

Denizli şehir merkezinde güvercin (*Columba livia*) çıkartılarında *Cryptococcus neoformans* varlığının araştırılması

Investigation of *Cryptococcus neoformans* in excreta samples of urban pigeons
(*Columba livia*) lived in Denizli city center

Şafak Pelek*, Serhat Altinkaya*, Uğur Bayram Korkmaz*, Çağrı Ergin**

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

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

Özet

Amaç: Doğada kolonize olan *Cryptococcus neoformans*, özellikle immünsüprese hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilen kapsüllü bir maya mantarıdır. Güvercin (*Columba livia*) dışkısı veya diğer kanatlı türlerinin çıkartıları ile bulaşın olduğu toprakta sıklıkla bulunabilmektedir. Denizli şehir merkezinde çok sayıda güvercin yetiştiricisi ve yuvası bulunmaktadır. Bu çalışmada yerleşim alanlarında bulunan güvercinliklerde *Cryptococcus neoformans* varlığının belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Denizli şehir merkezinde 10 bölgedeki 60 farklı noktada bulunan güvercinliklerden örnek alındı. Bu örnekler bifenil ve kloramfenikol içeren Staib agar besiyerinde enkübe edildi. Üreyen koloniler konvansiyonel yöntemler ile tanımlandı.

Bulgular: Araştırmaya alınan 60 örneğin 3'ünde (%5.0) *Cryptococcus neoformans* üredi.

Sonuç: Elde edilen bu sonuç Denizli şehir merkezindeki güvercinliklerin çevresel *C.neoformans* odağı olmasına uygun olduğunu göstermektedir.

Pam Tıp Derg 2011;4(1):21-4

Anahtar sözcükler: *Cryptococcus neoformans*, güvercin, *Columba livia*, güvercin çıkartısı, kolonizasyon, çevresel

Abstract

Aim: Environmental colonizing *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast causing life-threatening disease in especially immunosuppressive hosts. It may frequently be present in urban pigeons (*Columba livia*) excreta or avian guano contaminated soil. There are numerous pigeon shelters and dovecotes in Denizli city center. The purpose of this study was to determine the presence of *C.neoformans* in public areas including dovecotes.

Materials and methods: Pigeon excreta contaminated soil specimens were obtained from 60 sampling points of different 10 locations in city center of Denizli. All samples were cultured onto Staib agar supplemented with biphenyl and chloramphenicol. Isolated colonies have been conventionally identified.

Results: *C.neoformans* has been isolated from out 3 (5.0%) of 60 samples.

Conclusion: Our findings suggest that Denizli city region's dovecotes are suitable for presence of environmental *C.neoformans*.

Pam Med J 2011;4(1):21-4

Key words: *Cryptococcus neoformans*, pigeon, *Columba livia*, pigeon excreta, colonization, environmental

Giriş

Cryptococcus neoformans, kriptomikoz etkeni, bazidiomycet sınıfından kapsüllü bir maya mantarıdır. Enfeksiyöz mantar yapılarının kolonize olduğu çevresel ortamdan, insana solunum yolu ile bulaşması sonucunda hastalık meydana gelir. *C.neoformans* enfeksiyon etkeni olmadan üst

solunum yolunda kolonize halde de bulunabilir. Çoğunlukla immün sistemi baskılanmış konakta (AIDS, kanser kemoterapisi, yaygınlaşan organ transplantasyonu vb) etkendir. Öncelikle santral sinir sistemi enfeksiyonu yapmakla birlikte cilt, göz, myokard, kemik, eklem, akciğer, prostat ve üriner sistemde de enfeksiyona neden olur [1,2].

