

Türkiye Geneline *Cryptococcus neoformans*'ın Tür Dağılımının Tahmini

Prediction of the Species Distribution of *Cryptococcus neoformans* Throughout Turkey

Çağrı ERGİN¹, Mustafa ŞENGÜL¹, Aylin DÖĞEN², Macit İLKİT³

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

¹ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

³ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

³ Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

Makale Atfı: Ergin Ç, Şengül M, Döğen A, İlkit M. Türkiye genelinde *Cryptococcus neoformans*'ın tür dağılımının tahmini. Mikrobiyol Bul 2019;53(2):233-238.

ÖZ

Cryptococcus neoformans, özellikle bağışıklığı baskılanmış konakta hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan patojenik maya mantarıdır. Ülkemizde 2004 yılından bu yana çoğunluğu okaliptüs (*Eucalyptus camaldulensis*) olmak üzere, nar (*Punica granatum*), doğu çınarı (*Platanus orientalis*), çam (Pinaceae), kestane (*Castanea sativa*) ve ılgından (*Tamarix hispida*) da kolonizasyon rapor edilmiştir. Patojenlerin çevresel izolasyon konumları ve kolonizasyonunu etkileyen biyoklimatik faktörlerin birbirleri ile ilişkilerinin araştırılması, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile çevresel kolonizasyonun tahmin edilebileceği detaylı risk haritaları oluşturulabilir. Bu çalışmada, yüksek çözünürlüklü biyoklimatik ve çeşitli araştırma süreçleri ile bulunan koordinatlar sayesinde, Türkiye'de *C. neoformans* varlığının geçerli modelini tahmin etmek ve ekolojik süreçler hakkında bilgi sağlamak amaçlanmıştır. Bir makine öğrenmesi yapılı program olan ve sadece pozitif verilerin coğrafi dağılımını kullanan maksimum entropi (MaxEnt) programı, *C. neoformans*'ın dağılımının tahmini için kullanılmıştır. İklim verileri ve çevresel biyoiklim değişkenleri WorldClim sitesinden 30 saniye uzaysal çözünürlükte alınmıştır. Türkiye'nin biyoiklim değişkenlerinin birikteliği ENMTools programı kullanılarak incelenmiş ve benzer katmanlar çalışma dışı bırakılmıştır. *C. neoformans* izolasyonları belirlenen 41 farklı koordinat noktası tahmin haritalarının oluşturulmasında kullanılmıştır. Modelin geçerliliğinin analizinde eğri altında kalan alan ve ihmal oranı değerleri test edilmiştir. Farklı çevresel biyoiklim değişkenlerinin model üzerindeki katkısını incelemek için Jackknife testleri uygulanmış ve son modelleme işlemi yapılmıştır. Haritaların oluşturulmasında QGIS haritalama programı kullanılmıştır. Bu çalışmada, Kuzeydoğu Akdeniz havzasında coğrafi olarak yer alan Anadolu'nun kıyı bölgesinin ve tüm Ege bölgesinin *C. neoformans*'ın kolonizasyonu için yüksek dereceli risk taşıdığı gösterilmiştir. Şimdiye kadar kolonizasyon rapor edilmeyen Atatürk Barajı'nın batı bölgesi, Amik ovası, Bakırçay ve Gediz vadilerinin de yüksek riskli bölgeler olabileceği tahmin edilmiştir. En sıcak aydaki en yüksek sıcaklık, en sıcak aydaki ortalama sıcaklık ve en soğuk üç aylık dönemdeki nem, model tahminini etkileyen önemli faktörler olarak bulunmuştur. Kolonizasyona etki eden çevresel faktörler arasında bulunan nemin, en çok kasım ayında etki gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak, Türkiye'nin ilk defa *C. neoformans* kolonizasyon risk haritası çıkarılmıştır. Daha

fazla bölgesel veri elde etmek, benzer risk bölgelerinin tanımlanmasını kolaylaştıracaktır. Bu yaklaşım, çevresel odak bulunan yerlerde daha sık görülebilecek kriptokokoz olgularının klinik ön tanısı için yararlıdır.

