

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Gökova Bölgesinde Eküvyon Tekniği ile Yüksek Oranda Çevresel *Cryptococcus neoformans* İzolasyonu

High Environmental Isolation Rate of Cryptococcus neoformans by Swabbing Technique in Gökova Region

Çağrı Ergin

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Denizli

ÖZET

Amaç: *Cryptococcus neoformans*, özellikle bağışıklığı baskılanmış konakta hayatı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturan bazidiomycet sınıfından kapsüllü bir maya mantarıdır. Birçok ülkeden bildirilen raporların aksine, Anadolu'da, Ege ve Akdeniz bölgesinde 1999-2010 yılları arasında yapılan tekrarlayan taramalarda, kolonizasyon odağı olarak bildirilen *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından sadece bir *C. neoformans* kökeni izole edilmiştir. Bu çalışma Gökova-Akçapınar bölgesinde farklı yöntemle tarama yapmak amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada çevresel tarama, 2003 yılında sadece bir kökenin izole edilebildiği Gökova-Akçapınar bölgesinde yapılmış ve tarama için eküvyon tekniği kullanılmıştır. Araştırma alanı içinde yaklaşık 1400 *E. camaldulensis* ağacı bulunduğu ve sadece 17 ağaç üzerinde büyük kovuk olduğu saptanmıştır. Bu kavuklardan eküvyonla alınan örnekler kloramfenikol ve bifenil içeren Staib agar besiyerine ekilmiş ve *C. neoformans* varlığına bakılmıştır.

Bulgular: *C. neoformans* kolonizasyonu 2008 yılında 11 ağaçta (11/17; %64.7), 2009 yılında 7 ağaçta (7/11; %63.6) bulunmuş ve ortalama koloni sayısının 35 ± 9.7 koloni/eküvyon olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Anadolu'da Gökova bölgesi bir "sıcak nokta"dır. Geleneksel yöntemler ile negatif sonuçların alındığı bölgelerdeki çevresel taramalar için eküvyon yönteminin seçilmesi önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Cryptococcus neoformans*, *Eucalyptus camaldulensis*, eküvyon tekniği

SUMMARY

Objective: *Cryptococcus neoformans* which belongs to the class Basidiomycetes is an encapsulated yeast that is among the most prevalent agents of life-threatening fungal infections especially in immunosuppressed individuals. Contrary to the reports from many countries, only one *C. neoformans* has been isolated from *Eucalyptus camaldulensis* as a niche for the yeast, in Mediterranean and Aegean region of Anatolia by consecutive studies reported between 1999-2010.

Materials and Methods: In this study, swabbing technique was used for environmental screening of *C. neoformans* in Gökova-Akçapınar region where only one strain of *C. neoformans* has been isolated in the area in 2003. The present research was carried out with approximately 1400 living *E. camaldulensis* trees. Only 17 large tree trunk hollows were found. Their swabbing samples have been cultured by Staib agar with antibiotic and biphenyl supplement.

Results: *C. neoformans* colonization was found as 11/17 (64.7%) and 7/11 (63.6%) in tree trunk hollows in 2008 and 2009, respectively. Mean colony counts were 35.0 ± 9.7 per swab.

Conclusion: Gökova region is a "hot spot" for *C. neoformans* in Anatolia. It was postulated that swabbing methods should be chosen for environmental sampling of tree trunk hollows even in the areas with repeated negative results by conventional sedimentation technique.

