

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İSTANBUL'DA DOĞAL KAYNAKLARINDAN
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS ARAŞTIRILMASI

(Uzmanlık Tezi)

49049

Dr. Gökhan Aygün



İstanbul 1996

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANİZYASYON MERKEZİ

ÖNSÖZ

Uzmanlık öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yetişmemizde büyük emeği geçen, her konuda yardımını gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Ekrem Kadri UNAT 'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Anabilim Dalında çalıştığım süre boyunca yetişmemde büyük emeği geçen, araştırma ve disiplinli çalışma konusunda her zaman yardımcı olan, bu çalışmanın oluşumu sırasında her aşamada engin bilgi ve birikimiyle bana ışık tutan sayın hocam Prof. Dr. Ayhan YÜCEL'e teşekkür ederim.

Yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Kemal ALTAŞ, Prof. Dr. Yaşar BAĞDATLI, Prof. Dr. Müzeyyen Mamal TORUN, Prof. Dr. Mustafa SAMASTI, Doç. Dr. Recep ÖZTÜRK ve Doç. Dr. Behzat ÇALIŞIR'a ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin toplanmasında emeği geçen yüksek lisans öğrencileri Fuat Bolat ve Mehmet Ekti'ye teşekkür ederim. Tez çalışmamın yazılması aşamasında yardımlarını gördüğüm Dr. Kenan Midilli, Dr. Kıvılcım Okyay ve Bio. Sevgi Ergin'e teşekkür ederim.

Anabilim Dalında çalıştığım süre içerisinde içten ilgi ve yardımlarını esirgemeyen asistan, hemşire, laborant ve personele ayrı ayrı teşekkür ederim.

Dr. Gökhan Aygün

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ VE YÖNTEM	13
BULGULAR	22
TARTIŞMA	24
SONUÇ	31
FOTOĞRAFLAR	32
ÖZET	34
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	36

GİRİŞ

Mantar infeksiyonlarının sıklığı giderek artmaktadır (22,52,60). Bunun en önemli sebebi mantar infeksiyonuna yatkın kişilerin sayısındaki belirgin artıştır. Bu artışın sebepleri şöyle özetlenebilir (22):

- Daha sık ve yoğun uygulanan kemoterapi
- Giderek sayısı ve çeşitliliği artan transplantasyon uygulamaları
- Yoğun bakım birimlerindeki belirgin gelişmeler
- Yeni ve daha sık uygulanan protezler
- İntravenöz ilaç bağımlılığındaki artış
- Parenteral beslenme olanakları ve uygulamadaki gelişmeler
- Yoğun olarak uygulanan yeni ve geniş etki spektrumlu antibiyotikler
- Gelişen ulaşım ağı ile birçok endemik mantar ile temas
- Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu (AIDS)

Bilinen yaklaşık 250 000 mantar türü arasından insanda hastalık yapanlar 200 civarındadır. Fakat duyarlı insan sayısındaki artış, daha birçok mantarın da insanlarda hastalık yapabileceğini göstermektedir. Daha önce, normal flora veya kirlenme etkeni olarak değerlendirilen pekçok mantar, bugün etken olarak tanımlanmaktadır. *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Drechslera*, *Saccharomyces cerevisiae*,... gibi örnekler verilebilir (9,60,83).

Mantar infeksiyonlarının patogenezi yeterince tanımlanamamıştır. Konağın direnci en belirleyici özelliktir. Mantarın hastalandırıcılık gücü, miktarı ve özellikleri de önemlidir. 37° C'de üreyebilme, düşük oksidasyon-redüksiyon potansiyellerine uyum sağlayabilme mantarın insanda derin dokuları tutan infeksiyon oluşturabilmesini sağlayan temel özelliklerdir. Tüm bu bilgiler ışığında, mantar infeksiyonları gerçek mantar infeksiyonları ve fırsatçı (oportünist) mantar infeksiyonları olarak ayrılmaktadır. Belirgin artış özellikle fırsatçı mantar infeksiyonlarında olmaktadır (83).

Toprak, hayvanlar ve insanlar mantarların başlıca kaynağını oluştururlar. Fırsatçı mantarların büyük çoğunluğu, toprakta bol miktarda bulunmaktadır: *Aspergillus spp*, *Pseudoallescheria boydii*, *Cryptococcus neoformans* gibi (3,80,83).

Toprağın mantarlar için önemli bir kaynak olduğu konusunda öncü çalışmalar Emmons'a aittir (29,30). Bazı mantarlar için toprağın özellikleri belirleyici olmaktadır. *Coccidioides immitis* ancak belli toprak yapısına sahip bölgelerde

saptanabilen endemik bir mantardır. Histoplasma capsulatum kuş, tavuk ve yarasa dışkıları ile kirlenmiş toprakta; Cryptococcus neoformans özellikle güvercin dışkıları ile kirli alanlarda yoğun olarak bulunur (3,63,83).

Kriptokokkoz sıklığı ve önemi giderek artan fırsatçı bir mantar infeksiyonudur (47,52,60). AIDS hastalarındaki belirgin sıklığı dikkat çekicidir (16,17,22). Cryptococcus neoformans'ın toprakta bulunduğunu da ilk kez Emmons göstermiştir (29). Emmons ve diğer araştırmacılar, Cryptococcus neoformans'ın özellikle güvercin başta olmak üzere, kanatlı dışkısı ile kirlenmiş alanlarda yoğun olarak bulunduğunu belirlemişlerdir ve dünyanın farklı yerlerinden alınan örneklerde farklı yoğunluklarda Cryptococcus neoformans saptamışlardır (2,3,8,13,29-32,67,76,88). Farklı yoğunluklarda oluşunun sebebi, toprağın yapısı, içerdiği mikroorganizmaların bileşimi ve coğrafya özellikleri ile açıklanmaktadır (3,30,76,80,83).

Kriptokokkoz ülkemizde de bulunmaktadır (5,36,43,68,82,92). İlk olgu 1953 yılında Soysal, Unat ve Tahsinoğlu tarafından yayınlanmıştır (68). Yurdumuzda da doğal kaynaklarından bu mantarın ayrılması yönünde çalışmalar yapılmış ve farklı sonuçlar alınmıştır (40,66,76,81).

Çalışmamızın amacı İstanbul'da Cryptococcus neoformans'ın doğal kaynaklarındaki varlığı ile yoğunluğunun araştırılması ve bunun öneminin epidemiyoloji yönünden tartışılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

A- Mantar Infeksiyonları

Mantarlar ve mantarlara bağlı hastalıklar giderek artan bir ilgi ve önemle ele alınmaktadır (22,52,60). Günden güne mantar infeksiyonlarının sayısı artmakta ve gereken önem verildikçe yeni ve ilginç tablolar tanımlanmaktadır: Candida sendromu ve allerjik aspergillus sinüziti gibi (60). Bunun yanısıra mantar infeksiyonlarına duyarlı kişilerin sayısındaki artışa paralel olarak, fırsatçı mantar infeksiyonları daha ağır seyirli ve ölümcül olabilmeleri sebebiyle daha fazla önem taşımaktadır. Mantar infeksiyonlarını oluşturdukları klinik tablolar ve diğer yapı özelliklerine göre ikiye ayırarak inceleyebiliriz (83):

a) Gerçek mantar infeksiyonları: Bu gruptaki mantarlar endemik olarak belli bölgelerde bulunur. Bu bölgedeki insanların çoğunu infekte ederek genelde sessiz

infeksiyona yol açarlar. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, ağır hastalık tabloları oluşturabilirler. Bu mantarlar da "termal dimorfizm" vardır. 37° C'de ve insan vücudunda maya kolonileri oluştururken, 26° C'de, besiyerlerinde küf kolonileri oluştururlar. En bilinen örnekler *Coccidioides immitis* ve *Histoplasma capsulatum*'dur.

b) Fırsatçı mantar infeksiyonları: Bu gruba giren mantarlar normalde her zaman ortamda yaygın olarak bulunurlar. Bağışıklığı baskılanmış insanları hastalandırırlar. Bu mantarlarda termal dimorfizm yoktur. En bilinen örnekleri *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, zigomisetlerdir. Daha önceleri insan için hastalandırıcı sayılmayan pekçok mantarın hastalık etkeni olabileceği gösterilmiştir (9).

Doğal ortamına ve insana bulaşma yoluna göre de mantarları üç grupta toplamak mümkündür (83) :

- İnsancıl
- Hayvancıl
- Toprakçıl

Bulaşma çeşitli araçlarla deri, mukoza ve solunum yollarından olabilir. İnsandan insana bulaşan mikozlar genelde yüzlek olanlardır. İç organları tutan mantarların ise insandan insana bulaşmadığı, bunların çevreden edinildiği anlaşılmaktadır.

B- Cryptococcus neoformans

a) Tarihçe (20,45,61,83,89)

Cryptococcus neoformans ilk kez 1894 yılında, Sanfelice tarafından meyve sularından ayrılmış ve *Saccharomyces neoformans* olarak adlandırılmıştır. Aynı yıllarda Almanya'da Busse ve Buschke sarkom tanısı ile izledikleri bir hastada bu mantarı üretmişlerdir. 1901 yılında Vuillemin bu iki mantarı incelemiş ve *Cryptococcus türü* olarak sınıflamıştır.

1950'li yıllara gelindiğinde, Emmons mantarın doğal kaynağı olarak toprağı ve güvercin dışkılarını belirlemiştir (29-31). Daha sonra Staib'in öncü çalışmaları (69-71), Seeliger (63), Ajello (1,3), Shields (64) gibi araştırmacıların katkılarıyla *Cryptococcus neoformans*'ın kolayca tanımlanabildiği besiyerleri geliştirilmiştir.

Çeşitli çalışmalar sonrasında, 1960'ların sonlarında dört ayrı serotip (A,B,C ve D serotipleri) belirlenmiştir. Kwon-Chung'ın öncü çalışmalarıyla (44,45) mantarın eşeyli şekli (tam şekli) tanımlanmıştır. Daha sonra iki ayrı varyete bildirilmiştir: Varyete *neoformans* (A ve D serotipleri) ve varyete *gattii* (B ve C serotipleri). 1980'li yıllarda eşeyli şeklinin basidiyomisetler arasında sınıflandırılabilceği ve *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* ile *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (var. *gattii*) olarak ayrılabilceği

belirtilmiştir. 1990 yılında var. gattii'nin doğal kaynağının Eucalyptus camaldulensis ağaçları olduğu saptanmıştır (27,28). Daha sonra mitokondriyal DNA poliformizmi gibi yöntemlerle karotip haritaları oluşturulmuştur (26).

Türkiye'deki ilk olgu Soysal, Unat ve Tahsinoğlu tarafından 1953 yılında bildirilmiştir (68). Anđ ve arkadaşlarının 1973 yılında pankreas kanserli bir hastanın balgamından ayırdıkları Cryptococcus neoformans yurdumuzda ilk defa incelenen köken olmuştur. Doğal kaynaklarından Cryptococcus neoformans araştırılması konusundaki ilk çalışma ise 1965 yılında Unat ve Yücel'in İstanbul'da yaptıkları "Konak dışında Histoplasma capsulatum ve Cryptococcus neoformans

araştırmaları" isimli çalışmadır (83). Araştırmacılar her iki mantarın da inceledikleri örneklerde bulunmadığını bildirmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda 1977'de Tümbay İzmir'de (76), 1980'de Karaman, Tümbay ve Demir Bursa'da(40) güvercin dışkılarından mantarı ayırmışlardır. Sivrel ve Tümbay (66), 1993 yılında İzmir'de yaptıkları bir başka çalışmada güvercin dışkılarından Cryptococcus neoformans ayırmışlar ve bu kökenlerin in vitro amfoterisin B duyarlıklarını araştırmışlardır.

b) Yapı Özellikleri (20,45,61,83,89)

Parazit durumundayken hemen hemen yuvarlak, 5-10 µm çapında, etrafı kapsüllü bir mantardır. Kapsül genelde 10-15 µm çapındadır, nadiren dev kapsüllü kökenler gözlenebilmektedir. Doğal ortamda, genç kültürlerde kapsül ya çok azdır ya da hiç görülmez. Bu kökenler infeksiyon oluşturduğunda, kapsül yapısı belirginleşebilir. Dokularda periyodik asit shift (PAS) ve gümüşleme boyama yöntemleri ile boyanmaz ve maya hücreleri şeklinde boşluk olarak izlenir. Özel yöntemlerle kapsül boyanabilir.Çini mürekkebi ile ortam boyanarak kapsül yapısı kolayca belirlenebilir. Gram boyamada, Gram olumlu maya hücreleri izlenir; genelde tanımlanamasa da bazı özellikleri uyarıcı olabilir (10).

Bazı hücreler tomurcuklanır ve ana hücreye dar bir boyunla bağlanırlar. Bunun dışında yalancı hif, klamidospore ve çimlenme borusu oluşturmazlar. Bazen küçük çıkıntılar yapabilirler. Elektron mikroskopu ile incelemelerde hücre duvarında iç ve dış tabaklar ayırdedilir ve kapsül 20 nm'lik parçalar halinde izlenir. Eşeyli şekillerde eşleşen hücrelerin iki çekirdeği farklı yönlerden hareketle yeni oluşan hücrelere doğru yol alır ve basidiyumlar üzerinde basidiyosporlar oluşur. Basidiyosporlar eşeyli dönemi tamamlarlar ve maya hücrelerine dönüşürler. Bu dönüşüm sonucu kriptomikoz oluşur ve varyeteler ayırdedilebilir. Varyetelerin ayırımında monoklonal antikorlar, biyokimya farklılıkları, üreme ve yaşama özellikleri kullanılabilir (47). Ayırımında kullanılmak üzere bazı özel besiyerleri de tanımlanmıştır (44).

c) Yaşama ve üreme özellikleri (20,45,61,83,89)

Cryptococcus neoformans aerobuttur; 37° C'de ve oda ısısında üreyebilir. 37° C'de üreyebilmesi diğer kriptokoklardan ayırdedilmesini sağlayan bir özellik olmakla beraber 37° C'de üremeyen kökenler de vardır. 39° C üzerinde üreyemezler; 44° C'de bir süre canlı kalabilirler. Bu bilgilere dayanarak, kriptokok meninjitlerinde ısı ile tedavi önerilmiştir (42).