Anahtar kelimeler: *Cryptococcus neoformans*; ekoloji; maksimum entropi; tür dağılımı.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a human pathogenic yeast that causes life-threatening infections especially in immunosuppressed patients. The environmental isolation of *C. neoformans* from Turkey was reported as early as 2004, although this was mostly from *Eucalyptus camaldulensis* colonization. Successful isolations were also reported from pomegranate (*Punica granatum*), oriental plane (*Platanus orientalis*), pine tree (Pinaceae), chestnut (*Castanea sativa*) and salt cedar (*Tamarix hispida*). The investigation of the relationship between the bioclimatic factors affecting the environmental isolation sites and the colonization of pathogens is a frequently used method. With this method, detailed risk maps can be generated in which environmental colonization can be estimated. The aim of this study was to use the high-resolution bioclimatic and previously-isolated yeasts' coordinates to create a valid model for the occurrence of *C. neoformans* in Turkey and provide insight into ecological processes. A machine learning approach using presence-only data software, maximum entropy (MaxEnt), was used to for the prediction of *C. neoformans* distribution. Climatic data and environmental bioclimatic variables from WorldClim were downloaded as 30 seconds spatial resolutions. The correlation between different Turkey bioclimatic layers were analyzed with ENMTools and similar layers were discarded. Forty-one different coordinates representing *C. neoformans* isolation points were used to generate a predictive map. The area under the curve and the omission rate were used to validate the model. Meanwhile, Jackknife tests were applied to enumerate the contribution of different environmental variables, and then to predict the final model. Maps were created using QGIS mapping software. In this study, we have shown that the coastal region of Anatolia, which is geographically located in the Northeastern Mediterranean Basin, as well as the entire Aegean region, carry an extremely high risk for the colonization of *C. neoformans*. Other areas which have not previously been reported for the isolation of *C. neoformans* were predicted to be potential colonization hotspots, including the western part of Atatürk Dam, the Amik Plain and the Bakırçay and Gediz valleys. The maximum temperature of the warmest month, the mean temperature of the warmest quarter and the precipitation of the coldest quarter were the most important factors influencing the model's predictions. It was determined that the humidity in the environment affected the colonization especially in November. In conclusion, we produced a *C. neoformans* colonization risk map of Turkey for the first time. Obtaining more regional data will facilitate the identification of the regions having similar risk. This approach is useful for the clinical prediagnosis of cryptococcosis cases, which may be more common in places with environmental niches.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; ecology; maximum entropy; species distribution.

GİRİŞ

İnsan ve hayvan patojeni mantarların ekolojik odaklarının ve çevresel adaptasyonunun anlaşılması neden oldukları salgınların süreçlerini açıklamaya ve gerekli önlemleri almaya yöneliktir^{1,2}. Özellikle immün sistemi baskılanmış konakta hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan *Cryptococcus neoformans*'ın kolonize olduğu çevresel ortamlar, biyolojik ve iklimsel olarak birbirlerine benzerdir³⁻⁵. İklim parametrelerinin biyolojik etkilerinin incelenmesi amacıyla hazırlanan biyoiklim verileri, çevreden bulaşan enfeksiyöz etkenlerin kolonize olabileceği bölgelerin tahminine olanak sağlar³⁻⁶.

Ülkemizde son 20 yıldan bu yana yapılan flora taramalarında farklı bölgelerdeki okaliptüs (*Eucalyptus camaldulensis*)⁷⁻⁹, nar (*Punica granatum*)¹⁰, doğu çınarı (*Platanus orientalis*)¹⁰, ılgın (*Tamarix hispida*)¹¹, kestane (*Castanea sativa*)¹² ve çam (Aile: Pinaceae)¹³ ağaçlarından *C. neoformans* kolonizasyonu bildirilmiştir. *C. neoformans* ve *Cryptococcus*

gattii'ye özel, yaşamakta olduğumuz coğrafyayı da içeren kolonizasyon risk tahmini haritalama çalışmaları varsa da, yerel verilerin kullanılması daha doğru ve detaylı risk haritalarının oluşturulmasını sağlayacaktır^{3,4}. Bu çalışmada, ülkemizden elde edilen veriler ile Türkiye için çevresel kolonizasyon riski oluşturan odakların öngörülmesi amaçlanmıştır.