Çağrı Ergin

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

Geliş tarihi : 08.10.2010

Kabul tarihi: 29.12.2010

Şehir ortamında bulunan güvercinler (*Columba livia*) *C.neoformans*'ın aktif taşıyıcısı olabilir. Diğer kriptokok türleri de güvercinlerde kolonizasyonu oluşturabilir [3]. Ancak güvercin dışkısının zengin kimyasal içeriğinden dolayı, güvercin çıkartıları ile zenginleşen ortamlarda *C.neoformans* kolaylıkla çoğalır. Güvercinlerin ve kanatlı hayvanların çıkartılarının *C.neoformans*'ın dünya üzerinde yayılmasında en önemli odaklar olduğu düşünülmektedir [1-5]. Aynı zamanda *C.neoformans*'ın bu ortamda eşeyli çoğalabilmesi Dünya üzerinde mayanın yayılabilmesine olanak sağlamakta, immünsüprese hastalar için risk ortamı oluşturmaktadır [6].

Dünya'da yapılanlara benzer şekilde ülkemizde de *C.neoformans*'ın çevresel kolonizasyonunu araştıran taramalar yaklaşık 45 yıldır sürdürülmektedir. Farklı merkezlerden güvercin çıkartıları ile kontamine ortamlarda *C.neoformans* izolasyonu bildirilmiştir [7-16]. Sunulan araştırmanın amacı, daha önce bu konuda tarama raporlarının bulunmadığı Denizli şehir merkezindeki güvercin çıkartılarında *C.neoformans*'ın varlığının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma; Denizli şehir merkezinde, *Cryptococcus neoformans* için doğal kaynak olan güvercin dışkısı ile kontamine güvercinliklerden, Mart-Mayıs 2009 tarihleri arasında yürütüldü. Güvercin yetiştiricilerinin bulunduğu 10 farklı mahalledeki güvercin besleyicilerine gidilerek toplam 60 örnekleme noktası araştırmaya alındı. Örnekleme, güvercin kümesinin toprak zeminindeki kuru gübre yığınınından 25-30 gr alınarak yapıldı. Örnekler, steril taşıma ortamı içinde, oda sıcaklığında aynı gün içinde

laboratuvara ulaştırıldı.

Steril bir tüpün içine 3-5 gr güvercin çıkartısı ile karışmış örnek aktarıldı. Üzerine 10-15 ml. antibiyotikli salin (%1 kloramfenikol içeren %0.9 NaCl) ilave edildi. Tüpler vortekslenerek içeriği karıştırıldı. Kaba partiküllerin dibe çökmesi için 30 dakika oda ısısında bırakıldı. Çökeltinin üstündeki sıvı bölümden eküvyon ile örnek alınarak 0.1 bifenil (Sigma B6890) ve %0.4 kloramfenikol içeren Staib agar besiyerine yaygın ekim yapıldı [17]. Besiyerleri oda sıcaklığında 2 hafta süreyle inkübe edildi. Ekimler gūnaşırı değerlendirilerek kahverengi koloni varlığı araştırıldı. Kahverengi koloni oluşturan *C.neoformans* şüpheli kolonilerden Gram boyama, üreaz aktivitesi, mısır unlu agarda hifa oluşturup oluşturumaması ve 37°C'da üreme testleri yapıldı. Staib agarda kahverengi koloni yapan (fenol oksidaz aktivitesi bulunan), Gram boyamada maya görüntüsü olan, hif oluşturmayan, 37°C'da üreyebilen ve üreaz aktivitesi bulunan kökenler *C.neoformans* veya *C.gattii* olarak kabul edildi. *C.neoformans*'ın *C.gattii*'den ayrımı için, *C.neoformans*'ın üreyemediği, *C.gattii*'nin üreyerek besiyerinin maviye dönüştüğü kanavanin-glisin-bromtimol (CGB) agar besiyeri kullanıldı [18].

