

Çevresel Örneklerde *Cryptococcus* Kolonizasyonunun ve Eşey Genotipinin Araştırılması

Investigation of *Cryptococcus* Colonization and Mating Genotype in Environmental Samples

Deniz ALKAYA¹(ID), Engin KAPLAN²(ID), Çağrı ERGİN³(ID), Macit İLKİT⁴(ID), Aylin DÖĞEN¹(ID)

¹ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Türkiye.

² İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² İstanbul University-Cerrahpaşa Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

³ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

³ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Türkiye.

⁴ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Adana.

⁴ Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Division of Mycology, Adana, Türkiye.

*Bu çalışma, 4. Çukurova Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi (21-22 Şubat 2020, Adana)'nde özet bildiri şeklinde sunulmuştur.

**Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2019-1-TP2-3466 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Makale Atfı: Alkaya D, Kaplan E, Ergin Ç, İlkit M, Döğen A. Çevresel örneklerde *Cryptococcus* kolonizasyonunun ve eşey genotipinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(1):39-48.

ÖZ

Cryptococcus türleri hem bağışıklığı baskılanmış hem de sağlıklı konaklarda meningoensefalite neden olabilen ve yaşamı tehdit edebilen insan patojenleridir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde tüm dünyada kriptokokkoz sonucu her yıl yaklaşık 112000 kişinin hayatını kaybettiği bilinmektedir. *Cryptococcus* türleri insanlar dışında güvercin, yarasa gübresi, toprak ve çeşitli ağaç türleri başta olmak üzere geniş yayılım göstermiştir. *Cryptococcus* türlerinin çoğu haploid fırsatçı insan patojenleri olmasına karşılık, türlerin yayılımının genişlemesinde ve virülansının artmasında eşeyli üreyebilme yeteneğinin büyük bir role sahip olduğu bilinmektedir. *Cryptococcus* türlerinde eşeyli üreme, eşleşme [mating tip (MAT)] lokusu olarak adlandırılan eşey gen bölgesi tarafından yönetilmektedir. Patojen *Cryptococcus* türleri, tek MAT lokusunda iki alternatif aelden hangisinin mevcut olduğu ile tanımlanan iki eşleşme tipine (MAT α ve MAT β) sahiptir. Çalışmamızda, Mersin (Gülнар, Göksu, Narlıkuyu, Ayaş, Kızkalesi, Tarsus) ve Hatay illerindeki toplam yedi bölgede bulunan çeşitli ağaç türleri (okaliptus, zeytin ve keçiboynuzu) *Cryptococcus* türlerini tespit etmek amacıyla incelenmiştir. Bu çalışmada, *Cryptococcus* türlerinin çevresel olarak yayılımının ve eşey genotipinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, zeytin, okaliptus ve keçiboynuzu ağacı olmak üzere toplam 750 ağaçtan örnek toplanarak %0.1 bifenil ve %0.5 kloramfenikol içeren Staib agar besiyerinde inkübe edilmiştir. Kahverengi pigment oluşturan maya kolonilerinin *C. neoformans* ön tanısı konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle doğrulanmıştır. Eşey genotipleri, izolatlara ait STE20 gen uzunluklarının referans *C. neoformans* suşlarına ait gen uzunlukları ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Okaliptus (n= 236), zeytin (n= 303) ve keçiboynuzu (n= 211) ağaçlarından toplanan 750 örneğin 97 (%12.9)'sinde

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Aylin Döğen, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin. **Tel (Phone):** 0505 552 6240, **E-posta (E-mail):** aylinats@mersin.edu.tr

üreme görülmüştür. Bu 97 izolatin tamamının *C.neoformans* var. *grubii* olduğu belirlenmiştir. En yüksek üreme pozitifliğinin Narlıkuyu (%78.2)'da ve keçiboynuzu (%9.4) ile zeytin (%3.5) ağaçlarında olduğu belirlenmiştir. Okaliptus ağacı kökenli örneklerde ise *Cryptococcus* varlığı tespit edilmemiştir. STE20 gen uzunlukları temelinde, izole edilen *C.neoformans* var. *grubii* izolatlarının tamamının MAT α genotipinde olduğu belirlenmiştir. *Cryptococcus* türlerinin çevresel yayılımı ve eşeyli üremede rol oynayan genlerinin dağılımı konusunda elde edilen veriler, ülkemizdeki çevresel *Cryptococcus* odak noktalarının ve bölgesel tür özelliklerinin kliniğe olası yansımaları noktasında yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Cryptococcus*; çevresel kolonizasyon; ağaçlar; eşey genotipi.