Üreme genelde 2-3 gün içinde olmaktadır. Kültürün negatif olarak kabul edilmesi için 4-6 hafta süre ile inkübe edilmesi gerekir. Sabarraud dekstrozu agar (SDA) üremesi için yeterlidir. Bunun yanında birçok besiyerinde de kolayca ürer. Çalışmamız sırasında Unat'ın balıklı buyyonu ile hazırlanan çukulatamsı agar, % 5 koyun kanlı agar, adi jelöz besiyerlerinde *Cryptococcus neoformans*'ın 48-72 saat içinde saydam, küçük, düzgün yüzeyli koloniler oluşturduğu; birkaç gün içerisinde sarımsı-mat kolonilere dönüştüğü izlenmiştir. Löwenstein-Jensen besiyerinde 10-14 günde sarı, mukoid koloniler oluşturduğu da gözlenmiştir.

Kolonilerinin mukoid görünümde olması kapsül yapısıyla ilgilidir. Bekletilmekle eğri besiyerlerinin dip kısmında birikir. Sıvı besiyerlerinde zar oluşturmaz.

Cryptococcus neoformans glukoz, galaktoz, mannoz, früktoz, maltoz ve sakkarozu assimile ederken, laktozu assimile edemez. Potasyum nitratı assimile edemezken, kreatinini assimile edebilme özelliği *Cryptococcus neoformans*'ın kuş dışkılarında yoğun olarak bulunmasını açıkladığı gibi, önemli bir ayırdettirici özelliktir. İnosit'i kullanması ile rhodotorula'dan, yalancı hif yapmaması ile candida ve tricosporondan, üreaz etkinliği ile torulopsisten ayrılır. Üreaz olumsuz kökenler de bildirilmiştir (7).

Kaffeik asit ve fenollerin varlığında, fenol oksidaz etkinliği ile kahverengi boya oluşturur. Bu maddeleri içeren bir yapıya sahip olan *Guizzotia abyssinica* tohumlarıyla yapılan besiyerinde kahverengi boya oluşumu oldukça özgüldür. Bu özellik, birkaç *Cryptococcus laurentii* kökeni dışında, diğer kriptokoklarda ve maya türlerinde saptanmamıştır. Kahverengi boya hücre duvarının iç tabakasında yeralan fenol oksidazın bir ürünü olan melaninden kaynaklanır. Bu enzim ortama yayılmadığından, sadece mantarın kolonileri kahverengi olur (53).

Bu mantar, sikloheksimid (aktidiyon)'a duyarlıdır. Difenilin milyonda yüz oranlarına ise duyarlı değildir. Bunun için kirli ortamlardan mantarı elde etmek amacıyla, besiyerlerine difenil ilave edilmektedir.

d) Antijen yapısı (20,45,61,89)

Glukuronoksilomannan (GXM) yapısındaki kapsülü, *Cryptococcus neoformans*'ın en belirgin antijen özelliğini oluşturur. Kültür üst sıvılarından elde edildiğinde molekül ağırlığı çok yüksektir (1 milyon dalton). Serotip ayrımı bu

antijendeki farklılıklara göre yapılır ve ksilollenme miktarı serotipleri belirler. Böylelikle dört ayrı serotip ayrılır: A,B,C ve D. Pnömonokoklar, Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae ile çapraz reaksiyon verebildiği bildirilmiştir.

Hücre duvarı polipeptidleri de incelenmiş ve bazı antijen yapıları ortaya konmuştur. Hücre duvarında az miktarda β -glukan ve kitin bulunduğu saptanmıştır. Glukanaz enzimi etkisi ile protoplast ve sferoplast şekilleri elde edilebilir. Serotip A kültürü üst sıvılarında farklı nötral bir polisakkarid saptanmıştır. Asit ortamda ürediğinde kriptokoklar hücre dışına nişasta salgırlar. Tamda bundan yararlanılabilir.

GXM yapısındaki antijenin tayini çok iyi bir tanım ve izleme göstergesi olarak kullanılmaktadır (15,35,41,57). Antikor yanıtı hastalarda genelde oluşmaz. Bu yüzden tanımda faydalı değildir.

e) Hastalandırıcılık faktörleri (20,45,61,89):

1- Polisakkarid kapsül: Kapsül yapısı en önemli hastalandırıcılık faktörüdür. Mutasyonla kapsül yapıcı özelliğini kaybeden kökenler hastalık oluşturamamaktadırlar. Kapsülsüz hücrelerin hızla fagosite edilmesi, kapsülün fagositozu önleyerek etkili olduğunu göstermiştir. Kapsül büyüklüğü ile hastalandırıcılık arasında belirgin bir ilişki kurulamamıştır (50).

2- Fenol oksidaz: Fenol oksidaz mantarın di-polifenol yapılarının varlığında boya oluşturmasını sağlar. Bu özelliği seçtirici besiyeri oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu enzim aynı zamanda önemli bir hastalandırıcılık faktörüdür ve bu enzim etkinliği kaybolan Cryptococcus neoformans'lar farelerde hastalık oluşturamazlar. Fenol oksidazın etkisi ile oluşan melaninin, mantarı konağın oksidatif sistemlerinden koruduğu sanılmaktadır. Ayrıca, fenol oksidazın noradrenalin, DOPA, dopamin gibi katekolaminleri substrat olarak kullanabilmesi, klinikte en sık olarak meningoensefalit yapmasında kolaylaştırıcı faktör olarak kabul edilmektedir (47).

3- 37° C'de üreyebilme: 37° C'de üreyemeyen mantarlar kapsülleri ve fenol oksidaz etkinlikleri bulunsa bile farelerde hastalık oluşturamamaktadırlar. Doğal kaynaklardan ayrılan kökenler dah geç ürerler ve daha düşük hastalandırıcılığa sahiptirler.

Bunlardan başka proteolitik etkinliklerinin de bir hastalandırıcılık özelliği olabileceği bildirilmiştir (11).

f) Hayvanlara etki (20,45,56,61,83,89):

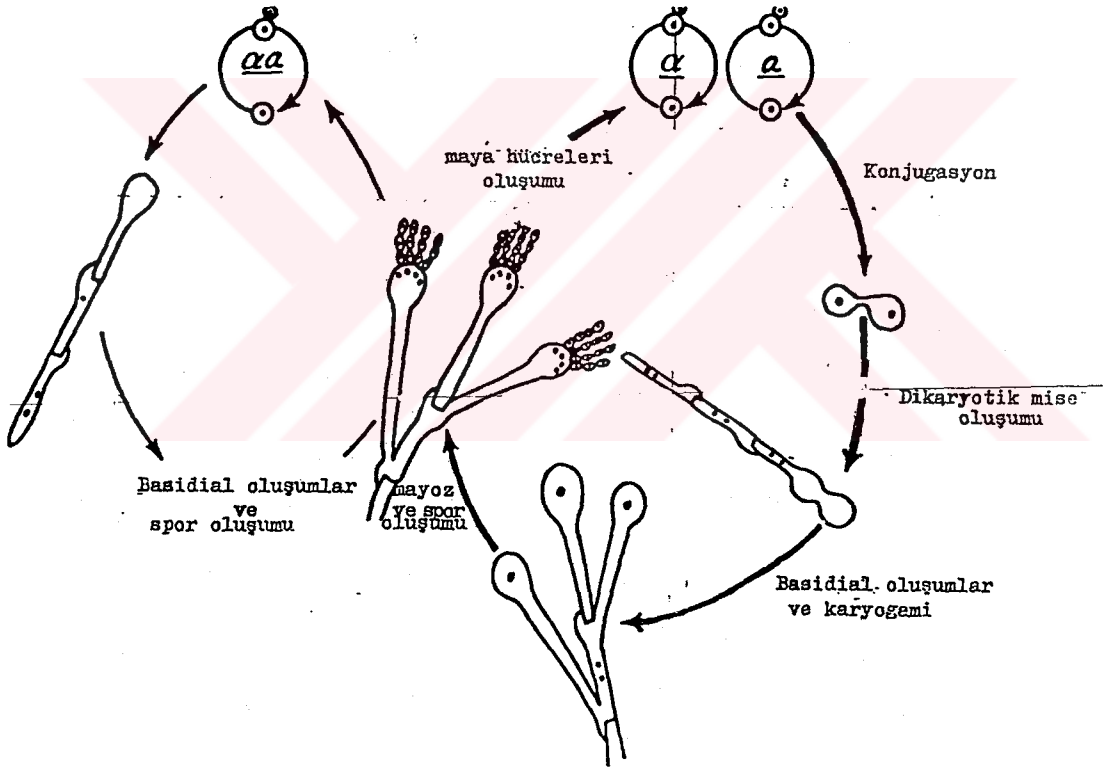
Cryptococcus neoformans'ın birçok hayvanda hastalık yaptığı bilinmektedir. At, sığır, keçi, leopar, kedi, köpek, gelincik, ceylan, fare, kobay, maymun... Hayvanlara bulaşma da genelde solunum yoluyla olmaktadır. Deri ve meme

dokusu da giriş yeri olabilmektedir. Genel olarak hayvanlarda solunum ve sinir sistemi, deri tutulumu görülür. Sığır, koyun, keçi gibi hayvanlarda mastit sık rastlanan bir klinik tablodur.

Kanatlılar bu mantara vücut ısıları yüksek olduğu için dirençlidir ve güvercin dahil tüm kanatlılar bu mantar için konak değildir.

Laboratuvar hayvanları içinde fareler, kobay, sıçan ve tavşanlara göre daha duyarlıdır. Periton içi, damar içi ve beyin içi yollarla bulaştırma ile duyarlı hayvanlarda hastalık oluşturabilir. Genelde bu mantar ile infekte edilen hayvanlar 4 hafta içinde ölürlür. Bu hayvanların beyinlerinde ve diğer organlarında bulaştırılan mantar görülüp ayrılabilir. Maymunların ağız hayvanların infekte edilebildikleri bildirilmiştir (73). Tavuk embriyonları da damar içi yolla infekte edilebilirler (42).

g) Mikolojisi ve yaşam çizgisi (20,45,61,83,89)



Şekil 1. *Filobasidiella neoformans*'ın yaşam çizgisi (Kwon-Chung ve Bennet'ten değiştirilerek alınmıştır) (45).

Doğa ve klinik örneklerin çoğu, haploid ve heterotalliktir. Ancak bazıları kendi kendilerini dölleyebilirler ve kendileri basidiyosporlar oluşturabilirler. Bu kökenlerin diploid ve anöloid oldukları saptanmıştır.

Konjügasyon özel ortamlarda, 25-37° C arasında laboratuvar koşullarında oluşturulabilmektedir. sonuçta oluşan sporların hepsi genetik olarak aynı olmamaktadır. Oluşan sporlar ortama salındıklarında, kuru ve kapsülsüz durumdadır. Birkaç saat içinde gelişmiş, kapsüllü, tomurcuklanan maya hücreleri haline gelirler.

Cryptococcus neoformans var. *gattii*'nin yaşam çizgisi var. *neoformans* ile aynı olmakla beraber, bölmeli hifler oluşturmaz. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* oval yapısı, 37° C'de geç (4-5 günde) üremesi, antijen farklılığı (B,C), L-malik asidi çabuk kullanabilmesi, D-pirolini kullanabilmesi, üreaz etkinliğinin edetik asit (EDTA) ile önlenbilmesi ile var. *neoformans*'tan ayrılır. Ayrım için birçok özel besiyeri de tanımlanmıştır: Kanavanin-Glisin-Bromtimol agar (CGB), Kreatinin-Dekstroz-Bromtimol agar (CDB), Glisin-Sikloheksimid-Fenol Kırmızısı agar (GCP) gibi. Ayrıca var. *gattii*'nin farklı epidemiyoloji özelliklerine sahip olması, oluşturduğu hastalığın daha ağır seyretmesi ve tedaviye dirençli olması da var. *neoformans*'tan ayırılmasında yardımcı olur (44,47).

Doğal kaynaklar da her iki varyetede farklıdır. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* için doğal kaynaklar, güvercin dışkıları ve toprakken, var. *gattii*'nin saptanan tek kaynağı *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarıdır (47).

C - KRİPTOKOKKOZ

Cryptococcus neoformans insanda, meningoensefalit ve akciğer infeksiyonları başta olmak üzere çok değişik klinik tablolar oluşturabilen bir mantardır. Oluşturduğu hastalık kriptokokkoz olarak adlandırılır. Ayrıca torulozis, Busse-Buschke hastalığı ve Avrupa blastomikozu gibi isimler de verilmiştir.

a) Epidemiyoloji:

Dünyanın her tarafında görülebilen, sıklığı giderek artan bir mantar infeksiyonudur. İnsanlardan başka hayvanlarda da hastalık oluşturabilmektedir (45,47,60,83). Hayvandan insana bulaşma bildirilmemiştir. Kornea transplantasyonu yoluyla ve sistemik kriptokokkozlu bir hastanın kanıyla kirli injektörün ele batması ile gelişen nodüler kriptokok lezyonu dışında insandan insana bulaşma ve laboratuvar infeksiyonu bildirilmemiştir (47).

Doğal kaynağı toprak ve güvercin başta olmak üzere kanatlı dışkıları ile kirli alanlardır (3,80,83). Emmons topraktan % 0.5, Ajello % 1.3 oranında ayırdıklarını bildirmişlerdir (29,2). Buna karşılık, Emmons güvercin dışkılarında % 69 oranında bu mantarın varlığını göstermiştir (31).Daha sonra dünyanın

pekçok farklı bölgesinden kanatlı dışkılarında bu mantarın farklı oranlarda bulunduğu (% 0.7 ile % 80 arasında) belirlenmiştir (3,8,13,31,32,67,76,88). Bu bilgiler ışığında mantarın toprakta bulunduğu, fakat olumsuz koşullar sebebiyle baskılanmış olarak kaldığı, kendileri için çok iyi bir üreme ve yaşama ortamı oluşturan kreatininden zengin kuş çıkartılarında bol olarak ürediği ve uzun süre canlı kaldığı ortaya konmuştur (1-3,29-31).

Toprak mikrobiyotasında bulunan bakteri (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi) ve amiplerin (özellikle akantomoebalar), bu mantarın büyüme ve çoğalmasına engel oldukları gösterilmiştir (61,80,83).

Cryptococcus neoformans ayrıca meyvelerde, sebzelerde, arı yuvalarında, sineklerde, otlarda, süt ve süt ürünlerinde ve birçok tohum çeşidinde saptanmıştır (31,33,48,83). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, mantarın güvercin dışkısı ve diğer kanatlıların dışkısında bulunduğu gösterilmiş, fakat topraktan ayrılamamıştır (40,66,76,81). Ayrıca Tümbay saman örneklerinde mantarı araştırmış, fakat saptayamamıştır (76).

İnsana bulaşma solunum yolu ile olmaktadır. Deriden, sindirim sistemi mukozasından da bulaşma mümkündür. Bazı bölgelerde sağlıklı insanlarda boğaz ve deride, ayak parmak aralarında geçici kolonizasyon olabileceği bildirilmiştir (58). *Cryptococcus neoformans*, *cryptococcus* cinsi içinde bilinen tek hastalandırıcı türdür, fakat *Cryptococcus albidus* ve *Cryptococcus laurentii* de etken olarak bildirilmişlerdir (19,39).