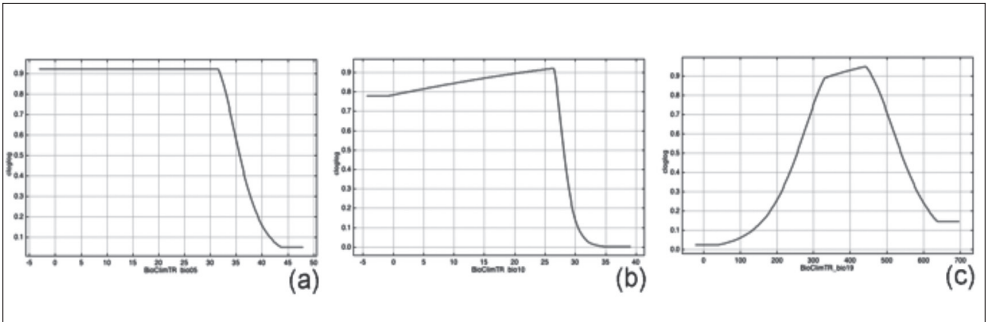
GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmaya, 1998-2018 yılları arasında doğadan izole edilerek tanımlanan *C. neoformans* izolatlarına ait 41 koordinat verisi alındı⁷⁻¹². Biyoiklim parametrelerine "WorldClim Küresel İklim Verileri" (<http://worldclim.org/version2>) kaynağından erişildi. Türkiye biyoiklim verileri 30 saniye (boylam/enlem derecesi) uzaysal çözünürlüğe (ekvatorda ~1 km²) sahip olacak şekilde ayarlandı. Veriler arasındaki korelasyon ENMTools (Ver 1.4.4; Açık kaynak) ile incelenerek, > 0.75 korelasyon gösteren veriler için tek parametre seçildi^{6,14}. Biyoiklim verileri arasında "en sıcak aydaki en yüksek sıcaklık", "en soğuk aydaki en düşük sıcaklık", "en kuru üç aydaki ortalama sıcaklık", en sıcak üç aydaki ortalama sıcaklık", "yıllık nem", "mevsimsel nem" (değişim katsayısı olarak) ve "en soğuk üç aydaki nem" parametreleri ekolojik modelleme için incelemeye alındı.

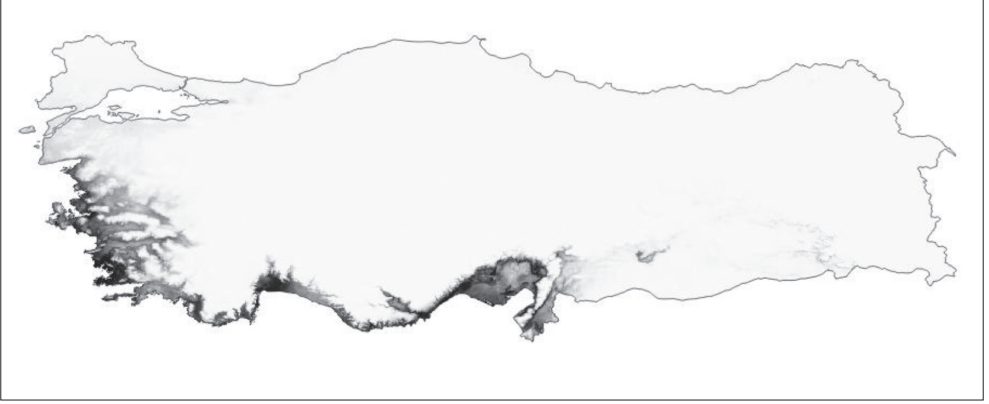
Tüm biyoiklim ve koordinat verileri bir makine öğrenmesi programı olan açık erişimli MaxEnt (Ver.3.4.1; http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/) programına aktarıldı¹⁵. Biyoiklim değişkenlerinin etkileri "jackknife" analizi ile incelendi^{2-6,15}. Varsayımsal test noktaları için rastlantısal oluşturulan %25'lik test modeli ve 10 tur replikasyon döngüsü kullanıldı^{6,15}. Elde edilen veriler ile ülkemizde *C. neoformans* çevresel kolonizasyonu riski için detaylı haritalama QGIS (ver 3.1.8 Las Palmas-3.2.0 Bonn; Açık kaynak) programı ile oluşturuldu.

