

Muğla Milas ilçe yerleşimi bölgesi *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* izolasyonu

The isolation of Cryptococcus neoformans from Eucalyptus camaldulensis trees in Muğla-Milas city center

Hasan Gökçen*, Çağrı Ergin**

*Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Özel Çalışma Modülü Programı, Denizli

**Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Denizli

Özet

Amaç:Dünyanın birçok yerinde insan patojeni *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* aralarında *Eucalyptus camaldulensis*'in de bulunduğu çevresel odaklardan izole edilmektedir. Türkiye'de 10 yıldır yapılan taramalarda *E.camaldulensis* kaynaklı *C.neoformans* izolasyonu sadece Gökova-Akyaka bölgesinde yapılabılırken *C.gattii* izole edilememiştir. Sunulan çalışmada *C.neoformans* ve *C.gattii* varlığı Muğla ili Milas ilçesi yerleşim bölgesinde bulunan *E.camaldulensis* ağaçlarının kovuklarında taranmıştır.

Gereç ve yöntem: Milas şehir merkezinde beş farklı bölge seçilerek toplam 100 *E.camaldulensis* ağacının gövdelerindeki oyuklardan eküvyon yöntemi ile örnekleme yapıldı. Tüm örnekler bifenil ve kloramfenikol içeren Staib agar besiyerine ekildi. Kültür süresi sonunda maya benzeri kahverengi koloniler geleneksel yöntemler ile incelendi. Kanavanin glisin bromtimol agar reaksiyonu *C.neoformans*'ın *C.gattii*'den ayırımında kullanıldı.

Bulgular:Toplam 100 *E.camaldulensis* ağacının 3 (%3.0)'ünde *C.neoformans* kolonizasyonu bulundu. Tüm pozitif örnekler ilkökul bahçesinde yapıldı. *C.gattii* izolasyonu yapılmadı.

Sonuç:Milas şehir merkezinde yapılan izolasyon, ülkemizde Akdeniz ve Ege bölgeleri taramalarında Gökova-Akyaka bölgesi dışında *E.camaldulensis* ağaçlarından yapılan ikinci izolasyondur. Bu veriler ülkemizde *C.neoformans*'ın beklendiğinden daha çok olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, halk sağlığı açısından önemli bir veri olarak, insan patojeni *C.neoformans* izolasyonu ilkökul bahçesinden yapılmıştır. *C.neoformans*'ın kolonizasyonu ve insan aktivitelerinin olduğu bölgelerdeki dağılımlarına ilişkin ileri araştırmalar Türkiye'de kriptokokkoz riskli bölgelerin daha iyi bir şekilde anlaşılmasına yol gösterebilecektir.

Pam Tıp Derg 2014;7(2):109-112

Anahtar sözcükler: *Cryptococcus neoformans*, *Eucalyptus camaldulensis*, çevresel, kolonizasyon, Milas.

Abstract

Purpose:In many parts of the world, human pathogen yeast *Cryptococcus neoformans* and *C.gattii* are commonly isolated from environmental niches including *Eucalyptus camaldulensis*. While *E.camaldulensis*-originated *C.neoformans* was only found in Gökova-Akyaka region during ten surveillance years in the Mediterranean and Aegean regions of Turkey, *C.gattii* has not been isolated. In this study, *C.neoformans* and *C.gattii* have been screened from *E.camaldulensis* trunk hollows in Muğla-Milas city providence.

Materials and methods: Five different locations in Milas city center, totally 100 *E.camaldulensis* with trunk hollows have been sampled by swabbing method. All samples were cultured on Staib agar supplemented with biphenyl and chloramphenicol. At the end of the culture period, brown yeast-like colonies were tested by conventional methods. Canavanine glycine bromtimol agar reaction was used for *C.neoformans* from *C.gattii* identification.

Results:3 (3.0%) out of 100 *E.camaldulensis* were positive for *C.neoformans* colonization. All positive samples were in elementary schoolyard. No *C.gattii* has been isolated.

Conclusion:Outside of Gökova-Akyaka, Milas city center is second isolation area of *C.neoformans* from *E.camaldulensis* in Mediterranean and Aegean regions of Turkey. These data showed that colonisation of *C.neoformans* in nature may be more than expected in our country. In addition, colonisation of human-pathogen *C.neoformans* in elementary schoolyard is important for public health. Further studies on colonisation of *C.neoformans* and their distribution around human activity should lead to a better prediction of *cryptococcosis* risky areas in Turkey.

Pam Med J 2014;7(2):109-112

Key words:*Cryptococcus neoformans*, *Eucalyptus camaldulensis*, environmental, colonization, Milas.