Kriptokokkoz sıklığı giderek artmaktadır (22,47,52). Bağışıklık sistemi baskılanmış insan sayısındaki artış, özellikle AIDS'teki artış bunun en önemli sebebidir (16,17,45,47). Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) AIDS hastalarında, kriptokokkoz oranı % 5-7 iken; bu oran Batı Avrupa'da % 3-6; Afrika'da % 33 oranındadır (45). 1994 yılında sadece ABD'de 400 000 yeni AIDS olgusu belirlendiği gözönüne alınırsa, kriptokokkoz sıklığının daha da artacağı söylenebilir (23,45,60). Hatta kriptokok meningoensefaliti, *Pneumocystis carinii* pnömonisi, *Mycobacterium avium-intracellulare* infeksiyonu, Kaposi sarkomu ile beraber AIDS'e özgü hastalıklar olarak tanımlanmaktadır (23,45). Ayrıca limforetiküler sistemin habis hastalıkları, kortikosteroid ve bağışıklığı baskılayıcı tedaviler, tüberküloz, sarkoidoz, diyabet gibi hastalıklar da kriptokokkoza zemin hazırlar. Belirgin bir bağışıklık sorunu olmayan kişiler de hastalanabilirler (45,47,60,83,91).

Sağlıklı kişilerde, özellikle güvercin besleyicilerinde belirgin antikor cevabı vardır ve güvercin besleyicilerinde kendiliğinden iyileşen hafif pnömoni (güvercin besleyicisi hastalığı) gelişebileceği bilinmektedir (34,78).

Tüm bu bilgilere rağmen doğal kaynaklardan *Cryptococcus neoformans*'ın insana nasıl bulaştığı aydınlatılamamıştır. Kuluçka süresinin bilinmemesi bu konuda karar verilmesini zorlaştırmaktadır. Bazı hastaların, güvercin dışkıları ile

kirli ortamlardaki *Cryptococcus neoformans*'la temasları belirlenebilmiştir. Fakat büyük bir çoğunluk incelendiğinde böyle bir temas belirlenememektedir. Güvercin besleyenlerde kriptokokkozun daha sık olduğu konusunda da bilgi bulunmamaktadır (22,23,45,51,52).

Cryptococcus neoformans var. *gattii*, AIDS epidemisinden önce tropikal bölgelerde, kriptokokkozun en sık etkeni iken, AIDS'lilerde saptanan binlerce kriptokokkoz olgusu arasında sadece 4 olgu ile sınırlı kalmıştır (22,45,47).

Ellis ve Pfeiffer yaptıkları çalışmalarla, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*'nin doğal kaynağı olarak *Eucalyptus camaldulencis* ağaçlarını saptamışlardır. Bu araştırmacılar, AIDS'lilerde var *gattii*'nin nadir bir etken olmasını hastaların şehirlerde yoğunlaşmasına karşı var. *gattii*'nin kırlık bölgelerde yoğunlaşması ile açıklamaya çalışmışlardır (27,28).

Yurdumuzda da kriptokokkoz varlığı bilinmektedir (5,43,46,68,82,92). Bildirilen olgular tek tek olgu sunuları şeklindedir. Doğal kaynaklarından mantarın ayrılması konusunda da çalışılmıştır. Özellikle epidemiyoloji çalışmaları bulunmamaktadır (45,61,89).

b) İmmunoloji:

Glukonaksilomannan yapısındaki kapsül antijeni ile yapılan deneysel çalışmalarda, sağlıklı gönüllülerde IgM, IgA ve IgG yanıtı elde edilebilir. Kriptokok infeksiyonu sırasında ise antikor yanıtı belirlenememektedir. Kriptokoklar alternatif komplement yolunu uyarırlar ve hızla komplement tükenmesine sebep olurlar.

Kriptokoklara karşı etkili savunma T-limfositleri ve makrofajlar yoluyla gerçekleşir. Nötrofiller ilk yanıtta etkin rol oynar (24,87). AIDS'lilerdeki sıklığı T-hücre etkisinin azalması sebebiyledir (16,22).

Ölü kriptokoklar, hücre yapıları, kapsül antijenleri ile yapılan çalışmalarda koruyucu yanıt sağlanamamıştır. Korunmada asıl hastalığın iyileştirilmesi en etkili yoldur.

c) Patoloji (45,54,61,83):

Genelde kronik veya subakut iltihabi reaksiyon ile uyumlu bulgular belirlenir. Nötrofil yanıtı çok azdır. Kapsül yapıları sebebiyle jelatin kıvamında harabiyet izlenir. Nadir olarak kronik granümatöz odaklar ve nekrozlu odaklar saptanır. Beyin ve beyin zarları tutulumu sıklıkla gerçekleşir. Boyalı preparatlarda çevresi boş maya hücreleri olarak görülür.

d) Klinik (21,45,60,78):

Sıklıkla, önce akciğerlerde kısa sürede geçen bir iltihabi olay yapar. Bu genelde kendiliğinden, çoğu kez de farkına varmadan geçmektedir. En sık rastlanan klinik tablo meningoensefalittir. Pnömoni, yaygın infeksiyon, deri lezyonları, kemik-eklem tutulumları da olabilir. Sindirim sistemi tutulumu nadirdir. İlk kolon kriptokokkozisi Unat ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (82). Bazı alışılmadık tablolara da yol açabilmektedir (50,84).

Hastalık subakut veya kronik seyirlidir. Meningoensefalitin, tüberküloz meninjit ve beyin absesinden ayırımı zordur. Laboratuvar bulguları ve klinik gidiş çok kolay karışabilmektedir (12,35).

Hastalığın mortalitesi yüksektir. Tedaviye rağmen % 25-30 ölüm olmaktadır. Cryptococcus neoformans var. gattii infeksiyonlarında klinik gidiş daha kötü, tedaviye yanıt daha azdır. Özellikle AIDS'lilerde tekrar ve alevlenmeler sıktır.

e) Laboratuvar tanımı:

1) Klinik tablolarda: Öncelikle kriptokokkoz ayırıcı tanımda akla gelmelidir. Doğrudan inceleme iyi, çabuk ve kolay bir tanım yöntemidir (12). Preparat, çini mürekkebi, nigrosin ve gümüş çözeltisi ile hazırlanabilir. Kapsüllü, tomurcuklanan, yuvarlak-değirmimsi maya hücreleri görülerek tanıma gidilebilir. Balgam, abse, doku gibi örnekler % 10 sodyum hidroksit muamele edilerek çini mürekkebi ile incelenebilir (79). Kriptokok meningoensefalitinde çini mürekkebi preparatı ile başarıya ulaşma şansı % 25-50'dir (60).

Boyama yöntemlerinden Gram, Giemsa genelde çok yardımcı olmamaktadır. Bu boyalarla boyanan kriptokoklar limfositler olarak yorumlanmakta, bazen atipik limfosit olarak bildirilmektedir (10,79). Dokularda Haematoxylene-Eosin ile çevresi boş maya hücreleri olarak izlenir. Mucicarmin, Masson-Fontana daha iyi yöntemlerdir. Nadiren Cryptococcus neoformans'lar kısa yalancı hif benzeri yapılar oluşturabilmektedir (45).

Kültür için rutin besiyerleri kullanılabilir. Sikloheksimid (aktidiyon) içermeyen SDA, kanlı agar, beyin-yürek infüzyon agar (BHIA) kullanılacak besiyerleridir (45,78,79,83). Seçerek ayırıcı besiyeri yapısındaki besiyerlerinin (Bird seed agar) daha duyarlı ve çabuk sonuç verdiği gösterilmiştir (21). En iyi 26° C'de ürer. 37° C'de de üreyebilmesi önemlidir. Üreme genelde iki-üç gün içinde olur. SDA'da beyaz, mukoid koloniler oluşturur. Bekletilen kültürlerde renk biraz koyulaşır ve dipte yoğunlaşma izlenir. "Bird seed" agar (Niger seed agar, Staib-Seeliger besiyeri...) besiyerinin yüzeyinde tipik kahverengi koloniler oluşturduğu

için, bu besiyerine ekim hızlı kolay ve duyarlı bir tanım yöntemi olarak önerilmektedir (21,79). Özellikle balgam, idrar gibi kirli örneklerden kültür yapılırken bu besiyeri kullanılmalıdır. Bol sıvı şeklindeki örneklerin kültürünün, filtre yöntemi ile yapılması uygundur.

Ayrıca duyarlı bir şekilde *Cryptococcus neoformans* saptayabilen besiyerleri de geliştirilmiştir: CN screen agar, L-DOPA agar, inositol-üre-kafeik asit besiyeri, gibi (18,38A,54). Ayrıca hızlı tanım testleri de vardır (55,85).

Üreme süresi iki haftayı bulabilir ve kimi zaman 4-6 hafta sonunda üremeler olabilmektedir.

Üreyen mantarı ayırmak için yalancı hif yapmadığı, üreaz enzimi etkinliği, inositi etkileyip etkilemediği araştırılır ve böylece *cryptococcus* cinsine ait olup olmadığı belirlenebilir. Diğer *cryptococcus*'lardan, *Cryptococcus neoformans*'ı ayırmak için kreatinin assimilasyonu, karbonhidrat assimilasyon deneyleri, 37° C'de üreyebilme ve fareyi hastalandırabilme özellikleri araştırılır (1,29,76). Floresanslı antikorlar, lateks, izoenzim elektroforez testleri de geliştirilmiştir(41,57,62).

Yaygın kriptokokkoz tanımında özellikle radyometrik teknikle çalışan hemokültür sistemleri ve "lysis-centrifugation" yöntemi önerilir. Başarı şansı % 10-35 arasında değişebilmektedir (45,60).

Tanımda seroloji yöntemleri de faydalı olabilir. Antijen saptanarak tanımda GXM kapsül antijeni aranmaktadır. ELISA, floresans antikor teknikleri önerilmişse de en uygunu lateks agglutinasyon yöntemidir (15,25,45,57,60). Tedavisiz kriptokok meningoensefali olgularında bu test % 90 olumlu sonuç vermektedir. Bazı bakteri (DF-1 gibi) ve mantar (*Trichosporon beigelii* gibi) infeksiyonlarında yalancı pozitif sonuç alınabilir. Fakat asıl romatoid faktörün belirlenmesi ve uzaklaştırılması önemlidir (36). Az sayıda mantar olması, kapsül yapısının belirgin olmayışı yalancı negatif sonuç alma sebeplerindedir (60). Çok duyarlı ve özgül DNA problemleri de vardır (26,46). Tedaviye alınan yanıtın ve prognozun belirlenmesi açısından seroloji yöntemiyle kapsül antijeninin izlenmesi faydalı, fakat antikorun izlenmesi faydalı değildir.

2- Doğal kaynaklarda: Doğal kaynaklarından mantarın ayrılması için başlıca iki yöntem tarif edilmektedir:

a) Fare deneyleri: İlk kez Emmons tarafından tanımlanmıştır (29). Örneklerin tuzlu sudaki süspansiyonları bekletilerek çöktürülür ve üst sıvı 4-8 adet fareye 0.5-1 ml olarak periton içi yolla verilir. Dört-altı hafta sonra fareler öldürülür veya bu süre içinde ölen farelere hemen otopsi yapılır. Farenin beyin, karaciğer, dalağı steril olarak çıkarılarak, SDA'da kültürleri

yapılır. Üreyen kolonilerden çeşitli tanımlayıcı işlemler yapılır ve sonuçta gerekirse tekrar farelere verilerek hastalandırıcılık deneyi yapılır.

Bu yöntem zor, zaman alıcı bir yöntemdir. Ayrıca iyi bir hayvan laboratuvarı ile hayvan bakım ünitesi gerektirmektedir.

b) Kültür yöntemi: Kullanılabilecek diğer bir yöntemdir. Seçici bir besiyerine ekilen örneğe üreyen koloniler arasında tipik yapıdaki *Cryptococcus neoformans* kolonilerinin belirlenmesi ilkesine dayanır (76).

En çok önerilen besiyeri niger seed agar (bird seed, *Guizzotia abyssinica*, difenil-kreatinin agar, Staib-Seeliger besiyeri) besiyeridir. Staib'in *Cryptococcus neoformans*'in *G. abyssinica* tohumları varlığında kahverengi boya yapmasını tanımladığı ve kreatinin asimilasyonun tanıtıcı bir özellik olduğunu bildirdiği çalışmalarından sonra, seçici besiyerleri tanımlanmış ve geliştirilmiştir (64,69,71). Doğal kaynaklarından *Cryptococcus neoformans* ayrılması için, bu besiyeri sıklıkla kullanılmıştır.

Daha sonra başka birçok seçici besiyeri de tanımlanmıştır (18,54). Biz de çalışmamızda Tümbay'ın önerileri ışığında hazırlanan Staib-Seeliger besiyerini hazırladık (76), ancak biz de küçük bir ilave yaptık.

f) Antifungallere duyarlılık ve tedavi:

Tedavide amfoterisin B ve 5-flusitozin önerilmektedir (6,21). Flukanazolün etkili olduğu da gösterilmiştir (65,72). In vitro ve klinik sonuçlar uyumsuz olabilmektedir.

Ülkemizde Sivrel ve Tümbay (67) İzmir'de güvercin dışkılarından ürettikleri 11 *Cryptococcus neoformans* kökeninin amfoterisin B'ye duyarlılığını araştırmışlar ve tüm kökenleri duyarlı bulmuşlardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1) İncelenen örnekler:

İstanbul'da Nisan 1993-Aralık 1995 tarihleri arasında, çeşitli semtlerden güvercin (*Columbia livia*) dışkıları ve güvercin dışkılarıyla kirli toprak örnekleri toplandı. Güvercin dışkıları, güvercinlerin yoğun olarak yaşadığı alanlardan, camii avlularından, saçaklardan, ağaç altlarından toplandı. Yuvalardan ve kafeslerin zeminindeki bol dışkı içeren örnekler kazınarak alındı. Diğer kanatlı dışkıları çalışmaya dahil edilmedi. Toplanan örneklerin semt, tarih ve alındıkları yerlere göre dağılımları Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Nisan '93- Aralık '95 tarihleri arasında İstanbul'un çeşitli semt ve alanlarından, kafes ve yuvalardan toplanan örneklerle ilgili bilgiler (Sıralama örnek toplama bölgelerine göre yapılmıştır).