Key Words: *Cryptococcus neoformans*, *Eucalyptus camaldulensis*, swabbing technique

GİRİŞ

Cryptococcus neoformans; doğada kolonize olan, insana hava yolu ile bulaşan, özellikle bağıışıklık sistemi baskılanmış konakta enfeksiyon etkeni olan bazidiomiçet sınıfından kapsüllü bir maya mantarıdır. Mikroklimatik ortamın oluştuğu büyük ağaçların üzerindeki geniş kovuklarda da kolonize olabildiği, 1990 yılından itibaren çok sayıda rapor ile bildirilmiştir. *Eucalyptus camaldulensis* Dehn mayanın kolonizasyonunun ilk tanımlandığı ve en yaygın taramaların yapıldığı ağaç türüdür. Bu ortamlarda yüksek sayıda bulunan sporlar, solunum havasına karışmakta, hayvan ve insanlarda kriptokokkoza neden olmaktadır (1,2). *C. neoformans*, aynı cins içinde bulunan *C. gattii* ile ekolojik benzer yayılıma sahiptir. Bu iki tür maya mantarı Dünya coğrafyası üzerinde genellikle birlikte yayılım gösterir. *E. camaldulensis*'de dahil olmak üzere birçok odunsu yapıdan, her iki tür kriptokok da izole edilebilmiştir (3-6).

Türkiye'de, özellikle Ege ve Akdeniz bölgeleri okaliptüs ağaçlarının bulunduğu bölgelerdir ve mayanın kolonizasyonu ile ilgili çevresel taramalar bu bölgelerde yapılmıştır (7-11). Türkiye'nin de içinde bulunduğu Doğu Akdeniz havzası, Dünya'nın diğer bölgelerinden bildirilen sık kolonizasyonun aksine çevresel *C. neoformans*'ın izolasyonunun sıklıkla yapılamadığı bir bölgedir (8,12). Yapılan yoğun taramalara rağmen sadece bir köken *C. neoformans*, Gökova körfezinde, Marmaris-Fethiye-Muğla yol kavşağında bulunan *E. camaldulensis* ağaçlarından 2004 yılında izole edilmiştir (7). İzolasyon, çok sayıda yayınlara desteklenen canlı ağaçların kovuklarından yapılamazken çiçek, operkulum ve kapsül yapılarını içeren döküntü örneklerinden olmuştur. Mayanın yüksek izolasyon oranına sahip olduğu bölgelerde dahi ağacın altındaki döküntülerden yapılan taramalarda izolasyo-

nun az olabileceği bildirilmektedir (13). 2008 yılında, daha önceki yöntemden farklı olarak eküvyon yöntemi ile örnekleme Çukurova bölgesinde kullanılmış, ancak *C. neoformans* izole edilememiştir (8). Eküvyon tekniğinin literatürde daha yüksek izolasyon oranına sahip olduğu öne sürülmektedir (3,14). Sunulan araştırmada, eküvyon tekniği Gökova-Akçapınar bölgesi *E. camaldulensis* ağaçlarında yapılan çevresel *C. neoformans* ve *C. gattii* taramasında kullanılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu araştırma, 2004 yılında, *E. camaldulensis* ağaçlarının operkulum ve kapsül örneklerinden bir tane *C. neoformans* izolasyonunun yapıldığı Gökova-Akçapınar bölgesinde yürütüldü. Gökova körfezinde Akyaka-Akçapınar yolu üzerinde, [37° 03' 14 Kuzey, 28° 21' 33 Doğu] ile [37° 01' 37 Kuzey, 28° 21' 32 Doğu koordinatları arasında] yaklaşık 1400 *E. camaldulensis* bulunan bölge çalışma alanı olarak seçildi. Örnek alımları 13.07.2008 ve 23.08.2009 tarihlerinde yapıldı. 2008 yılında bölgede üzerinde büyük kovuk (en az 5 litre hacimde) bulunan 17 ağaç saptanırken, 2009 yılında bazı kovuklu ağaçların köylüler tarafından kesilerek kullanılması nedeni ile 11 kovuklu ağaç saptandı. Her iki seferde de bu ağaçlardan Randhawa ve arkadaşları (14) tarafından önerilen eküvyon tekniği ile örnekler alındı. Kısaca; 50-60 cm uzunluğunda bambu çubukları ile hazırlanmış steril eküvyonlar serum fizyolojik ile ıslatıldı. Tek eküvyon ile bir ağaçtaki kovuğun çeşitli bölgelerinden sürüntü örneği alındı. Eküvyonun pamuklu kısmı 2ml steril %0.9 NaCl içine batırılmış olarak aynı gün içinde oda ısısında laboratuvara ulaştırıldı. Örnek aynı eküvyon yardımıyla içinde %0.1 g/L bifenil (Sigma B6890) ve 50 µg/ml kloramfenikol bulunan Staib agar besiyerine