Çağrı Ergin

Yazışma Adresi:Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Denizli
e-mail: cagri@pamukkale.edu.tr

Gönderilme tarihi: 25.12.2013

Kabul tarihi: 04.03.2014

Giriş

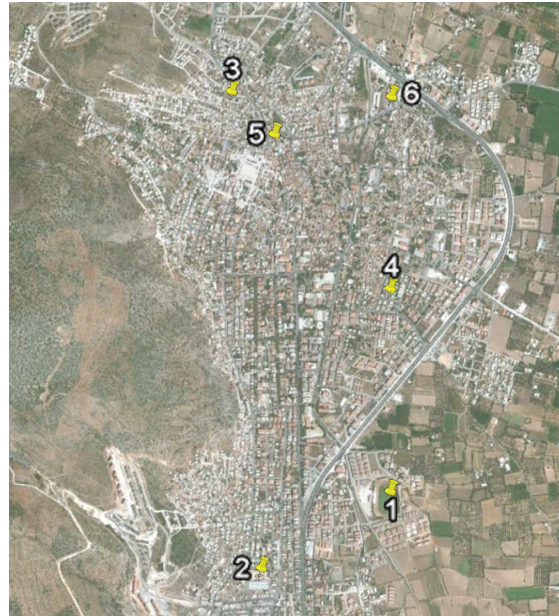
Bağıışıklığı baskılanmış konakta hayatı tehdit edebilen enfeksiyonlar oluşturan *C. neoformans* çevresel ortamda sıklıkla güvercin dışkılarında ve ağaç florada kolonize olmaktadır. Bu kolonizasyon ortamlarından solunum yolu ile canlılara bulaşır. İlk defa *E. camaldulensis* florasında kolonize olduğu gösterilmiş, daha sonraki araştırmalar ile farklı türlerde ağaçlarda da kolonize olabildiği görülmüştür [1]. Ülkemizde farklı zamanlarda farklı coğrafi bölgelerde yapılan araştırmalarda Dünya'nın diğer bölgelerinden farklı olarak sadece Gökova Akyaka bölgesinden sürekli izolasyon yapılabilmektedir [2]. İlk izolasyonun yapıldığı bölgeye coğrafi olarak benzer farklı yerlerde de floradan izolasyon yapılamamakla birlikte floranın yoğun ve eski olduğu yerleşim merkezleri çeşitli araştırmalar ile taranmaktadır [3-8]. Sunulan araştırma Muğla ili Milas ilçesinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi eğitim programı dahilindeki özel çalışma modülleri (ÖÇM) kapsamında yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma Muğla ili Milas ilçe merkezinde yerleşim bölgesinde 2012 yılı Nisan ayı içinde yürütüldü. Bölgede çok sayıda *Eucalyptus camaldulensis* bulunmaktadır. Yöre halkı ağaçların bataklıkların kurutulması amacı ile dikildiğini anlatmaktadır. Araştırmanın yapıldığı bölge kuş uçuşu olarak *E. camaldulensis* florasından *C. neoformans* izolasyonlarının yapıldığı Gökova-Akyaka bölgesine yaklaşık 60 km, *Punica granatum* ile *Platanus orientalis* ağaçlarından izolasyonun yapıldığı Denizli bölgesine yaklaşık 120 km mesafededir [2, 3, 8].

Üzerlerinde kovuk ve derin yarıkların bulunduğu, eski *E. camaldulensis* ağaçlarının yoğun bulunduğu 6 farklı bölgede 100 *E. camaldulensis* taramaya alındı (Şekil 1). Örnekleme için Randhawa ve ark.nın [9] önerdiği şekilde eküvyonla örnek toplama yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde örnekler %0.4

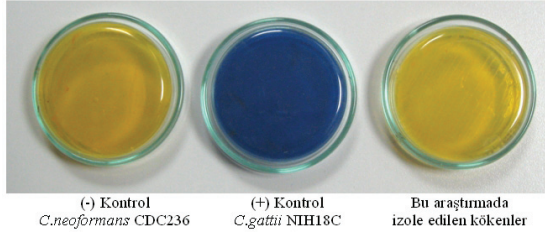
kloramfenikol içeren steril serum fizyolojik içine alınarak aynı tüp içinde taşındı. Tüm örnekler aynı gün içinde laboratuvara ulaştırılarak %0.5 kloramfenikol ve %0.1 bifenil ve içeren Staib agar besiyerine ekildi. Üç hafta süre ile oda sıcaklığında enkübe edilen besiyerleri kahverengi ve maya benzeri S koloni morfolojisinde kolonilerin varlığı yönünden takip edildi (Şekil 2). Şüpheli koloniler Gram boyama, üreaz testi, Dalmau agar mikroskopisi ve 37°C'da üreyebilme özelliklerine göre değerlendirildi. Gram olumlu maya morfolojisinde, hifa oluşturmayan, 37°C'da üreyebilen, Staib agar besiyerinde kahverengi pigment oluşturan koloniler *C. neoformans/gattii* olarak değerlendirildi. Şüpheli mayalar kanavanin-glisin-bromtimol (KGB) agar besiyerine ekilerek bir hafta süre ile oda ısısında enkübasyona bırakıldı. KGB besiyerinde üreyemeyen koloniler *C. neoformans* olarak kabul edildi (Şekil 3).



