

# Cryptococcus Neoformans Kökenlerinin İn Vitro Fenol Oksidaz Etkinliğinin Belirlenmesi ve C. Neoformans'ın Candida Albicans Kolonilerinden Ayırt Edilmesi İçin Pal Agar ve Niger Seed Agar Besiyerlerinin Karşılaştırılması

A. Serda KANTARCIOĞLU<sup>1</sup>, Ayhan YÜCEL<sup>1</sup>, Valerio VIDOTTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>2</sup> Medico-Chirurgiche Dept. Infectious Disease Section. Università degli Studi di Torino, Torino - İtalya

## Özet

Helianthus annuus (ayçiçeği) tohumundan hazırlanması dolayısıyla kafeik asit içeren Pal agarı (PA) Cryptococcus neoformans kökenlerinin fenoloksidaz etkinliğini belirlemek ve ilk kültür besiyeri olarak C. neoformans kolonilerini renk farkı ile Candida albicans'ınkilerden ayırt etmek için değerlendirildi. Her deneyde Pal agarın yanısıra Niger seed agar (NSA) kullanıldı. Deneylerde çevre ve klinik kaynaklı 57 ve bir referans C. neoformans kökeni ile 1 C. neoformans ve 8 C. albicans referans kökeni kullanıldı. Hem PA hem de NSA C. neoformans'ın fenoloksidaz etkinliğini belirlemek ve C. neoformans kolonilerini C. albicans'ınkilerden ayırt etmek için güvenilir sonuç verdiler. PA'nın ayrıca, ucuz ve kolay bulunabilir tohumlardan hazırlanması dolayısıyla rutin laboratuvar koşullarında kullanıma daha elverişli olduğu belirlendi. Bu besiyerinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanılması, başta HIV ile infekte hastaların ağız ve trakea sekresyonlarından, ayrıca habis tümörlü, diyabetliler ve hatta mantarın doğadaki kaynağı ile temas etmiş sağlam görünümlü olanlar da dahil geniş bir hasta grubundan C. neoformans'ın kolay, erken ve hızlı tanınmasına yardımcı olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Cryptococcus neoformans, fenoloksidaz, Pal agar

Cerrahpaşa Tıp Derg 2006; 37: 37 - 40

## Comparison of Pal's Agar with Niger Seed Agar to Detect in vitro Phenoloxidase Activity of Cryptococcus Neoformans Strains and to Differentiate C. Neoformans from Candida Albicans Colonies

### Abstract

Pal's agar (PA) which contains caffeic acid due to Helianthus annuus (sunflower) was investigated to detect phenoloxidase activity of Cryptococcus neoformans strains and to differentiate C. neoformans colonies from those of Candida albicans with color differences as a primary culture medium. Niger seed agar (NSA) was used along with PA in each test. Fifty seven clinical and environmental C. neoformans isolates plus 1 C. neoformans and 8 C. albicans reference strains were used for the tests. Both PA and NSA medium showed reliable results in the detection of phenoloxidase activity of C. neoformans and the differentiation of C. neoformans colonies from C. albicans colonies. PA is also easy and inexpensive to prepare from available seeds in routine laboratory conditions. Its routine use in microbiology laboratories could be helpful for easy, early and rapid diagnosis of C. neoformans infection from a wide range of patient population, particularly from HIV infected patients' oral and tracheal secretion samples as well as from other at risk patients such as malignants, diabetics or even healthy individuals who possibly get in contact with natural sources of the fungus.

**Key Words:** Cryptococcus neoformans, phenoloxidase, Pal's agar

Cerrahpaşa J Med 2006; 37: 37 - 40

Cryptococcus neoformans enfeksiyonu AIDS'lilerde yaşamı en sık tehdit eden mantar enfeksiyonudur. AIDS epidemisinde önce kriptokokkoz olağandışı bir enfeksiyon olarak düşünülmüdü. Ancak yakın tarihlerde yayımlanan bir çok çalışma AIDS'lilerde, kanserli hastalarda ve organ transplantlılarda kriptokokkoz prevalansında bir artış olduğunu kanıtlamaktadır [1-8]. C. neoformans enfeksiyonu genellikle merkezi sinir sistemini (MSS), akciğerler ve deri dahil birçok vücut bölgesini tutan dissemine has-