Bulgular

Tablo 1'de örnek alımı yapılan bölgelerin dağılımı gösterilen 60 güvercin dışkısı örneğinin üçünden (%5.0) Staib agar besiyerinde kahverengi S morfolojisinde koloni oluşturan maya mantarları izole edildi. Hif oluşturmayan, 37°C'da üreyebilen, üreaz aktivitesi olumlu, CGB agar besiyerinde üreyemeyen bu kökenler *Cryptococcus neoformans* olarak tanımlandı. İzolasyonlar Bağbaşı, Dokuzkavaklar ve

Tablo 1. Toplanan örneklerin Denizli şehir merkezindeki semtlere ve toplandıkları ortama göre dağılımı

| Mahalle | Açık Alan | Toprak | Kümes/Barınak içi | Toplam |
|----------------|-----------|--------|-------------------|--------|
| Bağbaşı* | 1 | - | 3* | 4 |
| Dokuzkavaklar* | 1 | 1 | 5* | 7 |
| Kınıklı | 4 | 1 | - | 5 |
| Çamlık | 2 | 1 | 1 | 4 |
| İncilipınar* | 2 | - | 3* | 5 |
| Çınar | 2 | 1 | 3 | 6 |
| İstiklal | 3 | 2 | 4 | 9 |
| Fatih | 2 | 1 | 1 | 4 |
| 29 Ekim | 1 | - | 8 | 10 |
| Akkonak | 1 | 2 | 3 | 6 |
| Toplam | 19 | 9 | 31 | 60 |

* izolasyon bölgeleri

İncilipınar bölgelerinde bulunan kümes/ barınak (3/31 örnek/kümes-barınak; %9.7) örneklerinden elde edilirken, güvercin dışkısı ile bulaşmış açık alan ve toprak örneklerinden izolasyon yapılmadı (Tablo 1).

Tartışma

Cryptococcus neoformans kanatlı dışkısı bulaşmış toprakta ve özellikle kuru güvercin dışkısı olmak üzere çeşitli kanatlı dışkılarında kolonize olabilir [1,2]. Farklı kanatlıların çıkartıları ile bulaşan ortamlardan da izolasyonu yapılabilmektedir [19-21]. Aynı şekilde güvercin dışkısı ile karışan ortamda *C.neoformans*'tan başka diğer kriptokok türleri de (örn. *C.albidus*, *C.laurentii*, *C.uniguttulatus* vb) bulunabilmektedir [3-5,22]. Çevresel ortamdan izole edilen türler, kriptokokkoz tedavisinde kullanılan çeşitli antifungallere de dirençli olabilmektedir [22]. Aynı zamanda *C.neoformans* güvercin çıkartılarında kolonize olduğunda eşeyli üreme formunda da çoğalabilmekte ve bu durum Dünya üzerinde yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır [6]. Çevrede kolonize olan *C.neoformans*'ın hastadan izole edilen kökenler kadar kuvvetli olmasa da virulan köken olduğu kabul edilmektedir [2]. Ortamda kolonize olan kriptokok çoğunlukla hava hareketleri ile ortamından ayrılır ve solunum yolu ile konağa girer. Konağın bağışıklık durumuna ve/veya mayanın patojenitesine göre enfeksiyon ortaya çıkabilir. Bu nedenle immünsüpresyonu olan kişilerin güvercin ve kanatlı dışkuları ile kontamine ortamlarda bulunmamaları önerilmektedir [2,23].

C.neoformans'ın güvercin dışkuları ile kontamine olduğu ortamlardan sıklıkla izolasyonunun yapılabilesine rağmen, birçok araştırmada farklı sayıda oran bildirilmiştir. Ülkemizde özellikle kıyı bölgelerinden izolasyon yapılmıştır ve bu durumun iklim şartlarına bağlı olabileceği öne sürülmüştür [10]. *C.neoformans*'ın güvercinlikler ve güvercin çıkartıları bulaşan ortamlardan izolasyonu İzmir'den %8.8-14.3, Bursa'dan %3.2-13.9, İstanbul'dan %1-4.3 ve Kayseri'den %18.9 olarak bildirilmiştir [7-15]. İzmir'de mayanın hem A serotipi (*C.neoformans* var. *grubii*) hem de D serotipi (*C.neoformans* var. *neoformans*) varlığı gösterilmiştir [7]. Yıldırım ve ark. [10] tarafından, 1998'de yayınlanan ve Denizli şehir merkezi haricinde ülkemizin 54 şehir merkezinden toplanan örnekler ile izolasyon oranı %4.6 olarak raporlanmıştır. Yaklaşık 10 yıllık süre içinde yapılan farklı araştırmalarda, sıcak ve nemli bir iklimin bulunduğu Adana bölgesinde değişken veriler elde edilmiştir [10,24]. Hiremath ve ark. [25] özellikle flora ortamında sürdürdükleri araştırmalarında, ortamın besin, sıcaklık, nem