ekildi. Oda ısısında iki hafta süre ile inkübe edildi. Ekim plakları, koloni mikroskobu ile değerlendirildi. Koloni mikroskobu; Staib agar içinde bifenil ile inhibe edilemeyen özellikle zigomiçet sınıfı gibi küflerin hızlı bir şekilde yayılmasından daha önce çıplak gözle görülemeyen pigmentli kolonilerin saptanması amacı kullanıldı. S tipi morfolojide, kahverengi pigment yapan koloniler Gram boyama yöntemi, 37°C'da üreyebilme, üreaz aktivitesi varlığı, mısır unlu agarda hif geliştirememesi ve kanavanin-glisin-bromtimol (CGB) agar besiyeri reaksiyonları ile değerlendirildi. CGB agar besiyeri *C. neoformans* ve *C. gattii* ayırmak için kullanıldı. *C. gattii*, kanavanin direnci sonucunda, glisin varlığı ile üreyebilmesi ve besiyerini sarıya çevirmesi ile *C. neoformans*'dan ayrıldı (14).

BULGULAR

Bu taramada; 13.7.2008 tarihinde 17 kovuklu *E. camaldulensis* ağacından alınan örneklerin 11 (%64.7)'inde; 23.08.2009 tarihinde 11 kovuklu *E. camaldulensis* ağacından alınan örneklerin 7 (%63.7)'sinde *C. neoformans* izolasyonu yapıldı. 2008 ve 2009 yılında aynı yedi ağaçta kolonizasyon saptanmıştır. Üreme olan örnekler için 2008 yılında 22±4.3 koloni/eküvyon izolasyonu yapılırken; 2009 yılında 55.4±22.8 koloni/eküvyon izolasyonu yapıldı. Yıllara göre değişen bu izolasyon oranları istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Mann-Whitney U; p>0.05). Üreme saptanan tüm örnekler göz önüne alındığında *C. neoformans* yoğunluğu 35.0±9.7 koloni/eküvyon'dur.

Yapılan örneklemelerde *C. gattii* varlığına rastlanmamıştır.

TARTIŞMA

Dünya'da okaliptüs ağaçlarından yapılan taramalarda bildirilen *C. neoformans* ve *C. gattii*

izolasyon oranları çok değişkendir (3-6, 12,14). Ülkemizde *E. camaldulensis* ağaçlarından yapılan taramalarda Gökova-Akçapınar bölgesi dışında *C. neoformans* izole edilememiştir (7-11). Sunulan çalışmada ise bir sene ara ile aynı bölgede yapılan iki örneklemede aynı ağaçlarda kolonizasyon gösterilmiş, şimdiye kadar ülkemizde yapılan taramalardaki en yüksek izolasyon oranı elde edilmiştir. Bu çalışmada da ülkemizde doğadan yapılan diğer taramalara benzer şekilde *C. gattii* izole edilememiştir.

Araştırmanın yapıldığı Gökova-Akçapınar bölgesinde *E. camaldulensis* ağaçları bataklık bölgelerin dışında, çevre güzelleştirme amacı ile dikilmişlerdir. Bu bölge, Mersin-Adana'da, Berdan Çayı bataklığının kurutulması amacıyla, 1885 yılında Cezayir'den ithal edildiği düşünülen *E. camaldulensis* tohum ve fidanlarının, fazlalarının Gökova bölgesine gönderilmesi ile oluşturulmuştur (15). Adı geçen bölgedeki Berdan çayı kurutulması işlemi, bugün için Tarsus Doğu Akdeniz Araştırma Enstitüsü Karabucak Orman İşletmesi okaliptoryumu olarak devam etmektedir. Karabucak bölgesinde son 10 yıl içinde iki farklı yöntemle yapılan, üç ayrı çalışmada da, bölgeden *C. neoformans* izolasyonu yapılamamıştır (7-9).