ABSTRACT

Cryptococcus species are fungal pathogens that pose a serious threat to human life and can cause meningoencephalitis in immunocompromised and healthy individuals. It was estimated that approximately 112000 people die every year due to cryptococcal-related infections all over the world, especially in immunocompromised individuals. *Cryptococcus* species can be found in soil, bat dung, pigeon droppings, and various tree species in addition to humans. Despite the majority of *Cryptococcus* species being haploid opportunistic human pathogens, it is known that the ability to undergo sexual reproduction plays a significant role in the expansion of species distribution and the increase in virulence. In *Cryptococcus* species, sexual reproduction is governed by the mating genotype gene region called the MAT locus. Pathogenic *Cryptococcus* species have two mating types (MAT α and MAT α), defined by the presence of one of two alternative alleles at a single MAT locus. In this study, various tree species (eucalyptus, olive and carob) in a total of seven regions in Mersin (Gülner, Göksu, Narlıkuyu, Ayaş, Kızılkalesi, and Tarsus) and Hatay provinces were examined to detect *Cryptococcus* species. The aim of this study was to determine the environmental distribution and sexual genotypes of *Cryptococcus* species in these regions. In the present study, samples were collected from a total of 750 trees, including olive, eucalyptus, and carob trees. The samples were incubated on Staib agar medium containing 0.1% biphenyl and 0.5% chloramphenicol. Colonies that formed brown pigment were identified as *C.neoformans* using conventional and molecular methods. The sexual genotypes were determined by comparing the lengths of the STE20 gene from the isolates compared with those of reference *C.neoformans* strains. Growth was observed in 97 (12.9%) of 750 samples collected from eucalyptus (n= 236), olive (n= 303) and carob (n= 211) trees. All 97 isolates were determined to be *C.neoformans* var. *grubii*. The highest positivity was found in Narlıkuyu (78.2%), and from carob (9.4%) and olive (3.5%) trees. *Cryptococcus* species was not detected in any of the samples derived from eucalyptus trees. Based on the lengths of the STE20 gene, it was determined that all *C.neoformans* var. *grubii* isolates were in the MAT α genotype. The data obtained regarding the environmental distribution of *Cryptococcus* species and the distribution of genes involved in sexual reproduction are believed to provide valuable guidance in terms of the potential clinical implications of environmental *Cryptococcus* hotspots and regional species characteristics in our country.

Keywords: *Cryptococcus*; environmental colonization; trees; mating genotype.

GİRİŞ

Kriptokokkoz tüm dünyada önemli bir mortalite ve morbidite etkeni olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün Ekim 2022'de yaptığı duyuruda, *Cryptococcus neoformans* insanlık için kritik önemi olanı dört patojen mantardan biri olarak bildirilmiştir¹. *Cryptococcus* enfeksiyonları çoğunlukla immün sistemi baskılanmış konakta [kazanılmış immün yetmezlik sendromu (acquired immunodeficiency syndrome - AIDS), kanser kemoterapisi, organ transplantasyonu vb.] merkezi sinir sistemini hedef almakla birlikte deri, göz, miyokart, kemik, eklem, akciğer, prostat ve üriner sistemde de görülmektedir². Kriptokokkoz ile ilişkili olarak tüm dünyada, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde her yıl yaklaşık 112000 kişinin hayatını kaybettiği bilinmektedir³. *Cryptococcus* türleri çevresel

