel patojen amip türlerin izolasyonunu ve genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Örneklerin toplanması:** Kayseri'nin 20 farklı bölgesinden yerden 2 cm yüzeyden toplanan toprak örneklerinin her biri 50 ml'lik falcon tüplerine aktarıldı ve distile su ile sulandırıldıktan sonra santrifüj edilen örnekler selüloz nitrat filtreden (sartorius stedim) geçirildi. Her filtre iki eşit parçaya ayrılarak *Escherichia coli* ile kaplanmış Page'in amip solüsyonuyla (2.5 mM NaCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ve 20 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) hazırlanmış %1.5'lük besleyici değeri olmayan agar (1.5 g agar 1000 ml Page'in amip solüsyonunda çözdürüldü ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı) (BDOBY) plaklarına ters bir şekilde konuldu ve bu örnekler iki hafta 37 °C 'de inkübe edildi. Katı besiyerinde üreme olduğu gözlenen bölgelerden agar kesilerek alındı ve 55 °C'de tamamen çözünmesi beklendi. Çözündükten sonra 18.000 rpm'de santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı atıldı ve dipteki kısımdan DNA izolasyonu, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) kullanılarak üretici firma açıklamalarına göre yapıldı. Genomik DNA -20 °C'de kullanılabilecek kadar saklandı.

**Kullanılan Primerler ve PCR Şartları:** Elde edilen genomik DNA'lar *N. fowleri*, *Sappinia* spp., *Acanthamoeba* spp. ve *B. mandrillaris* spesifik primerleri ile PCR analizine tabi tutuldu. *Acanthamoeba* spp.(5) için,

rRNA genin kodladığı multipik *Acanthamoeba* spesifik Nelson F (5'- GTTTGAGGCAATAACAGGT-3') ve Nelson R (5'-GAATTCCTCGTTGAAGAT-3) primerleri ile 229 bp'lik DNA parçası çoğaltıldı.

PCR için termal profil ön denatürasyon 94 °C'de 10 dakika; denatürasyon 94 °C'de 30 saniye; bağlanma 55 °C'de 1.5 dakika; uzama 72 °C'de 1 dakika 50 siklus ve son uzama 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

18S rDNA gen bölgesine spesifik JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3) ve JDP2 (5'-TCTACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3') primerleri ile

423-551 bp'lik DNA parçası çoğaltıldı.

PCR için termal profil ön denatürasyon 95 °C'de yedi dakika; denatürasyon 94 °C'de 1.5 dakika; bağlanma 60 °C'de bir dakika; uzama 72 °C'de iki dakika 45 siklus ve son uzama 72 °C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

### *Naegleria fowleri* (6) için,

SSU rRNA gen bölgesine spesifik Nae3-F (5'-CAAACACCGTTATGACAGGG-3') ve Nae3-R (5'-CTGGTTTCCCTCACCTTACG-3') primerleri ile 141-323 bp'lik DNA parçası çoğaltıldı.

PCR için termal profil ön denatürasyon 95 °C'de 15 dakika; denatürasyon 95 °C'de bir dakika; bağlanma 57 °C'de bir dakika; uzama 72 °C'de bir dakika 35 siklus ve son uzama 72 °C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

### *Balamuthia mandrillaris* (7) için,

16S rRNA gen bölgesine spesifik Balspec-F (5'-CGCATGTATGAAGAAGACCA-3') ve Balspec-R (5'-TTACCTATATAATTGTGCGATATACCA-3') primerleri kullanılarak 230 bp'lik DNA parçası çoğaltıldı.

PCR için termal profil ön denatürasyon 95 °C'de 15 dakika; denatürasyon 94 °C'de 10 saniye; bağlanma 58 °C'de beş saniye; uzama 72 °C'de 15 saniye 40 siklus ve son uzama 72 °C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

### *Sappinia* spp. (8) için,

16S rRNA gen bölgesine spesifik Sapp-F1576 (5'-TCTGGTCGCAAGGCTGAAAC-3') ve Sapp-R1736 (5'-GCACCACCACCCTTGAATC-3') primerleri kullanılarak 160 bp'lik DNA parçası çoğaltıldı.