talık halinde ortaya çıkmaktadır. C. neoformans'ın olağan giriş kapısı, solunum yolu olmakla birlikte, yalnızca pulmoner kriptokokkoz seyrek olarak tanımlanan bir enfeksiyondur [9, 10]. C. neoformans birçok rutin mikoloji ve bakteriyoloji besiyerlerinde ayrılabilir. Ancak balgam ve idrar örneklerinden üretilmesi, konvansiyonel besiyerlerinde, her ikisi de beyaz koloni ürettiklerinden floradaki Candida albicans kontaminasyonu ile örtülebilir. Bu durum özellikle bu iki maya enfeksiyonuna da açık olan HIV ile infekte hastalar için büyük önem taşımaktadır. Fenol bileşikleri içeren besiyerlerinde melanin oluşturması dolayısıyla kahverengi koloniler üretmesi C. neoformans'ın ön tanımında en yararlı fenotipik göstergelerden biridir. Staib ve ark. [11], C. neoformans'ın tanımı için Guizotia abyssinica (niger seed, kuş tohumu) özütündeki kafeik

Alındığı Tarih: 07 Temmuz 2005

Yazma Adresi (Address): Dr. A. Serda KANTARCIOĞLU  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
34098 Cerrahpaşa - İstanbul  
E-posta: s.kantarcioglu@superonline.com

asidi melanine oksitleyerek kahverengi koloniler ürettiği *Guizotia abyssinica* özütü içeren bir besiyeri geliştirmiştir. Bu mantarın fenol oksidazının araştırılması için aynı botanik ailesinden (*Asteraceae*) bir diğer bitki olan *Helianthus annuus* (ayçiçeği) tohumundan yapılan bir başka besiyeri olan Pal agar (PA) da tarif edilmiştir [12,13]. *Guizotia abyssinica* gibi egzotik tohumların her yerde bulunması kolay değilken aksine *Helianthus annuus* her yerde bulunmaktadır ve çok ucuzdur. Dolayısıyla, biz bu çalışmada *Helianthus annuus*'dan dolayı kafeik asit içeren PA'ı (i) *C. neoformans* kökenlerinin fenol oksidaz etkinliğini belirlemek ve ayrıca (ii) ilk kültür besiyeri olarak *C. neoformans* kolonilerini *C. albicans*'inkilerden renk farkıyla ayırtedebilmek bakımından değerlendirdik.

## YÖNTEM ve GEREÇLER

Bu çalışmada 57 *C. neoformans* kökeni kullanıldı: bunların sekizi çevre kaynaklı (biri topraktan, üçü el yapımı doğal lifli eski kağıtlardan olmak üzere dördü İstanbul'da, dördü İtalya'da kuş gübresi ile kontamine topraktan ayrılmış) olup 49'u insan kökenleriydi (46'sı İtalya'da AIDS' lilerin ve diğerleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde dissemine kriptokokkozlu bir hastanın BOS ve idrar örneklerinden, ve bir başka hastanın deri lezyonlarından) [14]. Tüm kökenlerin tanımı Sabouraud dekstroz agar (SDA)'da 37 °C'de mukoid koloniler geliştirme, çini mürekkebi preparatlarında maya hücrelerinin etrafında kapsül bulunması, karbohidratları (glükoz, maltoz, sukroz, laktoz, galaktoz, trehaloz) fermente etmemeleri, beklenen asimilasyon profili (glükoz, maltoz, sukroz, galaktoz, sellobiyoz, inozitol, ksiloz, rafinoz, dulcitol olumlu ve laktoz, melibiyoz olumsuz) ve olumlu üreaz deneyi sonucuna dayanarak tekrar doğrulandı. *C. neoformans* kökenleri, deneylerden önce +4 °C'de saklandı ve saflığından ve optimal gelişmeden emin olmak için ard arda iki kez SDA besiyerinde pasajları yapıldı. *C. neoformans* ATCC 90112 ve 8 *Candida albicans* (ATCC 10231, ATCC 14033, ATCC 24433, ATCC 24550, ATCC 26535, ATCC 36802, ATCC 64552 and ATCC 90028) kökenleri tüm deneylerde kontrol olarak kullanıldı. Her deneyde PA'ın yanısıra Niger seed agar (NSA) besiyerine de ekimler yapıldı [11]. Deneye alınan tüm *C. neoformans* ve *C. albicans* kökenlerinin koloni rengini kontrol etmek üzere SDA kullanıldı. PA tuzsuz ayçiçeği tohumundan hazırlandı, kabuğu ve iç kısmı birlikte kullanıldı. Ayçiçeği özütünü hazırlamak için 45 g tohum öğütüldü ve 1 l suda 45 dakika kaynatılıp soğutulduktan sonra filtre kağıdından süzülde. Sodyum klorür (1 g) ve agar (20 g) eklendi, hacim 1 l'ye tamamlanıp pH 5.5'a ayarlandı. Karışım 120 °C'de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 90-mm çaplı Petri kutularına 25 ml olarak dağıtıldı. *Guizotia abyssinica* özütü hazırlamak için 70 g tohum öğütüldü ve 350 ml distile suya eklendi, 121 °C'de 10 dakika otoklavlandı ve süzülde. Sonra glükoz (1 g), kloramfenikol (400 mg), gentamisin (25 mg) ve agar (20 g)