olarak başlıca güvercin (*Columba livia*) dışkısı, toprak ve çeşitli ağaç türlerinde yayılım göstermektedir⁴. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotip A) tüm dünyada yaygın olup daha çok kanatlı dışkısı ile kontamine toprakta bulunmakla birlikte, çeşitli ağaç türlerinde (*Eucalyptus* spp., *Syzygium cumini*, *Ficus religiosa*) de kolonize olduğu bildirilmiştir⁵. Buna karşılık, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotip D) daha çok Avrupa'da görülmekle birlikte, bu serotipe, Brezilya'da okaliptus ağaçlarında (*Eucalyptus camaldulensis* ve *E. tereticornis*), Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde akmeşe (*Quercus alba*) ağaçlarında, ülkemizde ise güvercin dışkısında rastlanmaktadır^{6,7}. *Cryptococcus* enfeksiyonları ilgili mantar sporlarının kolonize olduğu çevresel ortamlardan insana solunum yoluyla bulaşması sonucu oluşur. Mating tipi (MAT) lokusu eşeyli üreme ile ilgili bir gen bölgesi olup, MAT lokus farklılıklarının *C. neoformans*'ın virülansı ve ekolojisiyle ilgili önemli bir bağlantı olduğu kabul edilmektedir⁸. *C. neoformans*'ın çevresel ortamlarda eşeyli çoğalabilmesi türün yayılabilmesine olanak sağlamakta ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için risk ortamı oluşturabilmektedir^{3,7}. Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda *Cryptococcus* türlerinin çeşitli ağaç türlerinde yayılımı bildirilmiştir⁹⁻¹². Ergin ve arkadaşları¹² tarafından belirlenen sıcaklık ve nem temelli tür dağılım modelleme haritasında, ülkemiz güney sahil şeritlerinin *C. neoformans* kolonizasyonuna açık olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, *Cryptococcus* türleri için odak noktası olma riski bulunan Mersin ve Hatay bölgesi kapsamında okaliptus, zeytin ve keçiboynuzu ağaçlarında *Cryptococcus* türlerinin varlığının araştırılması ve bu izolatlarda eşey genotipinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu yaklaşım olası bölgesel kriptokokkoz olgularının klinik ön tanısı ve izlemi için yol gösterici olacaktır.

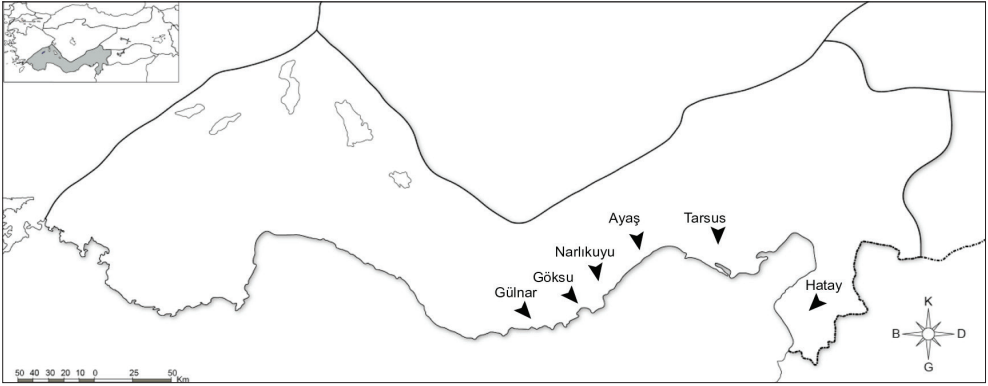
GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Toplanması ve İncelenmesi

Çalışma 2019 Nisan ve Mayıs aylarında Mersin ve Hatay arasındaki yedi bölgede (Gülнар, Göksu, Narlıkuyu, Ayaş, Kızkalesi, Tarsus ve Hatay) yürütüldü (Şekil 1). Bu bölgedeki zeytin, keçiboynuzu ve okaliptus ağaçları *Cryptococcus* cinsi maya mantarının varlığı yönünden incelendi. Çalışma kapsamında 303 zeytin, 236 okaliptus ve 211 keçiboynuzu ağacı olmak üzere toplam 750 yaşlı ağaç üzerindeki derin kovuklardan steril eküvyonlar ile toplandı (Tablo I) (Şekil 1 ve 2)¹³. Taşıma ortamı (steril %0.9 NaCl çözeltisi) ile ıslatılan eküvyonlar ağaç kovuğunun ve/veya derin yarıklarının farklı bölgelerine sürüldü ve örnekler steril tüp içine aktarıldı. Alınan örnekler aynı gün içinde laboratuvara ulaştırıldı. Tüpler bir dk süreyle vortekslenildi ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Sıvı yüzeyinden 100 µl alınarak %0.1 bifenil (Merck, Darmstadt, Almanya) ve %0.5 kloramfenikol (Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya) içeren Staib agar besiyerine (Thermo Fisher, Lenexa, ABD) ekildi. Plaklar nemli ortamda, 28 °C'de 15 gün süreyle inkübe edildi ve günün başı üreme kontrolü yapıldı. Staib agarda kahverengi pigment oluşturan kolonilerin *C. neoformans* tanısı için üreaz aktivitesi, 37 °C'de üreme, Mısırunu-Tween 80 agardaki yapısal özellikleri ve Kanavanin-Glisin-Bromtimol agarda (Merck, Darmstadt, Almanya) üremenin yokluğu görülerek konuldu^{9,10}. Ayrıca, *C. neoformans* izolatlarının tanısı moleküler yöntemler ile de doğrulandı. Çalışmada, kontrol suşu olarak *C. neoformans* KN99 Aa, *C. neoformans* KN99 Aα, *C. neoformans* JEC 20, *C. neoformans* JEC 21, *C. neoformans* LA 55 ve *C. neoformans* R265 standart suşları kullanıldı.