ÖRNEK NO:	YER		ÖRNEK		TARİH
1	Yenicamii	Eminönü	Ön avlu	Güvercin dışkısı	Nisan '93
2	Yenicamii	Eminönü	Yan merdiven	Güvercin dışkısı	Nisan '93
3	Yenicamii	Eminönü	Ön avlu	Güvercin dışkısı	Mayıs '94
4	Yenicamii	Eminönü	Yan merdiven	Güvercin dışkısı	Mayıs '94
5	Yenicamii	Eminönü	Ön avlu	Güvercin dışkısı	Ağustos '95
6	Yenicamii	Eminönü	Yan merdiven	Güvercin dışkısı	Ağustos '95
7	Yenicamii	Eminönü	Saçak	Güvercin dışkısı	Ağustos '95
8	Beyazıt camii	Beyazıt	Alan	Güvercin dışkısı	Aralık '93
9	Beyazıt camii	Beyazıt	Ağaç altı	Güvercin dışkısı	Mayıs '94
10	Beyazıt camii	Beyazıt	Ağaç altı	Toprak	Mayıs '94
11	Beyazıt camii	Beyazıt	Alan	Güvercin dışkısı	Mayıs '94
12	Beyazıt camii	Beyazıt	Ağaç altı	Güvercin dışkısı	Ağustos '95
13	Beyazıt camii	Beyazıt	Ağaç altı	Toprak	Ağustos '95
14	Beyazıt camii	Beyazıt	Alan	Güvercin dışkısı	Ağustos '95
15	İskele camii	Üsküdar	Avlu	Güvercin dışkısı	Mayıs '94
16	İskele camii	Üsküdar	Saçak	Güvercin dışkısı	Mayıs '94
17	İskele camii	Üsküdar	Avlu	Güvercin dışkısı	Mayıs '94
18	Mihrimah Sultan camii	Üsküdar	Avlu	Güvercin dışkısı	Haziran '94
19	Mihrimah Sultan camii	Üsküdar	Avlu	Eyüp	Haziran '94
20	Eyüp S. camii	Eyüp	Avlu	Toprak	Temmuz '94
21	Eyüp S. camii	Eyüp	Avlu	Toprak	Temmuz '94
22	Eyüp S. camii	Eyüp	Avlu	Güvercin dışkısı	Temmuz '94
23	Nuruosmaniye camii	Çemberlitaş	Avlu	Güvercin dışkısı	Mayıs '95
24	Nuruosmaniye camii	Çemberlitaş	Ağaç altı	Güvercin dışkısı	Mayıs '95
25	S.Ahmet camii	Sultanahmet	Alan	Güvercin dışkısı	Haziran '95
26	S.Ahmet camii	Sultanahmet	Yan avlu	Güvercin dışkısı	Haziran '95
27	Alman çeşmesi	Sultanahmet	Çeşme	Güvercin dışkısı	Haziran '95
28	Fatih camii	Fatih	Avlu	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
29	Fatih camii	Fatih	Ağaç altı	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
30	Çemberlitaş	Çemberlitaş	Taş çevresi	Güvercin dışkısı	Mayıs '95
31	Çemberlitaş	Çemberlitaş	Taş çevresi	Güvercin dışkısı	Mayıs '95
32	Tophane parkı	Tophane	Alan	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
33	Tophane parkı	Tophane	Ağaç altı	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
34	Tophane parkı	Tophane	Ağaç altı	Toprak	Temmuz '95
35	Beşiktaş meyd.	Beşiktaş	Alan	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
36	Denizcilik Müzesi	Beşiktaş	Alan	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
37	Taksim parkı	Taksim	Alan	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
38	Taksim parkı	Taksim	Alan	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
39	Taksim parkı	Taksim	Alan	Güvercin dışkısı	Temmuz '95
40	G.Saray lisesi	Galatasaray	Alan	Güvercin dışkısı	Eylül '95
41	G.Saray lisesi	Galatasaray	Duvar	Güvercin dışkısı	Eylül '95

Çizelge 1 (devam).Nisan '93-Aralık '95 tarihleri arasında İstanbul'un çeşitli semt ve alanlarından, kafes ve yuvalardan toplanan örneklerle ilgili bilgiler (Sıralama örnek toplama bölgelerine göre yapılmıştır).

ÖRNEK NO:	YER		ÖRNEK		TARİH
42	Fatih parkı	Fatih	Alan	Güvercin dışkısı	Ekim '95
43	Fatih parkı	Fatih	Ağaç altı	Güvercin dışkısı	Ekim '95
44	Fatih parkı	Fatih	Ağaç altı	Toprak	Ekim '95
45	Ev	Fındıkzade	Teras 1	Güvercin dışkısı	Temmuz 94
46	Ev	Fındıkzade	Teras 2	Güvercin dışkısı	Nisan '94
47	Ev	Fındıkzade	Teras 2	Güvercin dışkısı	Nisan '95
48	Ev	Fındıkzade	Teras 2	Güvercin dışkısı	Aralık '95
49	Ev	K.M.Paşa	Saçak	Güvercin dışkısı	Temmuz 93
50	Ev	Eminönü	Saçak	Güvercin dışkısı	Ağustos '95
51	Millet Cad.	Çapa	Kaldırım	Güvercin dışkısı	Ekim '95
52	Millet Cad.	Çapa	Ağaç altı	Güvercin dışkısı	Ekim '95
53	CTF	Çocuk Kl.	Saçak	Güvercin dışkısı	Temmuz 95
54	CTF	İnfeksiyon Kl.	Saçak	Güvercin dışkısı	Ağustos '94
55	CTF	Yemekhane	Saçak	Güvercin dışkısı	Eylül '95
56	CTF	Dahiliye Kl.	Saçak	Güvercin dışkısı	Eylül '94
57		Esenler	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Mayıs '93
58		Esenler	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Mayıs '93
59*		Esenler	Kafes 3	Güvercin dışkısı	Mayıs '93
60		Esenler	Kafes 4	Güvercin dışkısı	Mayıs '93
61		Esenler	Kafes 5	Güvercin dışkısı	Mayıs '93
62		Beşyüzevler	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Haziran '94
63		Beşyüzevler	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Haziran '94
64		Atışalanı	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Eylül '95
65		Atışalanı	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Eylül '95
66		Atışalanı	Kafes 3	Güvercin dışkısı	Eylül '95
67		Atışalanı	Kafes 4	Güvercin dışkısı	Eylül '95
68		Atışalanı	Kafes 5	Güvercin dışkısı	Eylül '95
69		Eyüp	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Nisan '95
70		Eyüp	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Nisan '95
71		G.Osmanpaşa	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Mayıs '95
72		G.Osmanpaşa	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Mayıs '95
73		G.Osmanpaşa	Kafes 3	Güvercin dışkısı	Mayıs '95
74	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Eylül '95
75	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Eylül '95
76	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 3	Güvercin dışkısı	Eylül '95
77	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 4	Güvercin dışkısı	Eylül '95
78	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 5	Güvercin dışkısı	Eylül '95
79	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 6	Güvercin dışkısı	Eylül '95
80	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 7	Güvercin dışkısı	Eylül '95
81	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 8	Güvercin dışkısı	Eylül '95
82	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 9	Güvercin dışkısı	Eylül '95
83	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 10	Güvercin dışkısı	Eylül '95
84	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 11	Güvercin dışkısı	Eylül '95
85	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 12	Güvercin dışkısı	Eylül '95
86	Kuşpazarı	Topkapı	Kafes 13	Güvercin dışkısı	Eylül '95

* C. neoformans üreyen tek örnek.

Çizelge 1 (devam). Nisan '93-Aralık '95 tarihleri arasında İstanbul'un çeşitli semt ve alanlarından, kafes ve yuvalardan toplanan örneklerle ilgili bilgiler (Sıralama örnek toplama bölgelerine göre yapılmıştır).

ÖRNEK NO:	YER		ÖRNEK		TARİH
87	Kuşpazarı	Unkapanı	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Ekim '95
88	Kuşpazarı	Unkapanı	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Ekim '95
89	Kuşpazarı	Unkapanı	Kafes 3	Güvercin dışkısı	Ekim '95
90	Kuşpazarı	Unkapanı	Kafes 4	Güvercin dışkısı	Ekim '95
91	Kuşpazarı	Unkapanı	Kafes 5	Güvercin dışkısı	Ekim '95
92	Kuşpazarı	Sirkeci	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Ağustos '93
93	Kuşpazarı	Sirkeci	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Ağustos '93
94	Kuşpazarı	Sirkeci	Kafes 3	Güvercin dışkısı	Ağustos '93
95		Fındıkzade	Kafes 1	Güvercin dışkısı	Kasım '95
96		Fındıkzade	Kafes 2	Güvercin dışkısı	Kasım '95
97		Fındıkzade	Kafes 3	Güvercin dışkısı	Kasım '95
98		Fındıkzade	Kafes 4	Güvercin dışkısı	Kasım '95
99		Fındıkzade	Yuva	Güvercin dışkısı	Ekim '94
100		Cerrahpaşa	Yuva	Güvercin dışkısı	Ekim '94

Zeminde kurumuş ve taze dışkı örnekleri, temiz dil basacakları ile kazınarak temiz kapanabilir naylon torbalara alındı. Örnekleri toplarken en az 10-15 gram olmalarına özen gösterildi. Toprak örnekleri, dışkı ile kirli toprakların yüzeyel kısımlarının temiz bir tahta kürekle kapanabilir torbalara aktarılması suretiyle toplandı.

Çok geniş alana yayılmış örnekleri toplarken birbirine uzak yerlerden birkaç örnek alındı ve bu örneklerin her biri ayrı örnekler olarak ele alınıp incelendi. Aynı yerlerden farklı zaman dilimleri içinde alınan örnekler de ayrı örnekler olarak değerlendirildi. Örnekler yağış olmayan günlerde toplandı.

Toplanan tüm örnekler en geç 48 saat içerisinde incelemeye alındı. İncelenmeleri 48 saati aşacak örnekler +4° C'de saklandı. Ekim ve değerlendirme işleminden sonra artakalan örnekler çalışma bitimine kadar +4° C'de saklandı. Bu saklanan örneklerden tekrar ekimler yapıldı. Kuş pazarından alınan örnekler, genelde az olduğu için ikinci ekimler yapılmadı.

2) Örneklerden *Cryptococcus neoformans* üretilmesi:

Yöntem olarak doğrudan kültür yöntemi kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce Tümbay'ın (76) önerdiği değiştirilmiş Staib-Seeliger besiyerinin etkinliği kontrol kökeni ile araştırıldı.

Kontrol kökeni olarak, 1992 yılında fakültemizin dahiliye infeksiyon seksiyonunda AIDS'li, sistemik kriptokokkoz sebebi ile ölen bir hastanın beyin-omurilik sıvısından ayrılan *Cryptococcus neoformans* kökeni kullanıldı. Bu kontrol kökeni kullanarak yaptığımız ön incelemelerde aşağıdaki gözlemlerde bulunduk:

- Özüt miktarı veya yoğunluğu artınca boya rengi belirgin olarak koyulaşmakta fakat üreme hızı ve koloni özellikleri değişmemektedir.
- Kreatinin miktarının artırılmasının hiç bir etkisi olmamaktadır.
- B vitamin kompleksi katılan besiyerinde üreme hızı ve boya yapımı etkilenmemektedir. Koloni çapı oldukça büyümekte ve mukaoideleşmektedir. Reid'in (59) çalışmaları ile özellikle tiaminin etkin olduğu belirlenmiş ve tiaminle yaptığımız çalışmalarda benzer sonuçlar alınmıştır.
- Çekildikten sonra uzun süre bekletilen tohumun boya rengini olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Döküldükten sonra uzun süre buzdolabında bekletilen besiyerlerinde de üreme azalmakta veya olmamaktadır.

Tümbay'ın değiştirdiği Staib-Seeliger besiyerinde bu gözlemler doğrultusunda bazı küçük değişiklikler yapıldı:

- Özüt 70 g yerine 100 g tohumla hazırlandı
- 5 mg/l tiamin eklendi

Amaç daha az boya yapan veya üremesi zayıf *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin de gözden kaçmamasını sağlamaktır.

Her ne kadar gözlemlerimiz bu yönde de tek bir köken ile yapılan deneysel uygulamaların yeterli kabul edilmesi doğru olmaz. İleride yapılacak çalışmalarla bu konular daha iyi aydınlatılacaktır.

Staib-Seeliger besiyeri (Tümbay'a göre değiştirilmiş)†

Guizzotia abyssinica özütü	200 ml
Dekstroz (Merck)	10 g
Kreatinin (Merck)	0.8 g
Difenil (Riedel de Häen)	100 mg
Gentamisin*(Deva)	80 mg
Agar (Biolife)	20 g
Distile su	790 ml

† Yukarıda değinildiği üzere çalışmamızda kullandığımız besiyerine tiamin 5 mg/l eklenmiş ve özüt 100 g *G. abyssinica* tohumundan hazırlanmıştır.

* Tümbay kloramfenikol yerine gentamisin kullanılmasını önermektedir. Gentamisinin etkin, ucuz ve mikolojik besiyerlerinde önerilmesinin yanısıra ticari preparatları da besiyerlerinde de kullanılabilir (74).

G. abyssinica tropikal bir bitkidir ve tohumları kuş yemi olarak kullanılmaktadır. Bu tohum İstanbul'da bulunmadığı için Almanya'dan getirildi. Tohumlar, kullanılmamış bir kahve değirmeninde çekilerek, toz haline getirildi. 70 g'ı 400 ml distile su içinde hızla çalkalanarak karıştırıldı. Karışım 120° C'de, 1 atm basınçta 10 dakika otoklavlandı. Ortaya çıkan karışım dört kat gazlı bezden süzülerek özüt elde edildi.

200 ml özüt 790 ml distile su ile karıştırıldı. İçine agar, kreatinin ve dekstroz eklenerek ısıtılarak eritildikten sonra 120° C'de, 1 atm basınçta, 20 dakika süre ile sterilendirildi. Besiyeri 50° C'ye soğuduktan sonra, içine 8 µg/ml gentamisin ve 10 ml % 95'lik etil alkol içinde eritilmiş olan 100 mg difenil eklenmesini takiben 15 ml'lik bölümler halinde steril Petri kutularına dağıtıldı. Besiyerleri kullanılıncaya değin, +4° C'de naylon torbalar içinde saklandı. Her defasında besiyerleri, kontrol kökeni ekilerek kontrol edildi.