Şekil 1. Milas ilçesi yerleşimi 1) Stadyum, 2) Fatih İÖO 3) Burgaz Mah 4) Hayıtlı Mah 5) Atatürk İÖO 6) Askeriye.



Şekil 2. Bifenil ve kloramfenikol içeren Staib agar besiyerinde kahverengi, S morfolojisinde *C. neoformans* kolonileri (bir bölümü oklar ile gösterilmektedir).



Şekil 3. KGB (Kanavanin-Glisin-Bromtimol) agar besiyeri reaksiyonları.

Bulgular

Araştırmaya alınan 100 *E.camaldulensis* ağacından 3 (%3.0) tanesinde 180, 22 ve 1 (koloni/petri) *C.neoformans* izole edildi. *C.neoformans* saptanan her üç ağaç örneği de Atatürk İlköğretim Okulu (37°19'K:27°46'D) bahçesi örnekleme bölgesinde bulunuyordu (Şekil 1; 5 no.lu bölge).

Tartışma

Tüm dünya üzerinde her yıl bir milyondan fazla insanın kriptokokkal enfeksiyonlardan etkilendiği öngörülmektedir. Bu hastaların çoğunluğu HIV enfeksiyonu/AIDS olmakla birlikte diğer immün sistemi baskılayan hastalıklarda da (sarkoidoz, lenfoproliferatif hastalıklar, immünsüpressif tedavi vb) kriptokokkoz görülmektedir [10]. Olgular ülkemizden 1960'lardan beri rapor edilmekle birlikte az sayıdadır [11].

Ülkemizde yapılan çevresel *C.neoformans* taramalarında güvercin dışıklarının olduğu bölgelerden yapılan taramalar çoğunluktadır [12-14]. Çevresel flora araştırmalarında ise *E.camaldulensis* ile birlikte *Punica granatum* ve *Platanus orientalis* ağaçlarından izolasyon yapılmıştır [2, 3, 8]. Bu taramalarda dünya üzerinde yapılan taramalarda daha yoğun izolasyonlar elde edilirken, ülkemizde daha az izolasyon yapılmış, birçok araştırmada da sonuç alınamamıştır [4-7]. Sunulan araştırmada Muğla ili Milas ilçesinde aynı ilköğretim okulu içinde bulunan, birbirine yakın üç *E.camaldulensis* ağacından *C.neoformans* izole edilmiştir. Bu durum ülkemizde çevresel *C.neoformans* dağılımı hakkında yapılmakta olan taramaları destekler niteliktedir. Yerleşim alanlarında ağaçların genellikle bakımlı olması, birçok turistik bölgede ağaçlara zararlılardan korunması ve temiz görünmeleri amacı ile kireç badananın yapılması, *C.neoformans*'ın alkali ortamlarda kolonizasyonunun zor olması nedeni ile izolasyonunun yapılamadığını düşündürmektedir. Ancak yapılan araştırmalar ile kökenlerin izole edilmesi, çevresel bakım olmakla birlikte kireç uygulanmayan ve halkın ortam olarak algıladığı

yerlerde *C.neoformans*'ın kolonize olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda Golman ve ark. [15] araştırmalarında; 2 yaşından büyük immünsistemi sağlam çocukların *C.neoformans* ile karşılaşmalarının, yürümeye başlama gibi çevresel ortam aktivitelerindeki çoğalma sonucu erken yaşlarda olduğunu, immünsistemi sağlam konakta primer pulmoner kriptokokkozun asemptomatik seyredebileceği veya viral üst solunum yolu enfeksiyonlarına benzer bir tablo oluşturması nedeni ile kriptokokkozun tanımlanamadığını savunmuşlardır. Bu durumda okul ve benzeri yerlerde görülen, immünitesi sağlam konaktaki kriptokokkal enfeksiyonlar kolaylıkla viral etyoloji ile karışabilmektedir.

Sunulan araştırmanın en önemli sonucu, daha önceki yoğun izolasyonun yapıldığı, Gökova-Akyaka bölgesi dışında, kriptokokkal patojenlerin doğada, halkın gündelik yaşamını geçirdiği bölgelerde olabileceğinin saptanmasıdır. Özellikle bu ortamın çocukların yoğun bulunduğu bir bölge olması önemlidir. Ulaşılabilen literatürde, bildiri yapılan kriptokokkoz tanımlı olgularda çoğunlukla hastanın sürekli yaşadığı yerler ve çevresel özellikler bildirilmemiştir [11, 16-18]. Buna bağlı olarak ülkemizde kriptokokkoz hastalarının sürekli yaşadıkları yerlere ve aktivitelerine ait kapsamlı bilgiye ulaşılamamıştır. Bu verilerin yayınlanması çevresel risk faktörlerinin saptanması bakımından önemlidir.