Tablo 1. Mersin ve Hatay Bölgelerinden Toplanan Örneklerin Konum ve Ağaç Türlerine Göre Dağılımı

Ağaç/ Konum (n; %)	Mersin						Hatay
	Gülнар (225; 30)	Göksu (135; 18)	Narlıkuyu (23; 3)	Ayaş (19; 2.5)	Kızkalesi (23; 3)	Tarsus (125; 16.6)	(200; 26.6)
Zeytin (303; 40.4)	86	60	7	-	-	-	150
Keçiboynuzu (210; 28)	128	25	16	19	23	-	-
Okaliptus (236; 31.4)	11	50	-	-	-	125	50



Şekil 1. *Cryptococcus* yönünden taranmış olan alanlar; (▲).



Şekil 2. Yaşlı ağaç üzerindeki derin kovuklardan örnek alınımı.

DNA İzolasyonu

Sabouraud glikoz agarda (SGA; Merck, Darmstadt, Almanya) canlandırılan *C. neoformans* kolonilerinden bir öze dolusu hücre 400 µl TEN tamponu [50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 10 µl proteinaz K (20 mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, ABD) ve litikaz (5 U/µl) (Sigma)] ve 100 µl %10'luk SDS içeren karışıma eklenerek 10-15 sn vorteksledi. Ardından 55 °C'de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerine 600 µl fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklenip vorteksledi. Daha sonra 12000x g'de beş dk santrifüj edildi. Üst faz ayrı bir mikrosantrifüj tüpü aktarıldı ve üzerine 600 µl soğuk izopropil alkol eklenip karıştırılarak 12000x g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra çökelti üzerinde kalan faz dökülerek, üzerine 600 µl soğuk %70'lik etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Ardından 8000x g'de beş dk santrifüj edildi. Alkolün uzaklaştırması ve kurutma işleminden sonra 80 µl distile su ile süspanse edildi¹⁴.

ITS Amplifikasyonu

ITS 1-4 primerleri (ITS1: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G, ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] gerçekleştirildi. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde, 12.5 µl 2x karışım (Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix, Odense, Danimarka), 0.5 µl (100 pmol/µl) her bir primer, 10.5 µl distile su ve 1 µl kalıp DNA eklenerek hazırlandı. Amplifikasyon, ısı döngü cihazında (Techne Prime, Staffordshire, Birleşik Krallık) 95 °C'de beş dk ilk denatürasyonu takiben, 35 döngü 95 °C'de 45 sn, 57 °C'de 60 sn ve 72 °C'de bir dk ve son olarak 72 °C'de beş dk olacak şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri %1 agaroz jel elektroforezi ile incelendi. ITS bölgeleri PCR'de çoğaltılan örnekler dizileme yapılarak tür düzeyinde tanımlama yapıldı⁹.