eklendi. 200 ml özüt 800 ml distile su katılarak 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı ve 90 mm çaplı Petri kutularına 25 ml olarak dağıtıldı. Fenol oksidaz etkinliğini belirlemek için kökenler PA ve NSA plaklarına yayıldı ve etüvde 30 °C'de 2-5 gün bekletildi. Koloni rengi 5 gün boyunca her 24 saatte bir kez görsel olarak incelendi. Pal besiyerinin ilk kültür besiyeri olarak *C. neoformans* ve *C. albicans*'ı ayırdediciliğinin araştırılması için rastgele seçilen 10 *C. neoformans* kökeni kontrol *C. albicans* kökenleri ile ikili kombinasyonlar halinde karıştırılarak kullanıldı. Her maya asıntısı tek başına 5 ml steril tuzlu suda (% 0.85) hazırlandı ve hücre yoğunluğu 530 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometre ile % 0.5 McFarland standardı yardımıyla belirlendi. Stok inokulum süspansiyonu tekrar steril tuzlu su ile 1:10 seyreltilde ve 1 dakika vorteks ile karıştırıldı. İkili süspansiyonlar her maya asıntısından 1 ml (1:1) eklenip vorteks ile 1 dakika karıştırılarak hazırlandı. Plaklar 0.05 ml karışık maya asıntısı ile, azaltma yöntemiyle inoküle edildi ve 30 °C'de 2-5 gün inkübe edildi. Her deneyde kontrol olarak SDA da PA besiyerinin yanısıra kullanıldı. Koloni rengi ve sayımı 5 gün boyunca 24 saatte bir kez yapıldı. Petri kutusunda ekim alanının üçüncü ve dördüncü bölgesindeki tek tek duran, yuvarlak, kahverengi koloniler sayıldı ve ortalaması koloni sayısı olarak alındı.

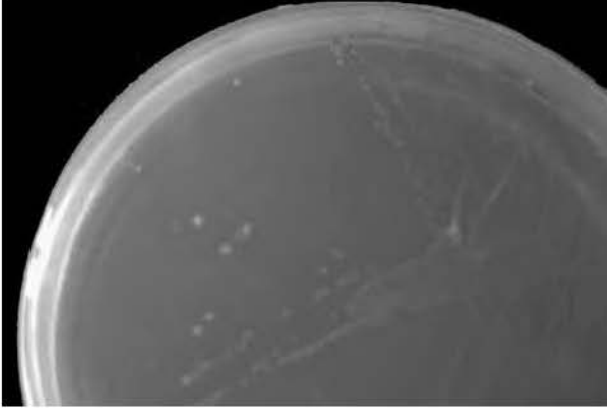
## BULGULAR

Altmışaltı maya kökeninin tümü PA'da iyi ürediler. Tüm *C. neoformans* kökenleri 48-72 saatlik inkübasyondan sonra hem PA, hem de NSA plaklarında kahverengi tipik koloniler geliştirdiler (Şekil 1). Her iki agar besiyerinde de *C. neoformans* kökenleri 48-92 saat inkübasyondan sonra, kahverengi koloniler geliştirerek beyaz koloniler üreten *C. albicans*



Şekil 1. *C. neoformans*'ın NSA (Bölüm 1'de) ve PA (Bölüm 2'de) fenoloksidaz etkinliğinin karşılaştırılması.

kökenlerinden belirgin olarak ayırtedildiler (Şekil 2). Koloni sayısı, her plakta iki mantar için de yaklaşık aynı sayıda bulundu.



Şekil 2. Karışık maya asıntısı ile inoküle edilen PA'da gelişen kahverengi *C.neoformans* ve beyaz renkli *C.albicans* kolonileri.