Ülkemizde *C.gattii* enfeksiyonuna rastlanmamıştır ve çevresel izolasyonu yapılamamıştır. Ülkemizde izolasyonun neden beklenenden daha az yapılmakta olduğu henüz bilinmemektedir. Farklı hipotezler test edilmiş ise de sonuç alınmamıştır [19]. Son yıllarda ağaç florada *C.neoformans* kolonizasyonun ağaç seçiciliğinin baskın özellik olmadığı kabul edilmektedir [1, 20].

Çevresel ağaç floradan patojen kriptokok kolonizasyonu araştırmalarının devam etmesi hem mayanın ekoloji yönünde yeni bulgulara neden olabilir, hem de ülkemizde halen varlığı sorgulanan *C.gattii*'nin izolasyonuna imkan sağlayabilir. Ülkemizde tanı alan kriptokokkoz olgularının literatürde sunularında yaşam koşulları ve aktivitelerinin de bildirilmesi, çevresel patojenlerin taranmasında yol gösterici olacaktır.

Teşekkür

Araştırma esnasında KGB agar reaksiyonlarında kontrol kökenlerini sağlayan Prof.Dr.Şinasi Taner Yıldırım ve Prof.Dr.Mehmet Ali Saraçlı'ya teşekkür ederiz.

Çıkar ilişkisi: Yazarlar çıkar ilişkilerinin olmadığını beyan ederler.

Kaynaklar

1. 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;46:823-833.
2. Ergin Ç. Gökova bölgesinde eküvyon tekniği ile yüksek oranda çevresel *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2010;40:163-168.
3. Ergin Ç, İlikit M, Hilmioğlu S, et al. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia* 2004;158:43-47.
4. Karaca-Derici Y, Tümbay E. İzmir ili'nde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. *İnfeksiyon Derg* 2008;22:53-58.
5. İlikit M, Ateş A, Turaç Biçer A, Yula E. Environmental study of *Cryptococcus neoformans* in and around Adana, Turkey. *Ann Microbiol* 2006;56:97-99.
6. Ateş A, Turaç Biçer A, İlikit M. Sedimentasyon ve eküvyon yöntemleri ile okalipütüs ağaçlarında *Cryptococcus* spp. varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:655-660.
7. Erdem F, Akıdan M, Duman B, Ergin Ç. Denizli-Karahayıt bölgesindeki *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* araştırılması. *Pam Tıp Derg* 2009;2:134-136.
8. Ergin Ç, Kaleli İ. Denizli şehir merkezinde kovuklu ağaç gövdelerinden *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:79-85.
9. 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.
10. Cogliati M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An atlas of the molecular types. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:675213.
11. Akçağlar S, Sevgican E, Akalın H, Ener B, Töre O. Two cases of cryptococcal meningitis in immunocompromised patients not infected with HIV. *Mycoses* 2007;50:235-238.
12. Tümbay E. İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve kriptokokkoz. Birinci kısım: *Cryptococcus neoformans*'in doğal kaynaklarından izolasyonu. TÜBİTAK 6'ncı Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tebliği Tutanağı 1977;839-863.
13. Yıldırım ŞT, Saraçlı MA, Gönülüm A, Gün H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med Mycol* 1998;36:391-394.
14. Yılmaz A ve ark. *Cryptococcus neoformans*'in güvercin dışkılarındaki dağılımı. *Mikrobiyol Bul* 1989;23:121-126.
15. Goldman DL, Khine H, Abadi J, et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics* 2001;107:E66.
16. Hilmioğlu S, Tümbay E, İnci R, et al. Six cases of cryptococcosis in İzmir. *Mycoses* 2002; 45 (Suppl2): S24.
17. Gültaşlı NZ, Ercan K, Orhun S, Albayrak S. MRI findings of intramedullary spinal cryptococcoma. *Diagn Interv Radiol* 2007;13:64-67.
18. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Türkiye'de insan kriptokokkozunun epidemiyolojisi (1953-2003). *Cerrahpaşa J Med* 2003;34:95-109.
19. Ergin Ç, Şengül M, Kaleli İ, Mete E. Güney-Batı Anadolu kökenli ökalipütüs sıvı besiyerlerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* serotiplerinin üreme dinamikleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007;37:94-97.
20. Chowdhary A, Rhandhawa HS, Prakash A, Meis JF. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. *Crit Rev Microbiol* 2012;38:1-16.