Eşey Gen Bölgesinin Belirlenmesi

Eşey gen bölgesi tipleri STE20 geni hedeflenerek PCR yöntemi ile tarandı. Bu kapsamda, *C. neoformans* var. *grubii* özgül STE20 Aa ve STE20 Aα mating tipleri ile *C. neoformans* var. *neoformans* özgül STE20 Da ve STE20 Dα mating tipleri özgül primerler^{9,10} (Tablo II) kullanılarak PCR amplifikasyonu ile; 12.5 µl 2x PCR karışımı (Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix, Odense, Danimarka), her bir primerden 0.5 µl (100 pmol/µl), 1 µl kalıp DNA ve 10.5 µl distile su içeren toplam 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu 95 °C'de altı dk ilk denatürasyon sonrası 36 döngü 95 °C'de 45 sn, 60 °C'de (STE20 Da için 50 °C) 45 sn, 72 °C'te 1.5 dk ve son olarak 72 °C'de yedi dk koşullarında gerçekleştirildi.

BULGULAR

Toplanan örneklerin 97 (%12.9)'sinde üreme görülmüştür. Konum temelli üreme oranları Gülnar, Göksu, Narlıkuyu, Ayaş ve Hatay için sırası ile %27.5 (62/225), %28.5 (10/13), %78.2 (18/23), %26.3 (5/19) ve %1 (2/200) olarak saptanmıştır. Kızkalesi ve Tarsus kökenli örneklerde ise üreme saptanmamıştır. Zeytin ve keçiboyunuzu ağacı örnek-

Tablo II. Eşey Gen Bölgesi Özgül Primerler

	Primer Adı	Nükleotit Dizileri (5'-3')	Baz Çifti [Base Pair (bp)]
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	STE20 Aa F	CTA ACT CTA CTA CAC CTC ACG GCA	457
	STE20 Aa R	CGC ACT GCA AAA TAG ATA AGT CTG	
	STE20 Aα F	GGC TGC AAT CAC AGC ACC TTA C	330
	STE20 Aα R	CTT CAT GAC ATC ACT CCC CTA T	
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	STE20 Da F	CAC ATC TCA GAT GCC ATT TTA CCA	728
	STE20 Da R	AGC TCT AAG TCA TAT GGG TTA TAT	
	STE20 Dα F	CTT AAT TCA CAG CAC CAG CCT A	592
	STE20 Dα R	GGT CAT CAC AGT CAG TCA CCA C	

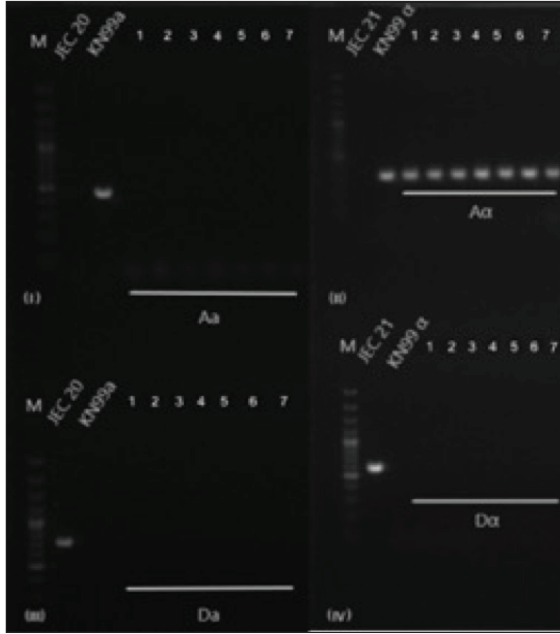
Tablo III. *Cryptococcus* İzolatlarının Ağaç ve Konumlarına Göre Dağılımı

Ağaç/Konum	Üreme (n= 97/750; %12.9)						
	Gülнар	Göksu	Narlıkuyu	Ayaş	Kızkalesi	Tarsus	Hatay
	62/225 (%27.5)	10/13 (%28.5)	18/23 (%78.2)	5/19; (%26.3)	0/23; (%0)	0/125; (%0)	2/200; (%1)
Zeytin (n= 27/303; %3.5)	15/86 (%17.44)	5/60 (%8.33)	5/7 (%71.42)	-	-	-	2/150 (%1.33)
Keçiboynuzu (n= 70/211; %9.4)	47/128 (%36.71)	5/25 (%20)	13/16 (%81.25)	5/19 (%26.31)	0/23	-	-
Okalıptus (n= 0/236; %0)	0/11	0/50	-	-	-	0/125	0/50