Ülkemizdeki taramalarda ağaç kovuklarından ve çevresel örneklerden az sayıda izolasyonun nedeni açıklanamamıştır. Çevresel antifungal maddelerin varlığının olabileceği, çevresel pH ve toprağın diğer kimyasal özellikleri, ağacın genetik farklılıklarından kaynaklanabilecek kimyasal yapı değişimleri bu konuda belirgin bir sonuç oluşturamamıştır (8,16,17). Bu sonuç hem *C. neoformans* hem de *C. gattii* için değişmemiştir (17). Benzer şekilde, *C. neoformans*'ın çevresel kolonizasyonunda diğer önemli bir çevresel odak olarak bilinen güvercin dışkılarından da izolasyon yapılabilmektedir, ancak

bazı bölgelerimizde bu izolasyon oranları beklenenden daha azdır (8,18,19). Bu durum ile Doğu Akdeniz ülkelerinden Ürdün'de de karşılaşılrken, Mısır'da ağaçlardan ve güvercin dışkısı ile kontamine ortamlardan *C. neoformans* üremesine sık olarak rastlanmıştır (5,12). Bu sonuç, ülkemizde risk ortamlarında çevresel *C. neoformans*'ın kolonizasyonuna engel teşkil eden bir faktörün varlığını düşündürmektedir. Çevresel faktörlerin özellikle bağıl nem, sıcaklık, buharlaşma ve solar radyasyonun çevresel kolonizasyonda belirleyici etmenler olduğu belirtilmiştir (4,20). Doğada varlığını sürdüren *C. neoformans*'ın ağaçlarda kolonize olmasının, eşeyli üreme yaşam siklusunda önemli bir basamak olduğu ileri sürülmektedir (21). Hindistan'da farklı coğrafi bölgelerden ve farklı ağaçlardan izole edilen *C. neoformans* kökenlerinin araştırıldığı bir çalışmada; düşük nitrojen kaynağı, düşük nem ve uygun sıcaklıklarda, karşıt eşlenik tiplerin varlığının basidiosporlanma için yeterli olduğu bildirilmiştir. Ancak hangi faktörlerin bu olayı tetiklediği açıklanamamış, doğada *C. neoformans*'ın eşeyli çoğalmasının yüksek olduğu "sıcak bölgeler" bulunduğu hipotetik olarak ileri sürülmüştür (22). Ülkemizde farklı ağaç kovuklarından yapılan taramalarda, sadece iki farklı türden [Doğu çınarı (*Platanus orientalis*) ve bir nar (*Punica granatum*) ağacından] az sayıda koloni izole edilebilmiştir (23). Aynı bölge ve çevresindeki *E. camaldulensis* ağaçlarından ise izolasyon yapılamamıştır ancak aynı bölge de güvercinliklerde *C. neoformans* varlığı gösterilmiştir (11,19). Daha yaşlı ve büyük kovukların bulunduğu, Anadolu'da farklı coğrafyalarda, farklı yükseklik ve iklim koşullarında bulunan anıt ağaçlardan taramalarda ise *C. neoformans* izole edilememiştir (24). Sonuç olarak; sunulan çalışmada elde edilen yüksek izolasyon oranı, Gökova-Akçapınar böl-

gesinin ülkemiz için, Nawange ve arkadaşları (22) tarafından tanımlandığı şekilde "sıcak nokta" olduğunu hipotetik olarak desteklemektedir. Ülkemizde yapılacak olan çevresel *C. neoformans* kolonizasyon taramalarında, eküvyon ile örnek alma tekniğinin tercih edilmesi, izolasyon oranını yükseltecek, insan sağlığı için tehdit oluşturacak bölgelerin saptanmasını kolaylaştıracaktır. Eş zamanlı olarak *C.gattii* varlığının da taranması, bu mayanın ekolojisinin araştırılması ve henüz bilinmeyen doğada yayılımının belirlenmesi açısından önemlidir.