PCR için termal profil ön denatürasyon 95 °C'de 5 dakika; denatürasyon 95 °C'de bir dakika; bağlanma 55 °C'de bir dakika; uzama 72 °C'de bir dakika 40 siklus ve son uzama 72 °C'de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

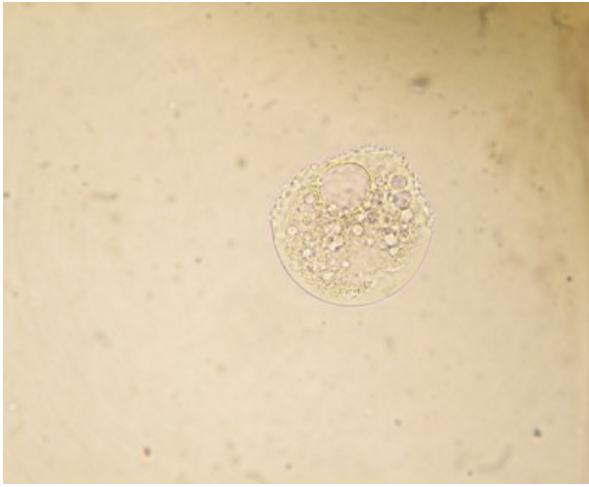
PCR reaksiyonlarında; 2x Master mix (Vivantis), 2µl 20 pmol SYA spesifik F,R primerden, 1µl genomik DNA'dan oluşan 25µl'lik karışım hazırlandı.

PCR ürünleri etidyum bromidle boyanmış % 1.5'lük agaroz jelde görüntülenerek fotoğraflandı.

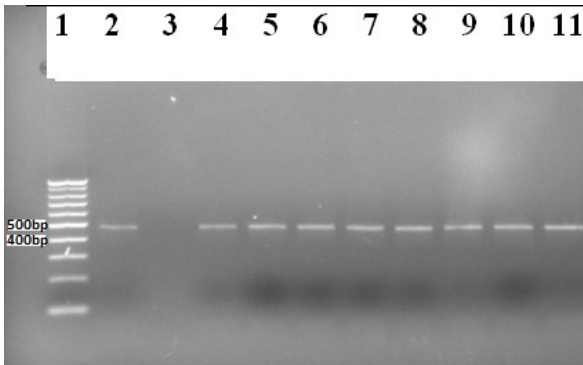
**DNA Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz:** Agaroz jelden saflaştırılan PCR ürününün DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen izolatlar GENBANK'a kaydedilip submit edilen diğer izolatlarla BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı ve DNA dizi analiz sonuçları MEGA 5 programı ile filogenetik olarak analiz edildi.

## BULGULAR

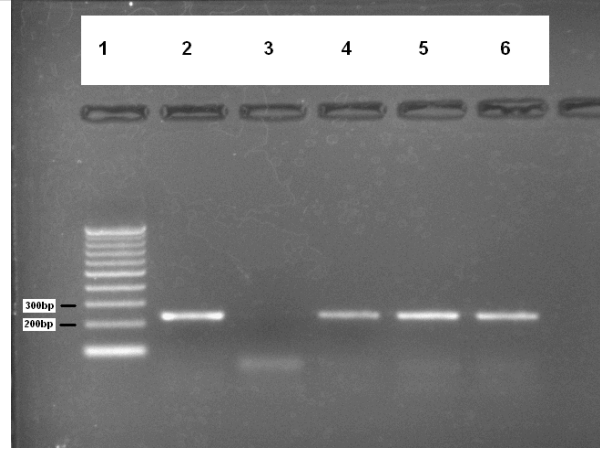
Toplanan toprak örneklerinin sekizi (%40) katı besiyerinde mikroskopik olarak pozitif değerlendirilmiştir. Katı besiyerindeki örnekler aynı zamanda sıvı besiyerine aktarılarak mikroskop altında görüntülenmiştir (Şekil 1). Katı besiyerinden elde edilen genomik DNA'dan kurulan PCR sonucunda bu örneklerin sekizi (%40) *Acanthamoeba* spp., üçü (%15) ise *Naegleria fowleri* açısından pozitif bulunurken (Şekil 2,3) örneklerden hiçbirinde *Balamuthia* spp. ve *Sappinia* spp.'ye saptanamamıştır