lerinin sırasıyla %3.5 (27/303) ve %9.4 (70/211) oranında üreme görülmüştür. Toplanan okalıptus ağacı örneklerinde ise üreme saptanmamıştır (Tablo III). Elde edilen 97 izolatın CGB agarda üreyebilmeleri, ITS 1-4 pozitif PCR, *C. neoformans* var. *grubii* STE20 MAT gen bölgesi primerleri ile PCR pozitif, *C. neoformans* var. *neoformans* STE20 MAT gen bölgesi primerleri ile ise PCR negatif olmaları sonuçları temelinde tüm izolatların *C. neoformans* var. *grubii* olduğu belirlenmiştir. Eşey gen bölgesi analizi sonucu izole edilen *C. neoformans* var. *grubii* suşlarının amplifikasyon ürün uzunluklarının 330 baz çifti [base pair (bp)] ve MAT Aα genotipinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, Mersin ve Hatay il sınırları içindeki yedi konumda (Gülнар, Göksu, Narlıkuyu, Ayaş, Kızkalesi, Tarsus ve Hatay) bulunan zeytin, keçiboynuzu ve okalıptus ağaçları *Cryptococcus* varlığı ve eşey gen bölgeleri yönünden klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. İncelenen toplam 750 örneğin %12.9 (97/750)'unda üreme görülmüş ve izolatların tamamının *C. neoformans* var. *grubii* olduğu saptanmıştır.



Şekil 3. Eşey gen bölgesine ait PCR jel görüntüsü; (I): M: Moleküler ağırlık belirteci, JEC20, KN99a ve Aα *Cryptococcus* suşu (1-7), (II): M: Moleküler ağırlık belirteci, JEC21, KN99a ve Aα *Cryptococcus* suşu (1-7), (III): M: Moleküler ağırlık belirteci, JEC20, KN99a ve Da *Cryptococcus* suşu (1-7), (IV): M: Moleküler ağırlık belirteci, JEC21, KN99a ve Da *Cryptococcus* suşu (1-7).

Örnekleme yapılan konumlar temelinde en fazla üremenin Narlıkuyu (%78.2)'da olduğu, bunu Göksu, Gülnar, Ayaş ve Hatay konumlarının izlediği kaydedilmiştir. Örnekleme yapılan ağaç türüne göre ise en yüksek üreme pozitifliği %9.4 (70/211) ile keçiboyunu ve %3.5 (27/303) ile zeytin ağaçlarında kaydedilirken, okaliptus kökenli örneklerde üreme görülmemiştir (Tablo III). *C.neoformans* var. *grubii* izolatlarının tamamının MAT Aα genotipinde olduğu belirlenmiştir.

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* ve *C.neoformans* var. *grubii* dünya genelinde bir dağılıma sahipken *C.neoformans* var. *gattii* özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde daha sınırlı bir küresel dağılıma sahiptir^{15,16}. Cogliati ve arkadaşlarının 2012-2015 yılları arasında ülkemizin de içinde olduğu toplam 12 ülkeyi (Türkiye, İtalya, İspanya, Hollanda, Fransa, Hırvatistan, Portekiz, Almanya, Yunanistan, Kıbrıs, Libya ve İsrail) kapsayan çalışmasında¹⁵; ağaç oyukları, çiçekler, yapraklar, kabuklar, meyveler, çürüyen odunlar, ağaçların altındaki toprak ve ağacın üzerinde veya yakınında bulunan kuş dışkıları olmak üzere geniş çeşitlilikte örnek kaynağı taranmıştır. Buna göre, tüm Akdeniz çevresinde *C.neoformans* kolonizasyonu saptanmışken *C.gattii* kolonizasyonu ise Yunanistan, Güney İtalya ve İspanya bölgelerinde görülmüştür. En yüksek çevresel

