

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/279515652>

The Investigation of the presence of *Histoplasma capsulatum* in the Denizli–Kaklik cave recently opened to tourism (Rourizme henı açılan Denizli–Kaklik Magarasi’nda *Histoplasma caps...*

Article · January 2004

CITATIONS

0

READS

48

7 authors, including:



Çağrı Ergin

Pamukkale University

115 PUBLICATIONS 701 CITATIONS

SEE PROFILE



Mustafa Şengül

Pamukkale University

34 PUBLICATIONS 147 CITATIONS

SEE PROFILE



İlknur Kaleli

Pamukkale University

105 PUBLICATIONS 896 CITATIONS

SEE PROFILE



Süleyha Hilmioğlu Polat

Ege University

100 PUBLICATIONS 1,467 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Project

Survey of Cryptococcosis through and European Epidemiological Network (SCrEEN Project) [View project](#)



Project

SERUM RESISTANCE [View project](#)

TURİZME YENİ AÇILAN DENİZLİ-KAKLIK MAĞARASI'NDA *HISTOPLASMA CAPSULATUM* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

THE INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *HISTOPLASMA CAPSULATUM* IN THE DENİZLİ-KAKLIK CAVE RECENTLY OPENED TO TOURISM

Çağrı ERGİN¹ Mustafa ÇENGÜL¹ İlknur KALELİ¹ Suleyha HİLMİOĞLU POLAT²
Patrícia M.S. TAVARES³ Mauro de Medeiros MUNIZ³ Rosely Maria ZANCOPÉ-OLIVIERA³

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

³ Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazilya

Anahtar Sözcükler: *Histoplasma capsulatum*, *Renispora flavissima*, çevre, mağara

Key Words: *Histoplasma capsulatum*, *Renispora flavissima*, environment, cave

Geliş tarihi: 03 Mart 2004

Kabul tarihi: 10 Mart 2004

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, turizme yeni açılan Denizli Kaklık Mağarası'nda *Histoplasma capsulatum* varlığı aramak idi. Kaklık Mağarası alışılmışın dışında su biyokimyasına sahiptir ve bu nedenle içinde Pamukkale (Hierapolis) benzeri travertenler bulunmaktadır. Mağaradan toplanan yarasa dışkı örnekleri maya özütü-fosfat agar besiyerinde kültür edilmiştir. Kuşku mantar kökenlerinden dimorfizm dönüşüm deneyleri, hayvan inokülasyonu ve ekzo-antijen testi yapılmıştır. Bu testlerdeki negatif sonuçlara karşın *H. capsulatum* M antijeni kodlayan DNA parçası amplifiye edilmemiştir. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sekans analizi ile suşun *Renispora flavissima* olduğu saptanmıştır. Bu sonuç; tanımlanması zor mantarlarda moleküler yöntemler ile onaylanmanın yanında klasik değerlendirilmenin önemini göstermektedir.

SUMMARY

The purpose of this study was to investigate the presence of *Histoplasma capsulatum* in the Kaklık Cave, Denizli, Turkey, newly opened to tourism. The cave has unusual biochemical ingredients causing Pamukkale (Hierapolis)-like travertains. Bat droppings picked from deep parts of the cave were cultured on yeast extract-phosphate agar. Exoantigen and yeast converting tests of suspect colonies containing histoplasma-like macroconidia were performed. These tests were negative. Although DNA encoding partial portion of the M-protein was amplified by PCR, suggesting the isolate to be *H. capsulatum*, universal primers based on highly conserved regions of the rDNA were used for PCR amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region followed by sequence comparison to determine phylogenetic relationship of this isolate with fungal species. The sequence data showed 98% homology of this isolate with *Renispora flavissima*. These results show the importance of traditional characterization by analysis of phenotypes with molecular technology for identification of fungi.

GİRİŞ

Histoplazmozun etkeni olan *Histoplasma capsulatum* turn dünyada görülebilen, endemik infeksiyonlara yol açan di-

morfik bir mantardır. Yarasa dışkıları yoğun bulunduğu mağaralar en yaygın infeksiyon kaynaklarıdır. Bu nedenle *H. capsulatum*'ün oluşturduğu klinik tablo "Mağara Hastalığı" adıyla da bilinmektedir. Türkiye'de

histopatolojik incelemeler ile histoplazmoz tamsi konulan olgular var ise de hastadan kiiltur ile taninin dogrulan-digi olgu henuz yoktur (1, 2). Denizli bölgesine çok yakm olan Sardes antik çehrinde 1997 yilinda Yucel ve Kan-tarcioglu (3) *H. capsulatum*'u tumulus odun buluntularm-dan izole ederek Tiirkiye'deki varligim göstermişlerdir.