Şekil 1. *Acanthamoeba* spp.; trofozoit

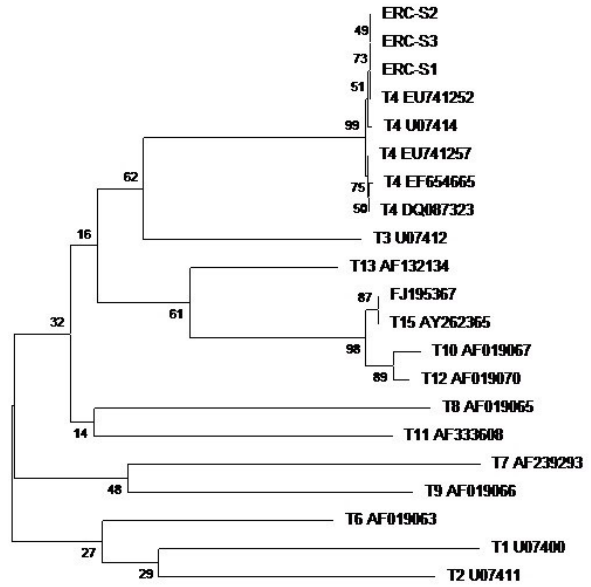


Şekil 2. *Acanthamoeba* spp. pozitif olarak belirlenen toprak örneklerinin PCR ürünleri: 1.100 bp Plus DNA Ladder, 2.Pozitif kontrol 423-551 bp *Acanthamoeba castellanii*; 3.Negatif kontrol, 4-11. *Acanthamoeba* spp. pozitif toprak örnekleri



Şekil 3. *Naegleria fowleri* pozitif olarak belirlenen toprak örnekleri: 1.100 bp Plus DNA Ladder . 2.Pozitif kontrol , 3.Negatif kontrol 4-6.Pozitif toprak örnekleri

Çalışmada Kayseri'de topraktan elde edilen üç *Acanthamoeba* izolatu, ERC-S1-2-3 olarak adlandırıldı. ERC-S1-2-3 izolatlarının 18S rRNA dizi analizi 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 elde edilen izolatların, referans *Acanthamoeba* T4 genotipler DQ087323, U07416 ve T1-T15 genotipleri ile karşılaştırılmasıyla üçünün de T4 genotipinde olduğu belirlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Çalışmadan elde edilen ERC-S1-2-3 izolatların 18S rRNA dizileri ile *Acanthamoeba* T1-T15 genotipleri arasındaki Neighbour-Joining filogenetik ilişkisi. Bootstrap değeri, 1000 replikasyon olarak analiz edildi.

**TARTIŞMA**

İnsanların doğayı kendi yararları için daha fazla kullanmaya başlamaları, doğada serbest yaşayan amiplerin insan vücuduna girme olasılığını artırmakta ve bu amiplere olan ilgi de artmaktadır. SYPPA başta toprak ve su olmak üzere hemen her yerde bulunabilen canlılardır.