### TARTIŞMA

*C. neoformans* infeksiyonunun en sık karşılaşılan klinik şekli dissemine menenjit olmakla beraber, olağan giriş kapısı solunum yoludur ve infeksiyon sıklıkla akciğerlerde başlar. Ancak pulmoner kriptokokkoz tanımlanması daha seyrekler. Buna kısmen, solunum yolu örneklerinde ağız ve boğaz mukozasında kolonize olmuş olan *C. albicans*'ın da birlikte bulunması ve kültürde *C. neoformans* kolonilerini maskeleymesi de sebep olabilir. Bu durum, mukoza kandidozuna da açık olan HIV infeksiyonlu hastalarda daha da büyük önem taşıyabilir. Seçicilik yeteneği daha yüksek olan bir besiyeri geliştirmek için bugüne kadar fenollü bileşikler ve enzim etkinliğinin uygun koşulları hakkında ileri çalışmalar yapılmıştır [15-18]. *Helianthus annuus* (ayçiçeği) tohumundan yapılan PA besiyeri, esasen bu vasatta melanine benzer pigment geliştiren *C. neoformans*'ın ayrımı ve tanımı için geliştirilmiştir. Pal agar *C. neoformans*'ın hem çevre örneklerinden ayrılması hem de insan mikozlarından *C. neoformans* kolonilerinin hızlı tanımlanması için kullanılmıştır [12,19,20,21]. Bu besiyeri aynı zamanda bu mantarın eşeyli çaprazlanması için de değiştirilmiştir [20]. Yakın tarihlerde PA besiyeri *Candida dubliniensis*'in *C. albicans*'dan ayırtedilmesi için de önerilmiştir [22]. Bu çalışmada biz PA'nın *C. neoformans* kökenlerinin fenol oksidaz etkinliğinin belirlenmesi ve *C. neoformans* kolonilerinin renk farkıyla *C.albicans* kolonilerinden ayırt edilmesi için kullanılabilirliğini araştırdık. Çalışmamızda hem PA hem de NSA besiyerlerinin *C. neoformans* kolonilerinin *C. albicans*'ınkilerden ayırtedilmesinde güvenilir sonuçlar verdiğini gözlemledik. Bu durum, özellikle hem *C. neoformans* hem de *C.albicans* infeksiyonuna açık olan HIV infeksiyonluların ağız, trakea sekresyonları, idrar ve dışkı örneklerinin kültüründe önem kazanmaktadır. Ayrıca, kriptokokkoz HIV ile infekte olmayan habis tümörlüler,

diyabetliler gibi risk altındaki diğer hastalarda veya olasılıkla mantarın kaynağı ile temas etmiş olan sağlam görünümlü kimselerde genellikle geç tanımlanabilmektedir [8]. Yurdumuzda kriptokokkoz halen nadir bir infeksiyon olmakla birlikte *C. neoformans* doğa kaynağıyla temas yoluyla bulaştığı bildirilen olgular azımsanmayacak sayıdadır [22, 23]. Bu sebeple PA besiyerinin rutin kullanımı bu mantarın beklenmedik olgulardan da erken aşamada farkedilip ayrılması için yararlı olabilecektir. Çalışmamızda hem *C. neoformans* hem de *C. albicans*'ın her plakta yaklaşık aynı sayıda koloni ürettikleri gözlemlendiğinden koloni sayımının belirleyici bir değeri olmadığı sonucuna varılmıştır. Deneylerimizde *C. albicans*'ın birlikte gelişmesi *C. neoformans*'ın gelişmesini *in vitro* baskılamamıştır. Yakın tarihlerde Al Mosaïd ve ark. da *C. albicans* ve *C. dubliniensis* kökenlerinin PA'da iyi geliştiklerini bildirdiler [24]. Böylece, PA besiyerinin *C.neoformans*'ın renk farkı ile ayırtedilmesi için yararlı bir seçici besiyeri olmakla birlikte, *C. albicans*'ı baskılayarak *C.neoformans*'ı ayırtedici bir besiyeri olmadığı gözlemimiz Al Mosaïd ve ark. [24]'nın bulgularıyla da uyumludur. Bu çalışmada Pal besiyerinin *C. neoformans* için gayet uygun bir belirleyici besiyeri olduğu bulundu. PA ayrıca her yerde bulunabilen tohumlar kullanılarak rutin laboratuvar koşullarında kolay ve ucuz hazırlanabilen bir besiyeri olduğundan mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanımı geniş bir hasta populasyonundan *C. neoformans* infeksiyonunun erken ve hızlı tanımında yararlı olabilecektir.