Örnekler steril tüpler vasıtasıyla yaklaşık 5 g olarak steril Erlen-Mayer'lere alındı. Üzerine 25 ml antibiyotikli tuzlu su (ml'de 1 mg streptomisin, 1500 IU penisilin G içeren % .85'lik steril tuzlu su) ilave edildi. Beş dakika elde kuvvetlice çalkalandı. Oda ısısında 10 dakika bekletilerek kaba parçacıkların çökmesi sağlandı. Sıvının üst kısmından steril cam pipetlerle 10 ml sıvı steril tüplere alındı. Bu şekilde 10 dakika süreyle bekletilen sıvılarda kaba parçacıkların yeterince çökeldiğinin gözlenmesi üzerine Tümbay'ın önerdiği gazlı bezden süzme işlemi uygulanmadı. Bu sıvıdan 0.2 ml alınarak besiyeri üzerine yayıldı. Ekim yapılan besiyerleri 26° C'de üremeye bırakıldı. İlk iki hafta hergün, son iki hafta iki günde bir Petri kutuları kahverengi maya kolonileri şeklindeki üreme yönünden kontrol edildi. Şüpheli kolonilerden, balıklı SDA besiyerlerinde saf kültürler elde edilerek ileri incelemeler gerçekleştirildi.

Balıklı Sabourraud Dekstroz Agar (SDA) (83,90)

Unat'ın balıklı buyyonu (1/10)	1000 cc
Agar (Biolife)	15 g
Glukoz (Merck)	20 g
Gentamisin (Deva)	80 mg

Maddeler karıştırıldıktan sonra, ısıtılarak eritildi ve 5 ml olarak steril tüplere bölündü. 100° C'de 20 dakika süre ile sterilendirildi. Besiyerlerinin eğik olarak katılması sağlandıktan sonra, besiyerleri +4° C'de saklandı.

Saf kültürlerden tanıma yönelik aşağıdaki incelemeler yapıldı:

- 37° C'de üreme
- Üreaz etkinliği

- Hif oluşumunun kontrolü
- Nitrojen assimilasyon deneyi
- Karbon assimilasyon deneyi
- Farelerde hastalandırıcılık araştırması

37° C'de üreme, kökenlerin eşzamanlı olarak iki SDA besiyerine ekilerek 37° C ve 26° C'lerde 10 gün süre ile bekletilmesi ile araştırıldı. Her iki besiyerinde üreme olması olumlu sonuç olarak değerlendirildi.

Üreaz etkinliğinin araştırılmasında değiştirilmiş Christensen besiyeri kullanıldı. Bu besiyerine ekilen, denenecek kökenler 10 gün süre ile 26° C'de bekletildi. Pembe renk değişimi olumlu sonuç olarak değerlendirildi.

Değiştirilmiş Christensen agar(45A,83)

Neopepton (Difco)	1 g
Na Cl (Merck)	5 g
Monopotasyum fosfat (Merck)	2 g
Agar (Biolife)	15 g
Glukoz (Merck) (suda % 10)	10 ml
Üre (Merck) (suda % 20)	100 ml
Distile su	890 ml

Glukoz ve üre çözeltileri dışındaki bileşenleri distile suda ısıtılarak eritildi. pH 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH ile 6.8-6.9'a ayarlandı ve karışım 120° C'de, 1 atm basınçta 20 dakika sterilendirildi. 50° C'ye soğutulan besiyerlerine 0.2 µm'lik enjektör filtre (Sartorius)ile sterilendirilen glukoz ve üre çözeltileri ilave edildikten sonra 5'er ml halinde steril tüplere dağıtıldı. Eğri olarak katılaşması sağlandıktan sonra +4° C'de saklandı.

Hif oluşumu kontrolü için, pirinç-infüzyon agar besiyerinin yüzeyine hafifçe çizilerek ekimler yapıldıktan sonra üzerine steril lameller kapatılarak 26° C'de 7 gün bekletildi. Bu sürenin sonunda hif oluşumu, mikroskopik inceleme ile araştırıldı. Aynı besiyerine pozitif kontrol olarak Cryptococcus neoformans kontrol kökeni, negatif kontrol olarak da Candida albicans kökeni ekildi.

Pirinç-infüzyon agar(54,83)

Pirinç.....	10 g
Tween-80	10 ml
Agar (Biolife)	10 g
Distile su	1000 ml

On gram pirinç 30 saniye süre ile 1000 ml kaynar su içinde çalkalandıktan sonra gazlı bezden süzüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı. İçine agar ve tween-80 katılıp, ısıtılarak eritildikten sonra 120° C'de, 1 atm basınçta 15 dakika sterilendirildi. Bir gece 60° C su banyosunda bekletilip, çöküntü üstündeki berrak sıvı alınıp süzüldü ve 120° C'de, 1 atm basınçta 15 dakika süre ile sterilendirildi. Petri kutularına döküldü ve +4° C'de saklandı.

Nitrojen asimilasyon deneyi için, SDA'da 48 saat süre 26° C'de üretilen saf kültürler kullanıldı. Bu mayaların steril tuzlu suda McFarland'ın 3.tübü yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardan 1 ml alınarak 10 ml olarak bölünmüş, eritilmiş ve 50° C'ye kadar soğutularak içine 5 mg/l tiamin konmuş nitrojen-assimilasyon besiyerine ilave edildikten sonra Petri kutularına dökülerek çalkalama kültürleri yapıldı. Besiyeri katılaştıktan sonra bir kenarına spatüla ucu ile potasyum nitrat ve diğer kenarına kreatinin konulup, üzerleri steril süzgeç kağıdından disklerle kapatıldı. 26° C'de 10 gün süre ile bekletilen besiyerlerinde disk çevresindeki üreme olumlu sonuç olarak değerlendirildi.

Nitrojen-assimilasyon besiyeri (45A)

Yeast carbon base (Difco)	12 g
Agar Noble (Difco)	20 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile su içinde ısıtılarak eritildikten sonra, 10 ml halinde tüplere bölündü ve 120° C'de, 1 atm basınçta, 20 dakika süre ile sterilendirildi, +4° C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda eritildi.

Karbon asimilasyon deneyleri için, SDA'da 48 saat süre 26° C'de üretilen saf kültürler kullanıldı. Bu mayaların steril tuzlu suda McFarland 3.tüp yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardan 3 ml alınarak 30 ml olarak bölünmüş, eritilmiş ve 50° C'ye kadar soğutularak içine 5 mg/l tiamin konmuş karbon-assimilasyon besiyerine ilave edildikten sonra 220* çapındaki Petri kutularına dökülerek çalkalama kültürleri yapıldı. Besiyeri katılaştıktan sonra Petri kutusunun kenarından 2 cm içerlek, eşit aralıklarda denenecek karbon kaynakları spatüla ucu ile konulup, üzerleri steril süzgeç kağıdından disklerle kapatıldı. 26° C'de 10 gün süre ile bekletilen besiyerlerinde disk çevresindeki üreme, o diskin altında bulunan şeker için olumlu sonuç olarak değerlendirildi. Glukoz, maltoz, laktoz, sükroz ve galaktoz denendi.

Karbon-assimilasyon besiyeri (45A)

Yeast nitrogen base (Difco)	0.67 g
Agar Noble (Difco)	20 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile su içinde ısıtılarak eritildikten sonra, 10 ml halinde tüplere bölündü ve 120° C'de, 1 atm basınçta, 20 dakika süre ile sterilendirildi, +4° C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda eritildi.

Farelerde hastalandırıcılık, *Cryptococcus neoformans* şüpheli kökenlerde denendi. SDA'da 48 saat süre 26° C'de üretilen saf kültürler kullanıldı. Bu mayaların steril tuzlu suda McFarland'ın 2.tüpü yoğunluğunda (100 milyon /ml) süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyondan 0.5 ml, 25-30 g ağırlığında, anabilim dalımız laboratuvarlarında yetiştirilmiş, erkek albino farelere periton içi yolla verildi. Fareler, 4 hafta süre ile gözlem altında tutuldu. Bu arada ölen farelerin hemen otopsi yapıldı. Dört hafta sonunda sağ kalan fareler eter ile öldürülerek, otopsi yapıldı. Otopsi yapılan farelerin beyin, dalak, karaciğer örnekleri, küçük parçalara bölündükten sonra SDA ve Staib-Seeliger besiyerlerine ekildi. On beş gün süre ile 26° C'de bekletilerek üreme araştırıldı. Ayrıca beyin preparatları % 10 KOH çözeltisi ile muamele edilerek çini mürekkebi ile boyandıktan sonra, *Cryptococcus neoformans*'a benzer yapıların varlığı açısından incelendi.

Cryptococcus neoformans'ın tanımlanmasında Çizelge 2'deki özellikler temel alındı.

Çizelge 2. *Cryptococcus neoformans*'ın özellikleri (Çeşitli kaynaklardan [20,45A,61] derlenmiştir).

Tür	Farede hastalandırıcılık	37°C'de üreme#	Boya* yapımı	Üreaz	KNO ₃	Kreatinin	Assimilasyon özellikleri				
							G	S	L	M	GL
<i>C. neoformans</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>C. laurentii</i>	-	+/-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. terreus</i>	-	+/-	-	+	+	-	+	-	nadir	+	+v
<i>C. gastricus</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>C. uniguttulatus</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-v
<i>C. luteolus</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>C. albidus</i> var. <i>albidus</i>	-	nadir	-	+	+	-	+	+	+/-	+	-v
<i>C. albidus</i> var. <i>diffluens</i>	-	-/+	-	+	+	-	+	+	-	+	-v

* Bird-seed agarda # Bazı kaynaklarda(61) değişken olarak bildirilmektedir G=Glukoz S=Sükroz L=Laktöz M=Maltoz GL=Galaktoz

BULGULAR

Nisan 1993-Aralık 1995 tarihleri arasında, İstanbul'da çeşitli semtlerden toplanan güvercin dışkısı ve bu dışkılarla kirlenmiş toprak, yuva örneklerinden *Cryptococcus neoformans* araştırılması sonucunda toplam 100 örnekten bir *Cryptococcus neoformans* kökeni ayrılmıştır. Örneklerin dağılımı Çizelge 3'te özetlenmiştir.

Çizelge 3. İncelenen örneklerin, alım yeri gruplarına göre dağılımı ve üreme sonuçları.

Örnek grubu	Örnek sayısı	Ayrılan Sayı	C. neoformans (%)
Alanlar, camii avluları, saçaklar kaldırımlar...	49	0	0
Kafes	42	1	2.3
Toprak	7	0	0
Yuva	2	0	0
Toplam	100	1	1

Saptanan tek *Cryptococcus neoformans* kökeni Mayıs 1993'te Esenler semtinde bir güvercin besleyicisinin evindeki kafesten alınan örnekten üremiştir. Örneğin ekildiği besiyerinde ilk hafta sonunda birkaç kahverengi koloni gözlenmiş, bu kolonilerden elde edilen saf kültürlerin incelenmesi sonucunda, bu kökenin *Cryptococcus neoformans* olduğu saptanmıştır. Bu kökenin incelenen özellikleri Çizelge 4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4. Elde edilen köken ve kontrol *Cryptococcus neoformans* kökeninin araştırılan özellikleri.

	Üreyen köken	Kontrol kökeni
Staib-Seeliger besiyerinde üreme özelliği		
Renk.....	Açık kahverengi	Kahverengi
Koloni yapısı	Mukoid	Mukoid
Kapsül	(+); dar	(+);belirgin
37° C'de üreme	(+/-)*	(+)
Üreaz	(+)	(+)
Hif oluşturma	(-)	(-)
Assimilasyon deneyleri		
KNO ₃	(-)	(-)
Kreatinin	(+)	(+)
Glukoz	(+)	(+)
Maltoz	(+)	(+)
Laktoz	(-)	(-)
Sükroz	(+)	(+)
Galaktoz	(+)	(+)
Farede hastalandırıcılık	(+)	(+)

* 37° C'de üreme özelliği zamanla değişikliğe uğrayarak üremesi için gerekli süre uzamıştır.

Sonuç olarak İstanbul'da güvercin dışkılarında *Cryptococcus neoformans* varlığı gösterilmiş; oranı toplam örnekler içinde % 1, kafes örnek grubu içinde % 2.3 olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Cryptococcus neoformans dünyanın her tarafında rastlanan, gün geçtikçe daha sık hastalık etkeni olarak karşımıza çıkan fırsatçı bir mantardır. Yapılan birçok araştırmaya rağmen bulaşma, hastalandırıcılık ve korunma yönünden bilgilerimiz kısıtlıdır. Kriptokokkoz sıklığı giderek artmakta ve özellikle AIDS'lilerde ciddi bir sorun oluşturmaktadır (16,17,22).

Kriptokokkoz ülkemizde de bulunmaktadır. İlk kez 1953 yılında Soysal, Unat ve Tahsinoğlu yaygın deri lezyonlarıyla giden bir sistemik kriptokokkoz olgusunu yayınlamışlardır (68). Daha sonra pekçok olgu bildirilmiştir (5,14, 43,46,82).

İlk kez 1951 yılında Emmons (29) mantarın toprakta varlığını göstermiştir. Emmons 716 toprak örneğinde sadece 4 (% 0.5) *Cryptococcus neoformans* saptayabilmiştir. Daha sonra Ajello (2) 1950-1955 yılları arasında ABD, Panama, Hawai, Nijerya ve Kanada'da toplam 1127 toprak örneğini incelemiş; sadece 14 (%1.3) *Cryptococcus neoformans* kökeni ayırabilmiştir. Ayrılan kökenlerin sadece ABD ve Hawai'den alınan örneklerde saptanabilmesi ilginçtir. 1966 yılında Sotgiu ve arkadaşları (67) İtalya'da 166 toprak örneğinde 4 (%2) adet *Cryptococcus neoformans* kökeni ayırmışlardır. Daha sonra Emmons bu kez güvercin dışkılarında bu mantarı aramış. 1960 yılında Washington'da yaptığı çalışmada, 91 güvercin dışkısı örneğinin 63'ünden (% 67) bu mantarı ayırabilmiştir (31). Daha sonra dünyanın pekçok yerinden bu konuda çalışmalar bildirilmiş ve çok farklı sonuçlar alınmıştır (%0.7-80: Almanya %39, İngiltere % 6-8, Çekoslovakya %3, Yunanistan % 25, Japonya % 50-80, Meksika %20 (8,13,77,88).

Ülkemizde de *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarından ayırımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Türkiye'de doğal kaynaklarından *Cryptococcus neoformans* ayırımı ile ilgili çalışmalar.

	Güvercin dışkısı %	Toprak %	Diğer %	Kaynak
Unat ve Yücel (İstanbul)	0 (0/18)	0 (0/45)	0 (0/27)	81
Tümbay (İzmir)	10.3 (32/312)	0 (0/132)	3.8 (6/172)	76
Karaman ve ark. (Bursa)	3.2 (2/62)	-	0 (0/22)	40
Sivrel ve ark. (İzmir)	14 (13/91)	-	-	66

Unat ve Yücel 1965 yılında yaptıkları çalışmada (81), İstanbul'un çeşitli semtlerinde çeşitli kanatlı dışkıları ile kirli toprak örneklerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum* aramışlar; her iki mantarı da saptayamamışlardır. Bu çalışma doğal kaynaklarından *Cryptococcus neoformans*'ın ayrılması konusunda ülkemizde yapılan ilk çalışmadır.