kolonizasyon İtalya (%43) ve Türkiye (%12)'de saptanmıştır. Keçiboynuzu ve zeytin ağaçlarının temel kolonizasyon odakları olduğu kaydedilmiştir. Serna-Espinosa ve arkadaşlarının Kolombiya'daki çalışmasında¹⁷, *C.gattii*'nin bölgedeki varlığı saptanmış ve bu türün ülkedeki farklı ekolojik koşullara yüksek oranda uyum sağlayabildiği gösterilmiştir. Ergin ve arkadaşları¹⁰, Türkiye'deki *Cryptococcus* kolonizasyonunun büyük bir kısmının Akdeniz ve Ege Bölgelerinde olduğunu göstermiştir. Şengül ve arkadaşları¹⁸, Denizli bölgesindeki kestane ağaçlarında düşük (%0.47) *C.neoformans* kolonizasyonu saptamıştır. Ergin ve arkadaşları⁹ tarafından ülkemiz Ege Bölgesinde, zeytin ve okaliptus ağaçlarında A serotipinde MATa/α, D serotipinde α genotipinde, okaliptüs ağaçlarında ise sadece D serotipinde α genotipindeki *Cryptococcus* izolatlarının varlığı kaydedilmiştir. Peker ve arkadaşları¹⁹, Alanya Dim çayı çevresindeki zeytin, keçiboynuzu ve okaliptüs ağaçlarında %2.04 (1/79) oranında *C.neoformans* kolonizasyonu saptamıştır. Gökçen ve arkadaşları²⁰, Muğla ili Milas ilçesinde bulunan okaliptüs ağaçlarından %3 (3/100) oranında *C.neoformans* kolonizasyonu saptamışlardır. Ergin ve arkadaşları¹⁰ tarafından ülkemiz Güney Ege ve Akdeniz Bölgesindeki Toros dağlarındaki okaliptüs ağacı (n= 1175) taramasında yalnızca bir örnekte *C.neoformans* var. *grubii* kolonizasyonu kaydedilmiştir.

Bağışıklık sistemi baskılanmış konakta etken olan *Cryptococcus* spp., AIDS ile ilişkili *Cryptococcus* enfeksiyonlarında kritik düzeyde ölümlere yol açmaktadır. Rajasingham ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmaya³ göre, HIV-pozitif bireyler arasında *Cryptococcus* enfeksiyon prevalansının %4.4 olduğu ve global ölçekte HIV-pozitif bireylerde *Cryptococcus* enfeksiyonlarının ölümlerin %19'unu oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Wiele ve arkadaşlarının Peru'da yaptığı bir çalışmada²¹, yüksek etkin antiretroviral tedavi öncesi, 20 HIV pozitif kişiden elde edilen 48 *C.neoformans* izolatının genetik varyasyonu retrospektif olarak incelenmiştir. Tüm izolatlar MATα eşleşme tipine sahip olup 39'u VNI ve yedisi VNII moleküler tip olup bunlar *C.neoformans* var. *grubii* serotip A'ya karşılık gelmektedir; ayrıca, iki izolatta VNIII AD hibridi olarak tespit edilmiştir.