BULGULAR

C. neoformans'ın çevresel kolonizasyonunu etkileyen önemli faktörlerin en sıcak aydaki en yüksek sıcaklık (Şekil 1a) ve en sıcak üç aydaki ortalama sıcaklık (Şekil 1b) olduğu saptanmıştır. Ancak bu etkinin, sıcaklığın yükselmesi ile birlikte azaldığı gözlenmiştir. Diğer önemli faktör ise yılın en soğuk üç aylık dönemindeki nem olarak saptanmıştır (Şekil 1c). Ortamda ki nemin özellikle kış ayında kolonizasyonu önemli ölçüde etkilediği saptanmıştır.



Şekil 1. *Cryptococcus neoformans*'ın ülkemizdeki çevresel ortamda kolonizasyona etkili olan biyoklimatik faktörlerin değişimi; (a) bio5, en sıcak aydaki en yüksek sıcaklık, (b) bio10, en sıcak üç aydaki ortalama sıcaklık, (c) bio19, en soğuk üç aylık dönemindeki nem.



Şekil 2. Ülkemiz için çevresel *Cryptococcus neoformans* odakları için tahmini risk haritası.

Oluşturulan risk haritasına göre (Şekil 2); Edremit Körfezi'nden itibaren güneyde kalan sahil şeridimizin tamamının *C. neoformans* kolonizasyonuna uygun olduğu tespit edilmiştir. Yapılan modellemede tüm Ege Bölgesi ovaları (Büyük Menderes, Küçük Menderes, Gediz ve Bakırçay havzaları dahil), Antalya ovası, Göksu vadisi, Çukurova, Amik ovası ile Atatürk Barajı'nın önemli kolonizasyon odakları olabileceği, Güney Marmara Bölgesi ile Dicle nehri çevresinde nadir de olsa noktasal kolonizasyon bölgeleri bulunabileceği saptanmıştır (Şekil 2). Oluşturulan bu modelin geçerlilik değerlendirmesi testinde AUC= 0.982 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Enfeksiyon hastalıklarının yayılımının çevresel faktörler ile yüksek derecede ilişkili olduğu durumlarda, makine öğrenmesi programları ile yapılan çevresel kolonizasyonun araştırılması muhtemel hastalık ve/veya salgın durumlarında önem kazanmaktadır. Bu araştırmalarda kullanılan algoritmalarda, virülans özellikleri gibi mikrobiyal etken farklılıklarının ve insan popülasyon karakteristikleri gibi konağın değişkenliğinin incelenemediği belirtilmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçların popülasyon dinamikleri ile birlikte yorumlanması gereklidir^{2,14,15}. Ülkemizdeki *C. neoformans* izolatlarının da tek bir klona ait olmayıp, yüksek heterojenite gösterdiği belirlenmiştir¹⁶.

Ülkemizde farklı bölgelerin floralarından rapor edilmiş izolasyonların çoğunluğu Ege ve Akdeniz coğrafyasındandır⁷⁻¹³. Bir bölge dışında, serotiplendirmesi yapılan tüm izolatlar *C. neoformans* var. *grubii* olarak rapor edilmiştir^{4,7,8,11-13}. Ülkemizdeki *C. neoformans*'ın kolonizasyon bölgelerine ait ilk tahmin analizi Acheson ve arkadaşlarının³ Vancouver adasındaki *C. gattii* salgınından sonra yaptıkları raporda incelenmiştir. Bu araştırmada Çanakkale Boğazı, İzmit Körfezi, Ege sahilleri ve İç Batı Anadolu Bölgesinde *C. neoformans* (VNI) kolonizasyonu öngörülmektedir³. Cogliati ve arkadaşlarının⁴ tüm Akdeniz Havzası'nı içeren kolonizasyon tahmininde ise Doğu Karadeniz sahili, Bozburun Yarımadası, Akdeniz Körfezi sahili ve Çukurova'da *C. neoformans* var. *grubii*, Marmara ve Çukurova Bölgeleri ile Orta-Doğu Karadeniz sahil şeridinde *C. neoformans* var. *neoformans* kolonizasyonu öngörüldükçe