1977 yılında Tümbay (76) İzmir ve ilçelerinden topladığı çeşitli örneklerde mantarı aramış; güvercin dışkılarında araştırmış; % 10.2 oranında; diğer kanatlı dışkılarında (kanarya, bülbül, tavuk, muhabbet kuşu ve karışık kuş dışkıları) % 3.8 oranında göstermiştir. Toprak ve saman örneklerinde ise mantarı gösterememiştir.

1980 yılında Bursa'da Karaman ve arkadaşları (40), güvercin dışkılarında *Cryptococcus neoformans* oranını % 3.2 olarak belirlemişlerdir. Diğer kanatlı dışkılarında ise mantarı gösterememişlerdir.

1993 yılında, Sivrel ve Tümbay (66), İzmir'de sadece güvercin kafeslerinden alınan örnekleri incelemişler ve bu örneklerde % 14 oranında *Cryptococcus neoformans* varlığı saptamışlardır. Ayrıca bu kökenlerin in vitro olarak amfoterisin B duyarlılığını araştırmışlar ve hepsinin duyarlı olduğunu saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda toplam örneklerde saptanan oran % 1'dir. Kırk iki kafes örneği gözönüne alınırsa (1/42) oran % 2.3 olarak saptanmaktadır. Diğer çalışmalar da incelendiğinde, *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin tümünün kafes örneklerinden saptanmış olması ilginçtir. Bizim ayırdığımız kökenin de kafesten saptanmış olması bu bilgilerle uyumludur. Buna karşın yurt dışında yapılan çalışmalarda kafes dışındaki örneklerde yoğun olarak *Cryptococcus neoformans* saptanmaktadır (2,31,88).

Saptadığımız % 1'lik oran, ülkemizde daha önce saptanan oranlardan daha düşüktür (40,66,76). Fakat 1965 yılında İstanbul'da yapılan çalışmada bu mantarın bulunmadığı da gözönünde tutulmalıdır (81). Dünyanın çeşitli yerlerinden bildirilen oranlar da çok değişkendir. İsveç'te 450 güvercin dışkısından sadece 3 adet (% 0.7) *Cryptococcus neoformans* üretilebilmişken (8), Japonya'dan 8 örnekten 4'ünde (%50) *Cryptococcus neoformans* üretilebilmiştir (88).

Bu farklılığın sebebi, iklim ve çevre faktörleri olabilir. Toprağın mikrop içeriği de önemli bir belirleyicidir (61,80). Tümbay çalışmasında toprak örneklerinde *Cryptococcus neoformans* belirleyememiştir (76). Biz de az sayıdaki toprak örneğinde (7 örnek) bu mantarı belirleyemedik. Ayrıca pekçok çalışmada toprakta saptanan oranlar oldukça düşük bulunmaktadır (2,31,67).

Çalışmamızda toplam 42 adet kafesten örnek alınmıştır. Kafeslerden alınan örnekler incelendiğinde % 2.3 *Cryptococcus neoformans* varlığı saptanmıştır. Bulduğumuz oranın düşüklüğünü biraz da kafes örneklerinin azlığına bağlayabiliriz.

Ayrıca 42 kafes örneğinden 21 tanesi % 50) kuş pazarlarındaki kafeslerden alınmış ve genelde az miktarda örnek alınıp çalışılmak zorunda kalmıştır. Bulunan oranın düşüklüğünden bu da sorumlu olabilir.

Tüm bu bilgilerin ışığı altında saptanan oran (% 1) kafes örneklerinin sayısı artırıldığında daha yüksek olabilecek fakat özellikle İzmir'de saptanan oranlar kadar olamayacaktır diye yorumlanabilir. Biz böyle bir çalışmayı sürdürmeyi planlıyoruz.

Cryptococcus neoformans'ın topraktan ayrılma şansı genelde çok daha düşüktür. Ülkemizdeki çalışmalarda toprakta *Cryptococcus neoformans* üretilmemiştir (76,81). Bu konuda diğer mikroorganizmaların baskılayıcı etkisi önemlidir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* gibi bakteriler üremeyi önleyici maddeler salgılayabilmektedirler. Teoh-Chan ve ark. (75) deney koşullarında *P. aeruginosa*'nın bu etkisini araştırmışlar ve üremeyi baskılayıcı bir maddeyi gösterebilmişlerdir. Ayrıca toprak amipleri (özellikle akantomoebalar) de önemli bir baskılayıcı etmendir. Bir *A. palestenensis*'in günde 84 kriptokok yiyebildiğinin saptandığı bildirilmiştir (43,83). Güneş ışığı da *Cryptococcus neoformans*'ın çoğalmasını baskılar (83).

Bu bilgilerin ışığında Emmons'un (30) toprakta baskı altında bulunan *Cryptococcus neoformans*'ların kendileri için uygun bir ortam oluşturan, kreatininden zengin kanatlı dışkılarında bol miktarda üreyebileceği ve uzun süre canlı kalabileceği görüşü kabul edilmektedir.

Kanatlı dışkıları *Cryptococcus neoformans* üremesi için uygun bir ortamdır. Bunu ilk kez Staib(70) ortaya koymuştur. Taze dışkı örnekleri alkali olmaları ve diğer mikroorganizmalar için de uygun ortam oluşturmaları sebebiyle daha az kriptokok barındırırlar. Kurumuş dışkılarda uzun bir süre yoğun olarak kriptokok bulunabilir. Bir kaldırımdan 3 yıl boyunca *Cryptococcus neoformans*'ın ayrılabilirdiği ve kuru bir güvercin dışkısının 1 gramında 50 milyon canlı *Cryptococcus neoformans* bulunabileceği yazılmıştır (76,83).

Diğer kanatlı dışkılarında da *Cryptococcus neoformans* saptanabilir. Tropikal gugukgiller, papağan, kanarya, bülbül, sarı asma kuşu, sığırcık, yarasa gibi pekçok kuş cinsinin dışkı örneklerinde *Cryptococcus neoformans* ayrılabilir (54,76,83). Tümbay 'da (76) çeşitli kuş dışkısı örneklerinde % 3.8 oranında saptamıştır. Biz çalışmamıza diğer kanatlı dışkı örneklerini dahil etmedik.

Tavuk dışkısıyla yapılan araştırmalarda olumsuz sonuçlar alınmaktadır. Bunun sebebi olarak tavuk dışkısında bulunan, üremeyi önleyici bir maddenin sorumlu olduğu bildirilmiştir. Fakat Ajello'nun (2) toprak örneklerinde *Cryptococcus neoformans*'ın kümes yakınlarında saptaması, Sotgiu ve ark.(67)'nin toprakta buldukları kökenlerin ikisinin kümes tabanlarından olması, Tümbay'ın (76) bir tavuk kümesinden saptadığı köken de konunun daha araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Cryptococcus neoformans doğada ayrıca, bazı sebzelerde, meyve ve meyve sularında, süt ve süt ürünlerinde, sineklerde de bulunur, fakat bunlarda oran düşüktür (45,48,76,83). Birçok tohumda da *Cryptococcus neoformans* saptanmıştır. Bu bulgu üzerine kanatlı dışkılarında mantarın yoğun olarak bulunmasının nedeni olarak tohumlarda bulunan *Cryptococcus neoformans*'ın yenilmesi bir faktör olarak ileri sürülmüş, fakat kanıtlanamamıştır (76,83).

Cryptococcus neoformans var. *gattii*'nin doğal kaynağı olarak sadece *Eucalyptus camaldulensis* ve *Eucalyptus terraticornis* saptanmıştır. Ellis ve Pfeiffer (27,28) çalışmalarında Avustralya'da ve daha sonra ABD'nin bazı eyaletlerinde bu ağaçlarda bu mantarın yoğun olarak bulunduğunu göstermişlerdir. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*'nin bu ağaçların normal florası mı yoksa patojeni mi olduğu belli değildir. Ülkemizde var. *gattii*'nin varlığı konusunda araştırabildiğimiz kadarı ile kaynağa rastlanamamıştır.

Bilindiği gibi *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarından üretilmesi için fare deneyleri ve kültür yöntemleri önerilmiştir. Biz çalışmamızda kültür yöntemini seçtik. Fare deneylerinin oldukça uzun süren, zor, zahmetli oluşu yanında bunlardan daha da önemlisi iyi bir hayvan laboratuvarı için gerekli koşullarının sağlanmasına ve iyi bakıcılara gereksinim göstermesi sebebiyle bu yönteme çalışmamızda başvurulmamıştır. Kültür yöntemi daha kolay, duyarlı, denenmiş ve alınan sonuçların genelde aynı yöntemin kullanıldığı diğer çalışma sonuçları ile kıyaslanmasına olanak veren bir yöntem olduğu için tercih edilmiştir.

Ülkemizde yapılan ilk çalışmada Unat ve Yücel (81) fare deneylerini ve SDA'ya doğrudan ekim yöntemini kullanmışlardır. Daha sonraki çalışmalarda Tümbay'ın eklediği değişikliklerle Staib-Seeliger (76) besiyeri kullanılmıştır. Biz de Tümbay'ın değişiklik önerilerine uygun olarak Staib-Seeliger besiyerini hazırlayıp kullandık. Fakat kontrol kökenimizle yaptığımız ön denemelerde, daha önce değindiğimiz bazı gözlemlerimize dayanarak, besiyerini birkaç küçük değişiklik yaparak hazırladık ve çalışmamızda bu besiyerini kullandık.

Cryptococcus neoformans besiyeri içeriğindeki kreatinini kullanarak, çoğalabilir. Fenol oksidaz enzimi ile besiyerinde bulunan kaffeik asit (dihidroksi sinnamik asit) ve ortofenollerini melanine çevirmek sureti ile kahverengi koloniler oluşturur. *G. abyssinica* tohumlarında bu maddeler değişken miktarlarda bulunur. Fakat boya yapımı gerçekleşmesine olanak sağlamakta ve besiyerinin duyarlılığında değişikliğe yol açmamaktadır (45,61,76). Bu besiyerinde boya oluşturma *Cryptococcus neoformans*'a özgül bir özelliktir (21). Sadece birkaç *C. laurentii* kökeninin boya yapabildiği bildirilmiştir (21,45). Kahverengi boya değişik tonlarda olabilmektedir. Nadiren bazı fenol oksidaz enzimi olmayan kökenler beyaz koloniler oluşturabilirler. Besiyerindeki glukoz içeriği ve nitrojen kaynağı da fenol oksidaz etkinliğinin gösterilmesinde önemlidir (15,45,61). Tümbay (76), ayırdığı 38 kökenin 10'unun açık kahverengi, 16'sının kahverengi, 12'sinin koyu kahverengi olduğunu bildirmiştir.

Besiyerinde kahverengi maya kolonilerini saptamak kolay olmamaktadır. Besiyerinde difenil sebebi ile renk geliştirmeyen, yandaş küf kolonilerinden salgılanan boya ile renk değiştiren maya kolonileri, bazı dirençli bakteri kolonileri besiyerinde Cryptococcus neoformans üremesinin yorumlanmasını zorlaştırır. Kimi zaman küfler difenil varlığına rağmen hızla tüm besiyeri yüzeyini kaplayarak değerlendirmeyi olanaksız kılmaktadır. Temel ilke olarak küf kolonilerinin en uzağındaki kahverengi maya kolonileri özellikle değerlendirilmektedir. Bu sorunlarla çalışmamız sırasında da karşılaşmıştır.

Ekilen örneğin özelliği de önemli bulunmuştur. Toprak, kurumuş dışkı örnekleri, bekletilen örneklerle yapılan tekrar ekimlerinde yoğun küf üremesi olmakta ve sonuç alınmasını olumsuz olarak etkilemektedir. Kafeslerden alınan örneklerde ise maya kolonileri ön planda izlenmektedir. Kafeslerden alınan örneklerden ayırında daha başarılı olunmasının bir sebebi de budur.

Cryptococcus neoformans'ı tanımlamak için kapsül yapısının gösterilmesi de önemlidir. İlk ayırım sırasında konak dışı örneklerden elde edilen kriptomokların kapsül yapısı belirgin olmayabilir. Fareye aşılandığında kapsül yapısı belirgin hale geçer ve hastalandırıcılık özelliği devam eder (45,76,83). Hipertonik ortamda kapsül yapımı baskılanırken, karbon dioksitli ortamda, zenginleştirilmiş besiyerinde üretim ve glukoz miktarındaki artış kapsül yapımını uyarmaktadır (61).

Kapsül çapı ile hastalandırıcılık arasında belirgin bir ilişki kurulamamıştır. Bir beyin absesi örneğinden üretilen dev kriptomokların (40-50 µm) fareler için daha hastalandırıcı olduğu gösterilememiştir (50).

Bunun dışında Cryptococcus neoformans yalancı hif, klamidospore ve çimlenme borusu yapmaz. Tomurcuklanmalar görülebilir. Çini mürekebi preparatlarında aynı kapsülün çevrelediği tomurcuklanmış maya hücrelerinin görülmesi tanıtıcıdır (45,79).

Cryptococcus neoformans 37° C'de üreyebilir. Bu özellik onun tanımı kadar hastalandırıcılığı açısından da önem taşır. Diğer yandan bu özelliğin değişebilir olduğu, mutantlar gelişebileceği bildirilmiştir. Bizim kökenimiz de 37° C'de üreyebilme özelliğini pasajlar sırasında kaybetmiş, ancak zenginleştirilmiş besiyerlerinde geç olarak 10-15 günde üreyebilmiştir. Tümbay hem bu özelliği hem de besiyerlerinin dört hafta etüvde bekletilmesinin olumsuz etkilerini gözönüne alarak 26° C'de üremeye bırakılmasını önermektedir. Biz de çalışmamızda bu öneriye uyduk.

Cryptococcus neoformans özellikle fareleri hastalandırmaktadır. Farelerde infeksiyon seyrini Hasenclever ve Mitchell incelemiştir (37,38). Ven yoluyla fareye verilen mantar 10 dakika içinde tüm dokulara dağılır. İlk aşamada akciğerlerde yoğunlaşır. 3.- 6. günlerden sonra belirgin olarak beyin dokusunda

yoğunlaşma izlenir ve bu yoğunlaşma artarak devam eder. Bu yoğunlaşma genelde bir zamanla kısıtlı değildir (49). Fare patojenliği klinik kökenlerde doğal ortamdan elde edilen örneklere nazaran daha fazladır (38).