Cryptococcus spp.'nin etken olduğu meningoensefalit, dünyada en yaygın invaziv mantar enfeksiyonlarından biridir. Rakotoarivelo ve arkadaşları²², CD4 hücre sayıları $\leq 200/\mu\text{l}$ olan 129 HIV-pozitif hastadan üç *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* izole etmiş ve genotiplerini VNI-αA (üç izolat), VNII-αA (dört izolat) veya hibrit VNI/VNII-αAAα (altı izolat) olarak bildirmiştir. Bu durum, yüksek çeşitliliği belirlemek yanında kriptokokkoz prevalansının Madagaskar'da yüksek olduğunu ve bu ciddi durumun, HIV ile enfekte hastalarda yaşamı tehdit ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak, *Cryptococcus* spp.'nin bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızın, ülkemizde çevresel *Cryptococcus* kolonizasyon bölgelerinin ve klinik ile ilgili risk haritasının belirlenmesi hedefine önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda, ülkemizde *Cryptococcus* kolonizasyon noktalarının olası mevsimsel ve iklimsel değişimlerinin takip edilerek belirlenmesi şüphesiz ilgi çekici olacaktır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmadaki referans *Cryptococcus* suşlarını sağlayan Prof. Dr. Joseph Heitman (Duke Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji ve Genetik Laboratuvarı)'a eşsiz katkı ve yardımlarından ötürü teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241> (Accessed date: 19.05.23).
2. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol 2006; 60: 69-105. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>
3. Rajasingham R, Govender NP, Jordan A, Loyse A, Shroufi A, Denning DW, et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: A modelling analysis. Lancet Infect Dis 2022; 22(12): 1748-55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00499-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00499-6)
4. May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: From environmental saprophyte to global pathogen. Nat Rev Microbiol 2016; 14(2): 106-17. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>
5. 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(6): 421-4. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01153.x>
6. Rosario I, Acosta B, Colom MF. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. Rev Iberoam Micol 2008; 25(1): 13-8. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70020-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70020-2)
7. 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(6): 949-59. <https://doi.org/10.1128/EC.00097-07>
8. Fu C, Sun S, Billmyre RB, Roach KC, Heitman J. Unisexual versus bisexual mating in *Cryptococcus neoformans*: Consequences and biological impacts. Fungal Genet Biol 2015; 78: 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.008>
9. Ergin C, Şengül M, Aksoy L, Döğen A, Sun S, Averette AF, et al. *Cryptococcus neoformans* recovered from olive trees (*Olea europaea*) in Turkey reveal allopatry with African and South American lineages. Front Cell Infect Microbiol 2019; 9: 384. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00384>
10. Ergin C, İlkit M, Hilmioğlu S, Kaleli I, Gülbaba AG, Demirci M, 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(1): 43-7. <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000038431.72591.7e>
11. Ergin Ç, Şengül M, Kiriş Satılmış Ö. Türkiye'nin Güney-Batı Anadolu bölgesindeki ilgın (Genus: Tamarix L.) ağaçlarında *Cryptococcus neoformans* kolonizasyonu takibi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2014; 44: 158-62.
12. Ergin Ç, Şengül M, Döğen A, İlkit M. Türkiye genelinde *Cryptococcus neoformans*'ın tür dağılımının tahmini. Mikrobiyol Bul 2019; 53(2): 233-8. <https://doi.org/10.5578/mb.67999>
13. Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Prakash A, Khan ZU, Xu J. Seasonal variations in the prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decayed wood inside trunk hollows of diverse tree species in north-western India: A retrospective study. Med Mycol 2011; 49(3): 320-3. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.516457>

14. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(6): 511-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00659.x>
15. Cogliati M, D'Amicis R, Zani A, Montagna MT, Caggiano G, De Giglio O, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Res* 2016; 16(4): fow045. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow045>
16. Cogliati M, Desnos-Ollivier M, McCormick-Smith I, Rickerts V, Ferreira-Paim K, Meyer W, et al. Genotypes and population genetics of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Europe and the mediterranean area. *Fungal Genet Biol* 2019; 129: 16-29. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.001>
17. Serna-Espinosa BN, Guzmán-Sanabria D, Forero-Castro M, Escandón P, Sánchez-Quitian ZA. Environmental status of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Colombia. *J Fungi (Basel)* 2021; 7(6): 410. <https://doi.org/10.3390/jof7060410>
18. Şengül M, Kutlu M, Döğen A, Aksoy L, Gonca S, İlkit M, et al. Denizli bölgesinde kestane (*Castanea sativa*) ağacından *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2019; 53(1): 61-9. <https://doi.org/10.5578/mb.67583>
19. Peker MT, Ergin C. Kriptokokkoz için risk faktörü olarak Alanya şehir merkezinde *Cryptococcus neoformans* kolonizasyonunun ilk izolasyonu. *Pamukkale Tıp Derg* 2022; 15(1): 23-8. <https://doi.org/10.31362/ptd.873972>
20. Gökçen H, Ergin Ç. Muğla Milas ilçe yerleşimi bölgesi *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Pamukkale Tıp Derg* 2014; 7(2): 109-12. <https://doi.org/10.5505/ptd.2014.71676>
21. Van de Wiele N, Neyra E, Firacative C, Gilgado F, Serena C, Bustamante B, et al. Molecular epidemiology reveals low genetic diversity among *Cryptococcus neoformans* isolates from people living with HIV in Lima, Peru, during the pre-HAART era. *Pathogens* 2020; 9(8): 665. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080665>
22. Rakotoarivelo RA, Raberahona M, Rasamoelina T, Rabezanahary A, Rakotomalala FA, Razafinambintsoa T, et al. Epidemiological characteristics of cryptococcal meningoencephalitis associated with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from HIV-infected patients in Madagascar: A cross-sectional study. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14(1): e0007984. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007984>