gibi çevresel faktörlerin varlığına bağlı olarak risk ortamı kabul edilen bölgelerde dönemsel kolonizasyon olabileceğini belirtmektedir. Bu dönemleri etkileyen fiziksel ve kimyasal faktörler ise henüz açıklanamamıştır [25]. Benzer şekilde toprağa karışan güvercin ve kanatlı çıkartılarında da *C.neoformans*'ın kolonizasyonunun etkilenebileceği öngörülmektedir. Güney Amerika ülkelerinde ise çevresel ortamdaki kanatlı çıkartılarından yüksek oranda *C.neoformans* izole edilebilmektedir [17, 26].

Yapılan araştırmalar, *C.neoformans*'ın kapsül ve hücre duvar yapılarının özelliği nedeni ile dış ortamın olumsuz etkilerine karşı dayanıklı olabileceğini göstermiştir. Özellikle kuruluğa ortamda bulunan diğer mikrobiyal popülasyondan daha dayanıklıdır [1,2]. Sunulan araştırmada, güvercin çıkartıları ile kontamine olmasına rağmen, sadece kapalı ve güneş ışığının bulunmadığı güvercin kümes ve barınaklarından (%9.7) izolasyon yapılabılırken, açık ortamlardan alınan örneklerde maya elde edilememiştir. Bu durum, örnekleme yapılırken uygun yer seçimine dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Denizli şehir merkezinde daha önceki raporlarda çeşitli ağaç kovuklarında geçici kolonizasyon varlığı bildirilmiştir [27,28]. Bu durum araştırmamızın yürütüldüğü bölgedeki iklim ve çevresel şartların doğada *C.neoformans*'ın kolonizasyonuna uygun olduğunu göstermektedir. Bu araştırmada da, flora araştırmalarına paralel bir şekilde, Denizli şehir merkezi'nde güvercin çıkartılarında *C.neoformans* kolonizasyonu saptanmıştır. Günümüzde immünsüprese hastaların giderek artması (transplantasyon, immünsüpressif tedavi vb) nedeni ile, koruyucu hekimlik alanında, bu hastaların yaşam ortamlarında güvercin gibi kanatlı çıkartılarının bulunmamasına özen gösterilmeli, durum hastalara ayrıntılı olarak açıklanmalı ve hastalar konu hakkında bilgilendirilmelidir.

Kaynaklar

1. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Ann Rev Microbiol 2006;60:69-105.
2. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998.
3. Rosario I, Hermoso de Mendoza M, Déniz S, Soro G, Alamo I, Acosta B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C.neoformans* from cloaca of pigeons. Mycoses 2005;48:421-424.
4. Rosario I, Acosta B, Colom MF. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. Rev Iberoam Micol 2008;25:13-18.