Cryptococcus neoformans'ın özellikle güvercin dışkısı başta olmak üzere doğal kaynaklarının bulaşmadaki önemi belirgin değildir. Diğer ülkelerden bildirilenlerden de ancak kısıtlı sayıda kriptokokkoz olgusunda ev ve çevre havasında Cryptococcus neoformans'lar saptandığı yazılmaktadır (45). Fakat büyük çoğunlukla böyle bir temas belirlenmemektedir. Orofarinks ve deride rastlanabilen geçici kolonileşmenin bir önemi yok gibidir.

Güvercin besleyicilerinde belirgin olarak Cryptococcus neoformans'a karşı antikor tespit edilmiştir. Tümbay (77) İzmir'de İFA yöntemi kullanarak yaptığı çalışmada Cryptococcus neoformans kapsül antijenine karşı antikor yanıtını araştırmış; güvercin besleyicilerinde % 16, kuşla ilgisi olmayanlarda % 5 oranında antikor pozitifliği saptamıştır.

Tüm bu bilgilere rağmen güvercin dışkısının kriptokokkozun yayılmasındaki rolü belli değildir.

Hastalığın bir diğer kaynağı Cryptococcus neoformans'ın eşeyli şekli olan Filobasidiella neoformans'tır. Bu mantarın bitkilerde ve toprakta bulunabileceği gösterilmiştir. Basidiyosporlar daha küçük boyutlardadır ve insana daha kolay ulaşım alveollere yerleşebilirler. Ayrıca basidiyosporların deneysel infeksiyon oluşturabilecekleri de gösterilmiştir (45).

Güvercinler "şehirli kuş"lardır. Özellikle insanların yoğun bulunduğu park, alan, anıt, ev saçakları, camii, avlu gibi yerlerde yoğun olarak yaşarlar ve insanlar tarafından beslenirler. ABD'de güvercin dışkılarının yoğun Cryptococcus neoformans içerebileceği saptandıktan sonra bunun bir halk sağlığı sorunu oluşturabileceği düşünülmüş ve güvercin dışkılarında Cryptococcus neoformans'ın temizlenmesi için çalışmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmalarda tekrarlanan formalin uygulamalarının mantarı tamamen temizlediği gösterilmiştir (4,86).

Çalışmamız sırasında yaptığımız ilginç ve önemli bir gözlem de düşündürücüdür. İstanbul'da en yoğun güvercin nüfusunun izlendiği yerlerden biri de hastanelerdir. Hastanelerin yapı özellikleri, insanların bu konuya yaklaşımları, hasta ve personelin kuşları beslemeleri bu yoğunlaşmanın sebepleri olarak görünmektedir. Hastanemiz bünyesinde bazı ulaşabildiğimiz yerlerden mantarı ayıramamış olmamız asla rahatlatıcı olmamalıdır. Birçok bölgeye ulaşmanın zorluğu, diğer hastanelerdeki durumun hiç bilinmiyor olması, bulguların değişebilir olması tedirginliğimizi açıklayabilir. Bu konuda daha ayrıntılı çalışmaları yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Mantar infeksiyonları konusunda mikrobiyoloji laboratuvarlarına büyük sorumluluk düşmektedir. Öncelikle ayrı bir mikoloji laboratuvarı oluşturmak ilk aşama olmalıdır. Mikoloji laboratuvarı gereğinde klinisyene yardımcı, gereğinde klinisyeni uyarıcı olmalıdır. Ayrıca mantarların yayılımı, bulaşma yolları ve patogenez konusunda gereken çalışmaları yürütebilecek düzeyde olmalıdır.

Bu çalışma ile İstanbul'da doğal kaynak olarak güvercin dışkılarında *Cryptococcus neoformans* varlığı gösterilmiş, hem bu konuda hem de benzer mantar infeksiyonları konusunda yeni ve kapsamlı çalışmalar gerektiği düşünülmüştür.



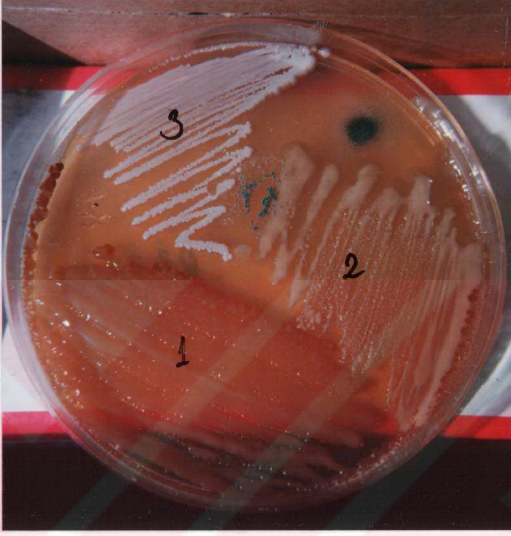
SONUÇ

İstanbul'da konak dışında *Cryptococcus neoformans* varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla İstanbul'un çeşitli semtlerinden Nisan 1993-Aralık 1995 tarihleri arasında toplam 100 adet güvercin dışkısı ve güvercin dışkısı ile kirlenmiş toprak örneği incelenmiştir. Tümbay'a göre değiştirilmiş Staib-Seeliger besiyeri bazı ufak ilaveler yapılarak kullanılmıştır. Çalışma sonunda sadece kafesten alınan bir güvercin dışkısı örneğinde *Cryptococcus neoformans*'ın varlığı saptanmış; konak dışında güvercin dışkılarında ve güvercin dışkısı ile kirlenmiş toprak örneklerinde % 1 oranında, kafeslerden alınan örnekler dikkate alındığında % 2.3 (1/42) oranında *Cryptococcus neoformans* varlığı belirlenmiştir.

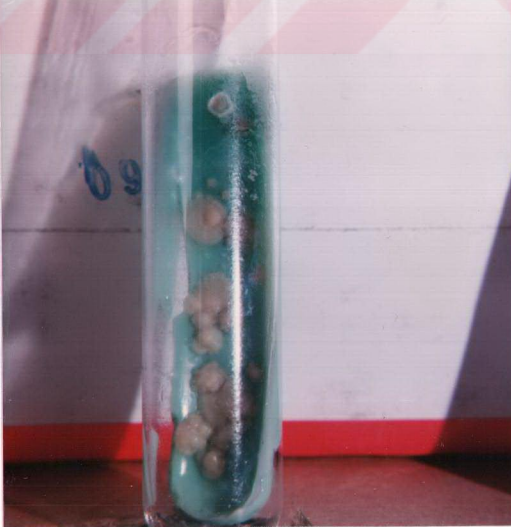
Diğer yandan bu çalışma hem bu konuda hem de benzer hastalıklar konusunda daha kapsamlı çalışmalar gerektiğini de göstermektedir.

FOTOĞRAFLAR

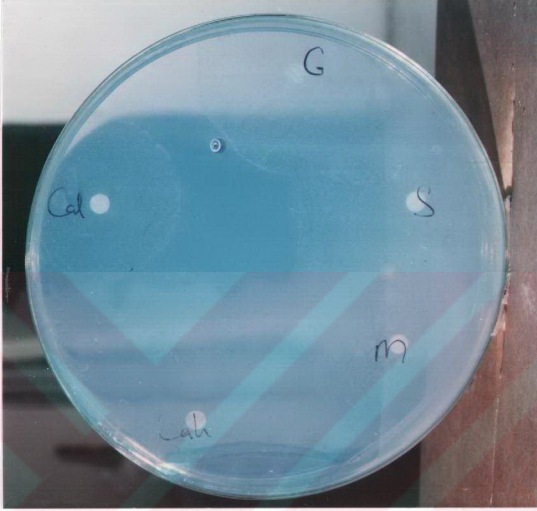
Fotoğraf 1. Değiştirilmiş Staib-Seeliger besiyerinde kahverengi renkli kontrol (1) ve örneklerden üreyen (2) *C. neoformans* ve *C. albicans* (3) kolonileri



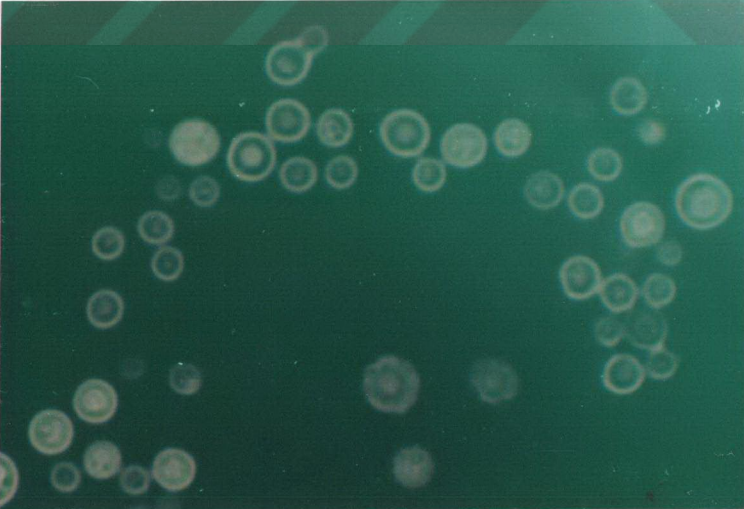
Fotoğraf 2. Löwenstein-Jensen besiyerinde *C. neoformans* üremesi (Bir ayda).



Fotoğraf 3. Karbon assimilasyonu deneyi (3. günde).



Fotoğraf 4. Çini mürekkebi preparatında *C. neoformans*'ın görünüşü..



ÖZET

Bu çalışmada İstanbul'da konak dışında *Cryptococcus neoformans* araştırılmıştır. Bu amaçla Nisan 1993-Aralık 1995 tarihleri arasında güvercin dışkısı ve güvercin dışkısı ile kirlenmiş toprak örnekleri incelenmiştir. Toplam örnek sayısı, 49'u avlular, alanlar, saçaklar gibi açık alanlardan, 42'si kafeslerden, 7'si topraktan ve 2'si yuvalardan olmak üzere 100 adettir. Çalışma sonunda sadece Esenler semtindeki bir kafesten alınan örnekte *Cryptococcus neoformans* ayrılmış; böylece toplam % 1'lik; 42 kafes örneği gözönüne alındığında ise % 2.3'lük bir sıklık saptanmıştır.

Çalışmada Tümbay'ın değiştirdiği, Staib-Seeliger besiyeri birkaç küçük değişiklik yapılarak kullanılmıştır. Ekilen örnekler 26° C'de 4 hafta üremeye bırakılarak izlenmişler ve üreyen kahverengi maya kolonileri ileri incelemelere alınmıştır. Şüpheli kökenlere; 37° C'de üreme, pirinç-infüzyon agarda hif oluşturma, üreaz etkinliği, karbonhidrat ve nitrojen assimilasyon deneyleri yapılmış, sonuçta *Cryptococcus neoformans* olduğu kökenlere farede hastalandırıcılık deneyleri yapılarak değerlendirilmeye gidilmiştir.

Sonuçlar diğer çalışmalarla karşılaştırılmış, sonuçlar ve gözlemler tartışılmış; bu konuda yeni ve kapsamlı çalışmalara gerektiği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

In the present study conducted between April 1993-December 1995, droppings *Columbia livia* and soil samples contaminated with it were screened for *Cryptococcus neoformans*. One hundred samples 49 of which were obtained from fringes, open areas, etc., 42 from cages, 7 from soils and 2 from nests were included to the study.

Cryptococcus neoformans was isolated only from one sample obtained from a cage from quarter Esenler. So 1 % of total samples and 2.3 % of cage samples were positive for *Cryptococcus neoformans*.

In this study Staib-Seeliger medium previously modified by Tümbay with slight additional modifications was used as primary isolation medium. Streaked plates were incubated at 26° C for four weeks and examined for growth of brown colored yeast colonies. Suspicious colonies were further examined for growth at 37° C, hyphae formation on rice-infusion agar, urease activity, carbohydrate (maltose, sucrose, lactose, glucose, galactose) and nitrogen assimilation. The strains that were compatible with *Cryptococcus neoformans* regarding the results above mentioned tests were examined also for mouse pathogenicity.

According the comparison of our results with the results of previous studies and our observations we concluded that further large-scale studies are needed for the determination precise densities of *Cryptococcus neoformans* in this kind of sources.

KAYNAKLAR

- 1- Ajello, L.: Recent advances in medical mycology. Bull of National Association of Clin Lab, 7: 11-16, 1955.
- 2- Ajello, L. : Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. Am J of Hygiene, 67:1; 72-77, 1958.
- 3- Ajello, L.: Comparative ecology of respiratory mycotic disease agents. Bact Rev, 31:6-24,1967.
- 4- Ajello, L., Weeks, R.J.: Soil decontamination and other control measures. In occupational mycoses, Ed. Di Salvo, A.F., Lea&Fabiger, Philedelphia, 1983.
- 5- Anđ, Ö., Tümbay, E., Güvener, Z.: Balgamdan izole edilen *C. neoformans* suşu. İst Tıp Fak Mec, 36:850-855, 1973.
- 6- Bardana, E. J., Kaufmann, L., Benner, E. J.: Amphotericin B and cryptococcal infection. Arch of Int Med, 122:517-20, 1968.
- 7- Bava, A. J., Negrani, R., Bianchi, M.: Cryptococcoses produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans* (Abstr.): J Med Vet Mycol, 31:1;87-89, 1993.
- 8- Bergman, F.: Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in Sweden. Acta Med Scan, 174:651-55,1963.
- 9- Bodey, G.P.: What's new in fungal infection in leukemic patients. Leukemia and Lymphoma, 11: 127-35,1993.
- 10- Bottone, E.J.: *Cryptococcus neoformans* pitfalls in diagnosis through evaluation of Gram-stained smears of purulent exudates. J Clin Microbiol, 12:790-1,1980.
- 11- Brueske, C.H.: Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol, 23: 631-33, 1986.
- 12- Buttler, W.T., Alling, D.W., Spichart, A., Utz, J.P.: Diagnostic and prognostic value of clinical and laboratory findings in cryptococcal meningitis. NJM, 270:59-67,1964.
- 13- Castanon-Olivares, L.R., Lopez-Martinez, R.: Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columbia livia*) droppings in Mexico city (Abstr.). Mycoses,37:325-7,1994.
- 14- Charniak, R, Reiss, E., Turner, S.H.: A galactoxylomannan antigen of *Cryptococcus neoformans* serotype A. Carbonhydrate Res, 103:239-50, 1982
- 15- Chaskes, S., Tyndall, R.L.: Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-diphenols. Effects of the nitrogen source. J Clin Microbiol, 1:509-514,1975
- 16- Chuck, S.L., Sande, M.A.: Infections with *Cryptococcus neoformans* in the AIDS. NJM, 321:794-99,1989.