### KAYNAKLAR

1. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993), French Cryptococcosis Study Group. Clin Infect Dis 1996; 23: 82-90.
2. Perfect J, Casadeval A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin N Am 2002; 16: 837-874.
3. Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, Tracie G, Sattah M, Ponce de Leon G, Baughman W, Hajjeh RA. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. Clin Infect Dis 2003; 36: 789-794.
4. Viviani MA, Swinne D, Kouzmanov A, Dromer F, Tintelnor K, Lemmer K, Velegriki A, Radka N, Polacheck I, Antinori S, Cogliati M, Esposto C, Nowicka J, Velho R, Vasilyeva N, Colom Valiente F, Petrini B, Polak AM, Schar G, Hoepelman H, Johnson E. Survey of cryptococcosis in Europe: the ECMM Working Group report. Abstracts of 6th ECMM Congress, Barcelona, 9-11 November, 2000.
5. Viviani M. Epidemiological survey of cryptococcosis in Europe. Mycology Newsletter, February 2003: 6-7.
6. Van Elden LJ, Walenkamp AM, Lipovsky MM, Reiss

- P, Meis JF, DE Marie S, Dankert J, Hoepelman AL. Declining number of patients with cryptococcosis in the Netherlands in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14: 2787-2788.
7. Tintelnot K, Schar G, Polak A. Epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland: part of ECMM survey in Europe. *Mycoses* 2001; 44: 345-350.
  8. Kantarcioğlu S, Yücel A. Epidemiology of human cryptococcosis in Turkey in 1953-2003. In: *Trends in Medical Mycology*. Bologna, Monduzzi Editore, 2003: 59-66.
  9. Aberg JA, Mundy LM, Powderly WC. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection. *Chest* 1999; 115: 734-740.
  10. Nunez M, Peacock JE, Chin R. Pulmonary cryptococcosis in the immunocompetent host. *Chest* 2000; 118: 527-534.
  11. Staib F, Seibold M, Antweiler E, Frolich B, Weber S, Blisse A. The brown color effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralblatt Bakteriologie Microbiologie Hygiene Supplementum* 1987; 266: 167-177.
  12. Pal M, Onda C, Hasegawa A. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Vet. Sci* 1990; 52: 1171-1174.
  13. Pal M. Pulmonary mycosis in a pigeon handler due to *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. 2nd International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis. Milan (Italy), 1993. Abstracts, pp. 4-5, p. 119.
  14. Yücel A, Kantarcioğlu AS. Doğadan ayırdığımız dört *Cryptococcus neoformans* kökeni ve bu mantarın ekolojisinde bitkinin yeri. *İnfeksiyon Dergisi* 2001; 2: 205-214.
  15. Chaskes S, Tyndall RL. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 509-514.
  16. Pulverer C, Korth H. *Cryptococcus neoformans*: Pigmentbildung aus verschiedenen Polyphenolen. *Med Microbiol Immunol* 1971; 175: 46-51.
  17. Shaw CE, Kapica L. Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Appl Microbiol* 1972; 24: 824-830.
  18. Chaskes S, Tyndall RL. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 146-152.
  19. Sasaki K, Matsusaka N, Sato I, Tsuda S, Tsutsumi K, Ito K, Hasegawa A, Pal M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon excreta. *J Jpn Vet Med Assoc* 1999; 52: 521-524.
  20. Pal M. First report of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. *Rev Ibero Am Mycol* 1997; 14: 181-183.
  21. Douchet C, Chandenier J, Barrabes A, Therizol-Ferly M, Richard-Lenoble D. Reconnaissance rapide de colonies de *Cryptococcus neoformans* par une méthode simple. *J Mycol Med* 1995; 5: 122-123.
  22. Kantarcioğlu, A.S. ve A.Yücel, "Epidemiology of human cryptococcosis in Turkey (1953-2003)", *Proceedings of Trends in Medical Mycology (September 28-October 1, 2003, Amsterdam, The Netherlands)* Milano, 59-66, Monduzzi Editore 2003.
  23. Kantarcioğlu AS, Gülenç M, Yücel A, Uzun N, Taşkın T, Sakız D, Altaş K. Cryptococcal parotid involvement: an uncommon localization of *Cryptococcus neoformans*. Report of a case. *Med Mycol (baskıda)*.
  24. Al Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4787-4789.