5. Rosario I, Soro G, Déniz S et al. Presence of *C.albidus*, *C.laurentii* and *C.uniguttulatus* in crop and droppings of pigeon lofts (*Columba livia*). Mycopathologia 2010; 169:315-319.
6. Nielsen K, De Obaldia AL, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. Eukaryot Cell 2007;6:949-959.
7. Karaca Derici Y, Tümbay E. İzmir İl'inde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. İnfek Derg 2008;22:53-58.
8. Tümbay E. İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve Kriptokokkoz. 1. Kısım: *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarından izolasyonu. TÜBİTAK 6. Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tebliği (17-21 Ekim 1977, Ankara) kitabında. TÜBİTAK Yayınları No. 429. Ankara: TÜBİTAK, 1979:839-866.
9. Karaman A, Tümbay E, Demir O. Bursa'da güvercin ve çeşitli kuş dışkı örneklerinde *Cryptococcus neoformans* aranması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1980;10:31-40.
10. Yıldırım ŞT, Saraçlı MA, Gönlüm A, Gün H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. Med Mycol 1998;36:391-394.
11. Yılmaz A, Göral G, Helvacı S, Kılıçturgay K, Gökırmak F. *Cryptococcus neoformans*'ın güvercin dışkılarında dağılımı. Mikrobiyol Bul 1989;23:121-126.
12. Sivrel A, Tümbay E. İzmir'de güvercin dışkısından izole edilen *Cryptococcus neoformans* suşları ve bunların amfoterisin B'ye in-vitro duyarlılıkları. İnfek Derg 1993;7:107-113.
13. Aygün G. İstanbul'da *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarda varlığının araştırılması. Cerrahpaşa Tıp Derg 1998;29:18-22.
14. Koç AN, Durkut S. Kayseri yöresindeki güvercinliklerde *Cryptococcus neoformans*, diğer medikal önemli üreaz üreten mayaların ve *Histoplasma capsulatum*'un araştırılması. İnfek Derg 2001;15:335-340.
15. Özyaral O, Keskin Y, Başkaya R, Derici K, Çevikbaş A. İstanbul Kadıköy Meydanı'ndan alınan güvercin dışkılarının mikrobiyolojik analiz sonuçları ile kent sağlığı ilişkisinin değerlendirilmesi. Kent ve Sağlık Simpozyumu, Bildiri Özetleri Kitabı, Bursa, 2006, 0193/P32.
16. Unat EK, Yücel A. Konak dışında *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma araştırmaları*. İÜ Tıp Fak Mecm 1965;28:47-52.
17. Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Silva-Vergara ML. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycoses. 2010; DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01901.
18. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). J Clin Microbiol 1982;15:535-537.
19. Irokanulo EO, Makinde AA, Akuesgi CO, Ekwonu M. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated from droppings of captive birds in Nigeria. J Wildl Dis 1997; 33:343-345.
20. Filiú WF, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RC, Lazera M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35:591-595.
21. Gugnani HC, Sandhu RS, Shome SK. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in avian excreta in India. Mykosen 1976;19:183-187.
22. Costa AK, Sidrim JJ, Cordeiro RA, Brilhante RS, Monteiro AJ, Rocha MF. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. Mycopathologia 2010;169: 207-213.
23. Tümbay E. İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve kriptokokkoz. II. Kısım. Hasta materyalinde ve normal görünüşlü kişilerin serumunda indirekt floresan antikor (IFA) yöntemi ile *Cryptococcus neoformans*'a karşı antikor araştırılması. Tübitak VI. Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tutanağı (17-21 Ekim 1977, Ankara), 1977:785-803.
24. İlkit M, Ateş A, Yula E. Environmental study of *Cryptococcus neoformans* in and around Adana, Turkey. Ann Microbiol 2006;56:97-99.
25. Hiremath SS, Chowdhary A, Kowshik T, Randhawa HS, Sun S, Xu J. Long-distance dispersal and recombination in environmental populations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from India. Microbiology 2008; 154:1513-1524.
26. Filiu WF, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RC, Lazera M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35:591-595.
27. Ergin Ç, Kaleli İ. Denizli şehir merkezi'nde kovuklu ağaç gövdelerinden *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. Mikrobiyol Bul 2010;44:79-85.
28. Ergin Ç, Şengül M, Kiriş Satılmış Ö, Yıldırım R, Gök M. *Platanus orientalis* (Doğu çınarı) ağaç kovuklarında *Cryptococcus neoformans* kolonizasyonunun takibi. Pam Tıp Derg 2010;3:60-62.