Çukurova ve Doğu Karadeniz sahillerinde *C.gattii* kolonizasyonu olabileceği bildirilmiştir. Acheson ve arkadaşları³ küresel odak tahmini yaparken, Cogliati ve arkadaşları⁴ kapalı havza oluşturan Akdeniz çevresinde çalışmıştır. Her iki çalışmada da, ülkemiz için detaylı olarak tanımlanan iklim bölgelerine uyum sağlamayan veriler üretilmiştir. Bu duruma biyoiklim verilerinin farklı kaynaklardan alınması neden olmuş olabilir. Bu çalışmada iklim verileri Cogliati ve arkadaşlarının⁴ da kullandığı veri tabanından alınmış, ancak farklı olarak ülkemizden 41 izolasyon koordinatına göre risk haritası hazırlanmıştır. Bu haritaya göre; iklim benzerliği olan ancak daha önce izolasyon yapılamayan¹⁷⁻¹⁹ veya hiç taranmayan (Adıyaman Bölgesi-Atatürk Barajının batısı vb.) bölgelerde de kolonizasyon olabileceği öngörülmektedir. Bu durum, çevresel araştırmaların devamının yapılmasının gerekliliğini göstermektedir.

Tür dağılım modelleme programları ile yapılan kriptokok kolonizasyon tahminlerinde biyoiklim faktörleri incelenmiştir. Zambiya'da izotermalite ve nemin *C.neoformans* kolonizasyonuna etki eden en önemli değişken olduğu raporlanmıştır¹. Kolombiya'da ise nemin özellikle *C.gattii* için önemli bir faktör olduğu, yağmur ormanlarının ise çok yağış ve çok yüksek nem nedeni ile kolonizasyona uygun olmadığı bildirilmiştir⁵. Sunulan çalışmada kolonizasyona etki edebilecek en önemli faktörün sıcak ve soğuk dönemlerdeki nem olduğu saptanmıştır (Şekil 1). Bu durum, Acheson ve arkadaşlarının³ modellemesine karşılık, neden bölgeden *Cryptococcus* izolasyonu olmamasını açıklayabilmektedir. Bölge Köppen-Geiger iklim sınıflamasına göre Cfa-Cfb iken çevresel izolasyon yapılan bölgeler çoğunlukla Csa iklim sınıfındadır^{7-12,20}. Burada en belirgin özellik Doğu Karadeniz bölgesindeki yaz dönemlerinin yağışlı ve nispeten daha az sıcak geçmesi, kış dönemlerinin ise nispeten daha soğuk olmasıdır. Benzer şekilde, daha az yağışlı olan Kolombiya'da And Dağları'nın alçak kesimleri boyunca kolonizasyon riskinin yoğun olduğu bölgeden çok miktarda kriptokokoz olgusu rapor bildirilmiştir⁵. Kışları sıcak ılıman iklim kuşağındaki nem, bu maya mantarının yaşamını sürdürmesinde önemli görünmektedir. Benzer şekilde Cogliati ve arkadaşları⁴ modellemelerinde Türkiye'nin güney sahillerinin de bulunduğu Kuzey Akdeniz için nemin yaz dönemlerinde önemli olduğunu belirtmiştir.