İletişim / Correspondence

Çağrı Ergin
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Denizli
Tel: 0258 2962536
e-mail: cagri@pau.edu.tr

Kaynaklar

1. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Ann Rev Microbiol 2006; 60:69-105.
2. Ribeiro AM, Silva LK, Schrank IS, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. Med Mycol 2006; 44:707-13.
3. Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Abrantes R, Hevia AI, Davel G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. Medical Mycology 2009; 47:177-84.
4. Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, et al. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. Med Mycol 2008; 46:823-33.
5. Mahmoud YA. First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* from the Gharbia Governorate, Egypt. Mycopathologia 1999; 148:83-6.
6. Mseddi F, Sellami A, Jarbouai MA, Sellami H, Makni F, Ayadi A. First environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and review of published studies on environmental isolations in Africa. Mycopathologia 2011; 171:355-60.

7. Ergin Ç, İlkit M, Hilmioğlu S, et al. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia* 2004; 158:43-7.
8. İlkit M, Ateş A, Biçer AT, Yula E. Environmental study of *Cryptococcus neoformans* in and around Adana, Turkey. *Ann Microbiol* 2006; 56:97-9.
9. Ateş A, Biçer AT, İlkit M. Sedimentasyon ve eküvyon yöntemleri ile okaliptüs ağaçlarında *Cryptococcus spp.* varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42:655-60.
10. Derici YK, Tümbay E. İzmir ilinde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. *İnfeksiyon Dergisi* 2008; 22:53-8.
11. Erdem F, Akıdan M, Duman B, Ergin Ç. Denizli-Karahayit bölgesindeki *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* varlığının araştırılması. *Pam Tıp Derg* 2009; 2:134-6.
12. Hamasha AM, Yıldırım ŞT, Gönülüm A, Saraçlı MA, Doğanç L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia* 2004; 158:195-9.
13. Gugnani HC, Mitchell TG, Litvintseva AP, et al. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. grubii from the flowers and bark of *Eucalyptus* trees in India. *Med Mycol* 2005; 43:565-9.
14. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. *Med Mycol* 2005; 43:67-71.
15. Adalı F. Sağlık ağacı okaliptüs. İstanbul, Ziraat Vekâleti Neşriyat Müdürlüğü, 1944.
16. Ergin Ç, Şengül M, Kaleli İ, Gürbüz M. *Eucalyptus* debris küf mantarı florasında antikriptokokkal aktivitenin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35:256-9.
17. Ergin Ç, Şengül M, Kaleli İ, Mete E. Güney-Batı Anadolu kökenli okaliptüs sıvı besiyerlerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* serotiplerinin üreme dinamikleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37:94-7.
18. Yıldırım ŞT, Saraçlı MA, Gönülüm A, Gün H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med Mycol* 1998; 36:391-4.
19. Pelek Ş, Altınkaya S, Korkmaz UB, Ergin Ç. Denizli şehir merkezi'nde güvercin (*Columba livia*) çıkartılarında *Cryptococcus neoformans* varlığının araştırılması. *Pam Tıp Derg* 2011; 4:21-4.
20. Granados DP, Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. *FEMS Yeast Res* 2006; 6:636-44.
21. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell, Host & Microbe* 2007; 1:263-73.
22. Nawange SR, Shakya K, Naidu J, Singh SM, Jharia N, Garg S. Decayed wood inside hollow trunks of living trees of *Tamarindus indica*, *Syzygium cumini* and *Mangifera indica* as natural habitat of *Cryptococcus neoformans* and their serotypes in Jabalpur City of Central India. *J Med Mycol* 2006; 16:63-71.
23. Ergin Ç, Kaleli İ. Denizli şehir merkezinde kovuklu ağaç gövdelerinden *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:79-85.
24. Ateş A, Ergin Ç, İlkit M. Anadolu anıt ağaçlarında *Cryptococcus neoformans*'ın araştırılması. *İnfeks Derg* 2006; 20:57-60.