- 17- Clumeck, N., Sonnet, J., Taelman, H., Mascort-Lemone, F.B., DeBruyere, M., Vandepierre, P., Dasnoy, J., Marcelis, L., Lamy, M., Jonas, C., Eyckmans, L., Noel, H., van Haverbeck, M., Butzler, J.P.: AIDS in African patients. *NJM*, 310:492-97,1984.
- 18- Cooper, B., H.: Clinical laboratory evaluation of a screening medium (CN Screen) for *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 11: 672-74,1980.
- 19- Da Cunha, T., Lusins, J.: *Cryptococcus albidus* meningitis. *South Med J* . 66:1230,1973.
- 20- Davis, C., E.: *Cryptococcus*. In *Infectious Disease and Medical Microbiology*, pp. 564-71,(Ed. Braude, A.,I., Fierer, J., Davis, C., E.) 2. baskı, W.B. Saunders Comp. Philadelphia,1986.
- 21- Denning, D.W., Stevens, D.A., Hamilton, J. R.: Comparison of *Guizzotia abyssinica* seed extract (Bird Seed) agar with conventional media for selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J Clin Microbiol*, 28:2565-67, 1990.
- 22- Denning, D.W.: Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. *J Antimicrobiol Chemother*, 28 (Suppl B): 1-16, 1991.
- 23- Diamond, R.D.: *Cryptococcus neoformans*. In *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Ed. Mandell, G., L., Dalin, R., Bennet, J., E.) 4. baskı, Cilt 2, Churchill-Livingstone Comp., New York, 1995.
- 24- Diamond, R.D.: Antibody dependent killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells. *Nature*, 247:148-9,1974.
- 25- Dramer, F., Gueha, E., Renin, O., Dupont, B.: Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol*, 31:359-63,1993.
- 26- Dramer, F., Varma, H., Ronin, O., Mathoulin, S., Dupont, B.: Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. *J Clin Microbio*, 32:2364-71,1994.
- 27- Ellis, D.H.: *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. *J Clin Microbiol*, 25:430-31,1986.
- 28- Ellis, D.H., Pfeiffer, T.J.: Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*, 28:1642-44,1990.
- 29- Emmons, C.W.: Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol*, 62:685-90,1951.
- 30- Emmons, C.W.: Environmental sources of infection in the mycoses. 6th International Congress on Tropical Medicine and Malaria, September 5-13,1958
- 31- Emmons, C.W.: Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Pub Health Reports*, 75: 4; 362-65,1960.
- 32- Emmons, C.W.: Report of a survey of mycoses in Africa. WHO, Organisation mondiale de la Santé: *Mycoses*, 1965.

- 33- Evenson, A.E., Lamb, J.W.: Slime flux of mosquito as a new saprophytic source of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, 88:542,1964.
- 34- Fink, J.N., Barbariak, J.J., Kaufman, L.: Cryptococcal antibodies in pigeon breeders disease. *J Allergy*, 41:297-301,1968.
- 35- Goodman, J.S., Kaufman, L., Koenig, M.G.: Diagnosis of cryptococcal meningitis. *NJM*, 285:434-6,1971.
- 36- Gordon, A.M., Lopa, E.W.: Elimination of rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. *Am J Clin Pathol*, 61:488-494,1974.
- 37- Hasenclever, H.F., Mitchell, W.O.: Virulence and growth rates of *Cryptococcus neoformans* in mice. *Ann NY Ac Sci*, 89:159-62,1960.
- 38- Hasenclever, H.F., Emmons, W.C.: The prevalence and mous virulence of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from urban areas. *Am J Hygiene*, 78:227-31,1963.
- 38A- Healey, E.M., Dillavou, C.L., Taylor, G.E.: Diagnostic medium containing inositol, urea and caffeic acid for selective growth of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 6:387-91, 1977.
- 39- Kamalam, A., Yesudian, P., Thambiah, A.S.: Cutaneous infection by *Cryptococcus laurantii*. *Br J Der*, 97: 221-3,1977.
- 40- Karaman, A., Tümbay, E., Demir, O.: Bursa'da güvercin ve çeşitli kuş dışkıları örneklerinde *Cryptococcus neoformans* aranması. *Türk Mik Cem Der*, 10:31-37,1980.
- 41- Kaufman, L., Blumer, S.: Latex cryptococcal antigen test. *Am J Clin Pathol*, 60:285-6,1973.
- 42- Kligman, A.M., Crane, A.P., Norris, R.F.: Effect of temperature on survival of chick embryos infected intravenously with *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). *Am J Med Sci*, 221:273-78,1951.
- 43- Koçak, N., Yenerman, M., Ergün, Y., Özdoğan, E.: Karaciğer vakası üzerine eklenmiş bir *Cryptococcus* enfeksiyonu. *Türk Tıp Cem Mec*, 33:651-54,1967.
- 44- Kwon-Chung, K.J., Polachek, I., Bennet, E.J.: *Cryptococcus neoformans* 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*, 15:535-37, 1982.
- 45- Kwon-Chung, K.J., Bennet, E.J.: *Cryptococcosis*. In *Medical Mycology*, pp. 397-446, 4. baskı, Lea&Fabiger, Philedelphia, 1992.
- 45A- Larone, D.H.: *Medically important fungi. A guide to identification*. 2. baskı, ASM publications, Washington, 1993.
- 46- Leblebicioğlu, H., Saniç, A., Günaydın, M., Emirler, N., Özdemir, Ş.: Bir *Cryptococcus neoformans* meninjitisi olgusu. *Mik Bül*, 29:203-7,1995.
- 47- Levitz, S.M.: The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev Infect Dis*, 13:1163-69, 1991.

- 48- Lopez-Martinez, R., Castanen-Olivares, L.R.: Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico city (Abstr.). *Mycopathol*, 129:25-8,1995.
- 49- Louria,D.B., Feder, N., Mitchell, W., Emmons, C.W.: Influence of fungus strain and lapse of time in experimental histoplasmosis and of volume of inoculum in cryptococcosis upon recovery of fungi. *J Lab and Clin Med*, 53:311-17,1959.
- 50- Love, G.L., Bayd, G.D., Grear, D.L.: Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abcess. *J Clin Microbiol*, 22:1068-70, 1985.
- 51- Muchmore, H.G., Rhoades, E.R., Nix, Felton, F.G., Carpenter, R.E.: Occurence of *Cryptococcus neoformans* in the environment of three geographically associated cases of cryptococcal meningitis. *NJM*, 268:112-14, 1963.
- 52- Musial, C.E., Cockerill, III. F.R, Roberts, G.D.: Fungal infections of the immunocompromised host: Clinical laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev*, 1:349-64,1988.
- 53- Nuruenden, T.A., Ahehorn, D.G.: Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 10:724-29, 1979.
- 54- Oruç, N.: Mantar hastalıklarının patomorfolojisi. İÜ. CTF Yayınları, Rektörlük No:2602, Dekanlık No:63, Nazım Terzioğlu Matematik Araştırma Enstitü Baskı Atölyesi, İstanbul, 1979.
- 55- Paliwal, D.K., Radthawa, U.S.: A rapid pigmentation test for identification of *Cryptococcus neoformans*. *Antonie von Leeuwenhoek*, 44:243-46,1948.
- 56- Palmer, A.C., Herrtage, M.E., Kaplan, W.: Cryptococcal infection of the central nervous system of a dog in the UK. *J Small Anim Prac*, 22:579-86,1981.
- 57- Pidcoe, V., Kaufman, L.: Flourescent antibody reagent for the identification of *Cryptococcus neoformans*. *Appl Microbiol*, 16: 271-5, 1968.
- 58- Randhawa, U.S., Paliwal, D.K.: Occurence and significance of *Cryptococcus neoformans* in the oropharynx and on the skin of a healthy human population. *J Clin Microbiol*, 6:325-27,1977.
- 59- Reid, J.D.: The influence of the vitamin B complex on the growth of *Torulopsis* (*Cryptococcus*) *neoformans* on a synthetic medium. *J Bacteriol*, 58:777-82,1949.
- 60- Richardson, M.D., Warnock, D.W.: Fungal infection: Diagnosis and management, 2. baskı, Blackwell Scientific Pub, London, Paris, Edinburgh, Boston, Melbourn, Berlin, Vienna,1994.
- 61- Rippon, J.W.: Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, pp 582-609, 3.baskı, W.B. Saunders Comp, Philadelphia, 1988.
- 62- Safrin, R.E., Lanchester, L.A., Davis, C.E., Braude, A.I.: Differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes by isoenzym electrophoresis. *Am J Clin Pathol*, 86:204-8,1986.
- 63- Seeliger, H.P.R., Tümbay, E.: Mykosen der Lunge unter besonderer Berücksichtigung der opportunistischen Infektionen. *Immun und Infek*, 2:138-45, 1974.

- 64- Shields, A.B., Ajello, L.: Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science, 151:208-9,1966.
- 65- Shuttleworth, D., Philpot, C.M., Knight, A.G.: Cutaneous cryptococcosis treatment with oral fluconazole. Br J Dermatol, 120:683-7,1989.
- 66- Sivrel, A., Tümbay, E.: İzmir'de güvercin dışkısından izole edilen *Cryptococcus neoformans* suşları ve bunların amfoterisin B'ye in vitro duyarlılıkları. İnfek Der, 7:107-13, 1993.
- 67- Sotgiu, G., Mazzoni, A., Manyovani, A., Ajello, L., Palmer, J.: Survey of soil spor human pathogenic fungi from thr Emilia-Ramagna region of Italy. Am J Epidemiol, 83:329-37,1966.
- 68- Soysal, Ş.S., Unat, E.K., Tahsinoğlu, M.: Bir *Cryptococcus* vakası. Türk Tıp Encümeni Arşivi, 4:115-,1953.
- 69- Staib, F.: Kreatinin Assimilation ein neues Spezifikum für *Cryptococcus neoformans*. Zbl f Bakt Orig, 186:274-,1962.
- 70- Staib, F.: Vogelkot, ein Nachsubstrat für die Gattung *Cryptococcus*. Zbl f Bakt Orig, 186:233-,1962.
- 71- Staib, F.: *Cryptococcus neoformans* beim Kanarienvogel. Zbl f Bakt Orig (Abstr), 185:129,1962.
- 72- Sugar, A.M., Saunders, C.: Oral flucanazole as supportiv therapy disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. AMJ, 85:481-9,1988.
- 73- Takos, M.J.: Experimetal cryptococcosis produced by ingestion of virulent organisms. NJM, 254:598-601,1956.
- 74- Taplin, D.: The use of gentamicin in mycology media. J Inv Dermatol, 45:549-50,1965.
- 75- Teoh-Chan, C.H., Chou, P.Y., Ng, M.H., Wong, P.C.: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* by *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol, 8: 77-81,1974.
- 76- Tümbay, E.: İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve kriptokokkoz. Birinci kısım: *Cryptococcus neoformans* 'ın doğal kaynaklarından izolasyonu. TÜBİTAK 6. Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tebliği (17 - 21 Ekim, 1977, Ankara) Tutanağı, sayfa 839-, 1977.
- 77- Tümbay, E.: İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve kriptokokkoz. İkinci kısım: Hasta materyelinde ve normal görünüşlü kişilerin serumlarında indirekt floresan antikor (IFA) yöntemi ile *Cryptococcus neoformans* 'a karşı antikor araştırılması. TÜBİTAK 6. Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tebliği (17-21 Ekim, 1977, Ankara) Tutanağı, sayfa 785-, 1977.
- 78- Tümbay, E. (Editör): *Cryptococcus neoformans* ve kriptokokkoz. Türk Mik Cem Yayınları, No 12, Bilgehan Basımevi, İzmir, 1988.
- 79- Tümbay, E., Seeliger, H.P.R.: Observation in the laboratory diagnosis of *Cryptococcus neoformans* infections. Castallania Trop Med-Dermatol, 2:4-8,1974.

- 80- Unat, E.K.: Temel Mikrobiyoloji. 2.baskı, İ.Ü. CTF Yayınları, Rektörlük No:3749, Fak.No:176, Doyuran Matbaası, İstanbul, 1993.
- 81- Unat, E.K., Yücel, A.: Konak dışında *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum* araştırmaları. İ.Ü. Tıp Fak Mec, 28:47-,1965.
- 82- Unat, E.K., Pars, B., Kosyak, J.: Bir kolon *cryptococcosisi* vakası. İ.Ü. Tıp Fak Mec, 28:47-,1965.
- 83- Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M.: Tıp parazitolojisi, insanın ökaryonlu parazitleri ve bunlarla oluşan hastalıkları. 5.baskı, İ.Ü. CTF vakfı Yayınlar,15, Doyuran Matbaası, İstanbul,1995.
- 84- Walsh, T.J., Schlegel,R., Moody, M.M., Castertan, J.W., Salcman, M.: Venticulo-atrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: An ultrastructural and quantitative microbiological study. *Neurosurg*, 18:373-5,1986.
- 85- Wang, S.H., Zeimis, R.T., Roberts, G.D.: Evaluation of a caffeic acid-ferric citrate test for rapid identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 6:445-8,1987.
- 86- Weeks, R.J., Dattolo,A.R., Ajello, L.: Elimination of a potential *Cryptococcus neoformans* health hazard in a historic building about to be renovated. *J Environ Health*, 45:70-3,1982.
- 87- Weinberg, P.B., Becker, S., Granger, D.L., Koren, H.S.: Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by human alveolar macrophages. *Am Rev Res Dis*, 136:1242-7,1987.
- 88- Yamamoto,Y., Kohno, S., Nodo, T., Kakeya, H., Yanagihara, K., Ohno, H., Ogawa, K., Kawamura, S., Ohtsubo, T., Tomono, K. (Abstr.): Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environments pigeon excreta in Nagazaki. *Kansenshogaku-Zasshi*, 69:642-5,1995.
- 89- Yücel, A.: *Cryptococcus neoformans*'ın mikolojisi. 21.6.1988'de 18. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde tebliğ edilmiştir .
- 90- Yücel, A., Zehavi, H.: Balıklı besiyerinde mantarların üreyişi. *CTF dergisi*, 7: 364-70, 1976.
- 91- Zimmermann, L.E., Rappaport, H.: Occurence of *cryptococcosis* in patients with malignant disease of reticuloendothelial system. *Am J Clin Pathol*, 24:1050-72, 1954.
- 92- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi : Klinikopatolojik olgu sunusu: Ateş, başağrısını takiben bilinci kapanan erkek hasta. 26:1; 55-62, 1995.

T.C. YÜCECELİ Tıp Fakültesi
DOKÜMANTASYON MERKEZİ