Sunulan çalışma ile ülkemiz için ilk defa *C.neoformans*'ın çevresel kolonizasyon risk haritası oluşturulmuştur. Özellikle yüksek kolonizasyon riski öngörülen bölgelerdeki kriptokokoz olgularının çevresel kolonizasyon odaklarının bulunması, bu mayanın yaşam döngüsünün ve patojenitesinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Vanhove M, Beale MA, Rhodes J, Chanda D, Lakhi S, Kwenda G, et al. Genomic epidemiology of *Cryptococcus* yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/AIDS cohort. *Mol Ecol* 2017;26(7):1991-2005.
2. Desjardins CA, Giamberardino C, Sykes SM, Yu CH, Tenor JL, Jones AM, et al. Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res* 2017;27(7):1207-19.

3. Acheson ES, Galanis E, Bartlett K, Mak S, Klinkenberg B. Searching for clues for eighteen years: deciphering the ecological determinants of *Cryptococcus gattii* on Vancouver Island, British Columbia. *Med Mycol* 2018;56(2):129-44.
4. Cogliati M, Puccianti E, Montagna MT, De Donno A, Susever S, Ergin C, et al. Fundamental niche prediction of the pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Europe. *Environ Microbiol* 2017;19(10):4318-25.
5. Mak S, Vélez N, Castañeda E, Escadon P; Colombian Environmental Study Group. The fungus among Us: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* ecological modeling for Colombia. *J Fungi (Basel)* 2015;1(3):332-44.
6. Nyakarahuka L, Ayebare S, Mosomtai G, Kankya C, Lutwama J, Mwline FN, et al. Ecological niche modeling for filoviruses: a risk map for ebola and marburg virus disease outbreaks in Uganda. *PLoS Curr* 2017;9.
7. Cogliati M, D'Amicis R, Zani A, Montagna MT, Caggiona G, De Giglio O, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C.gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Res* 2016;16(7):pii:fow086.
8. Ergin Ç, İlkit M, Hilmioğlu S, Kaleli İ, 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.
9. Gökçen H, Ergin Ç. Muğla-Milas ilçe yerleşimi bölgesi *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Pam Tıp Derg* 2014;7(2):109-12.
10. Ergin Ç, Kaleli İ. Denizli şehir merkezinde kovuklu ağaç gövdelerinden *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2010;44(1):79-85.
11. Ergin Ç, Şengül M, Kiriş Satılmış Ö. Türkiye'nin Güney-Batı Anadolu bölgesindeki ılgın (Genus: Tamarix L.) ağaçlarında *Cryptococcus neoformans* kolonizasyonu takibi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2014;44(4):158-62.
12. Şengül M, Kutlu M, Döğen A, Aksoy L, Gonca S, İlkit M, et al. Denizli Bölgesi'nde kestane (*Castanea sativa*) ağacından *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2019;53(1):61-9.
13. Cogliati M, Zani A, Rickerts V, McCormick I, Desnos-Ollivier M, Velegraki A, et al. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. *Fungal Genet Biol* 2016;87:22-9.
14. Warren DL, Glor RE, Turelli M. ENM Tools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography* 2010;33(3):607-11.
15. Merow C, Smith MJ, Silander JA Jr. A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography* 2013;36(10):1058-69.
16. Saraçlı MA, Yıldıran ST, Sener K, Gonlum A, Dogancı L, Keller SM, et al. Genotyping of Turkish environmental *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolates by pulsed field gel electrophoresis and mating type. *Mycoses* 2006;49(2):124-9.
17. Özmen GÖ, Solmaz H. Kovuklu ağaç gövdelerinde *Cryptococcus neoformans* varlığının araştırılması. p.204, XI.Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 01-04 Ekim 2013, Samsun.
18. Ateş A, Turaç Biçer A, İlkit M. Sedimentasyon ve eküvyon yöntemleri ile okaliptüs ağaçlarında *Cryptococcus* spp. varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008;42(4):655-60.
19. Karaca Derici Y, Tümbay E. İzmir ili'nde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. *Infeksiyon Derg* 2008;22(1):53-8.
20. Öztürk MZ, Çetinkaya G, Aydın S. Köppen-Geiger iklim sınıflandırmasına göre Türkiye'nin iklim tipleri. *J Geography* 2017;35:17-27.