Tsvetkova ve ark. (9), Bulgaristan'da göl, nehir, sıcak su kaynakları, toprak, kum gibi birçok çevresel örneği incelemiş, bu örneklerden 11 toprak örneğinin tamamında, 24 kum örneğinin 22'sinde SYPPA izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yurdumuzda, bu amiplerle ilgili Erzurum'da yapılan ilk saha çalışmasında kar altından alınan toprak örneğinden bir *Acanthamoeba* türünün izole edildiği, fakat bu türün fareler için patojen olmadığı bildirilmiştir (10). Sivas'ta yapılan bir çalışmada kuru toprak örneğinde ve bir su birikintisinin altındaki çamur ve etrafındaki toprak örneğinden yapılan ekimlerde, *Acanthamoeba* ve bir örnekte de 'leptomyxid' izole edildiği, fakat laboratuvar farelerinde yapılan deneylerde bunların patojen etki göstermedikleri bildirilmiştir (11). Saksı toprağının incelendiği bir çalışmada ise *Acanthamoeba* cinsinin hem kist hem de trofozoitlerinin görüldüğü bildirilmiştir (12). 2004 yılında Kılıç ve ark. (13) Ankara'da 28 toprak, iki su örneği incelemiş ve toprak örneklerinin 16'sında *Acanthamoeba* ürettiği, pozitif bulunan toprak örneklerden 8'inin T2, beşinin T3, ikisinin T4 ve birinin T7 genotipinde olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde vaka raporu şeklinde yayınlar bulunmakla birlikte, yaptığımız literatür taramasına göre; bunlardan sadece üç'ünde genotiplendirme yapılmış olup bu vakalarda tespit edilen türlerin hepsinin genotip T4 olduğu bildirilmiştir (14-16). Ayrıca 2007 yılında Ertabaklar ve ark. (14) Türkiye'de ilk kez bir toprak örneğinde genotip T9 bildirmişlerdir.

Bu çalışma ile insan sağlığı açısından tehdit oluşturabilecek serbest yaşayan bazı amip türlerinin varlığı Kayseri'deki toprak örneklerinde gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarda tespit edilen izolatların in-vitro sitotoksiste ve in-vivo patojenitelerinin araştırılmasına ilaveten daha çok sayıda örneğin incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

**Teşekkür**

*Acanthamoeba castellanii* izolatu için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zübeyde Akın Polat'a teşekkür ederiz.

**KAYNAKLAR**

1. Martinez AJ, Janitschke K. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infectio* 1985; 13: 251-256.
2. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1001-1027.
3. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 1997; 7: 583-599.
4. Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, et al. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* 2001; 285: 2450-2451.
5. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al. Use of subgenetic 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: 1903-1911.
6. Schild M, Gianinazzi C, Gottstein B, et al. PCR-based diagnosis of *Naegleria sp.* infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections, *J Clin Microbiol* 2007; 45: 564-567.
7. Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, et al. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 453-455.
8. Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, et al. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 2009; 199: 1139-1142.
9. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, et al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res* 2004; 92: 405-413.
10. Saygı G. Erzurum'da topraktan *Acanthamoeba* türünün soyutlanması. *Türkiye Parazit Derg* 1979; 2: 109-114.
11. Akın Z. Toprak ve Su Örneklerinden Özgür Yaşayan Amiplerin Soyutulması, Tanımlanması, Özelliklerinin Belirlenmesi ve Patojenlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2000.
12. Saygı G, Akın Z. Sivas'ta toprak ve termal su örneklerinden *Acanthamoeba* ve *Neagleria* türlerinin soyutulması. *Türkiye Parazit Derg* 2000; 24: 237-242.
13. Kılıç A, Tanyuksel M, Sissons J, ve ark. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4, and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol* 2004; 49: 246-252.
14. Ertabaklar H, Türk M, Dayanır V, et al. *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in

- Turkey. Parasitol Res 2007; 100: 241-246.
15. 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.
16. Ertabaklar H, Dayanır V, Apaydın P, ve ark. Olgu Sunumu: Acanthamoeba Keratiti. Türkiye Parazitoloj Derg 2009; 33: 283-285.