Bu çalişmanm amacı; magaracilik turizm potansiyeli yuksek olan Denizli İli Kaklik Magarasi'nda turistik aktivi-teler öncesinde *H. capsulatum*'un varligimin araçtirilma-sidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kaklik Magarasi Denizli'nin 30 km dogusunda, halk ta-rafından bilinen ve 2003 yih içinde turizme açılan bir magaradir (Şekil 1). Kaklik Magarasi'm oluşturan su ve yapılar biyokimyasal özellikleri (Tablo 1) daha önce-den tammlanmıştır (4).

Tablo 1. Kaklik Magarasi suyunun biyokimyasal özellikleri

Isi (Yil boyu ortalama)	23.2 ±0.3°C		
pH	7.0		
Sodyum	33 mg/L	Demir	27 mg/L
Potasyum	2.01 mg/L	Çinko	15 mg/L
Kalsiyum	300.9 mg/L	Bakir	252 mg/L
Magnezyum	80.1 mg/L	Kurşun	92 mg/L
Bikarbonat	544.7 mg/L	Stronsiyum	7506 mg/L
Klor	131.8 mg/L	Lityum	36 mg/L
Sulfat	501.1 mg/L	Aluminyum	0 mg/L

Kaklik Magarasi örnekleri maske ve eldiven gibi kişisel koruma onlemleri alınarak 2002 yilinn Nisan ayında top-landı (5). Magaranin dip kesimlerinden yarasa dışkisi ile bulaçmış 15 farklı toprak örneği 100 ml'lik plastik kaplara alındı. Aym gün içinde laboratuvara ulaçtirilan örnekler hacimlerinin yaklaşık 10 kati oranında steril fizyolojik tuzlu su ile sulandırıldı. Çiddetlice çalkalanan örnekler içerdik-leri partiküllerin dibe çökmesi için yarım saat boyunca kendi haline bırakıldı. Üst yüzeyden eküvyon yardımı ile alınan sulandırılmış örnek, mayaözütü-fosfat besiyerine amonyak yardımı ile ekildi (6). Ekimler oda sıcaklığında nemli etüvde iki ay süreyle inkiibe edildi. Üreyen her ko-loniden tüberküllu makrokonidyumların varligi arandı.

Onbeç toprak örneğinin ekildiği plaklardan sadece bi-rinde çok sayıda üreyen kúf kolonilerinin mikroskopik in-

celenmesinde tüberküllu makrokonidyumlar saptandı (Çekil 2 ve 3). Bu kolonilerden beyin kalp infuzyon agara pasajlar yapılarak saf kultur elde edildi. Dimorfik dönüçü-mün gösterilmesi amacı ile saf kulturden kanli sisteinli beyin-kalp infuzyon besiyerine ardıçık 12 altpasaj yapıla-rak 37° C'de inkiibe edildi. Diğer yandan, aym saf kulturden hazırlanan mantar suspansiyonu iki beyaz fareye periton yolu ile inokule edildi. İki ay sonunda fareler de-kapite edilerek dokularında maya formunda mantar ele-manları arandı ve organlarından (kan, beyin, karaciger, dalak, böbrek) kültürler yapıldı.

Saf kultur halinde elde edilen *Histoplasma capsulatum* ontamli mantar onaylama amacı ile bu konuda deneyimi olan Brezilya'daki Fiocruz (Pesquisa Clínica Evandro Chagas) Enstitüsü'ne gönderildi. Bu merkezde ekzo-antijen testi, *Histoplasma capsulatum* için spesifik M an-tijeni kodlayan DNA parçasının amplifikasyonu ve ITS1-5.8S-ITS2 rDNA dizi analizi yapıldı (7, 8). Fiocruz (Pes-quisa Clínica Evandro Chagas) Enstitüsü'nde PCR ürünlerini elde etmek için QIAquick (Qiagen) saflaştırma kiti, dizi analizinde universal fungal primerler; ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ve ITS4 (TCCTCCGC TTATTGATATGC) kullandı.

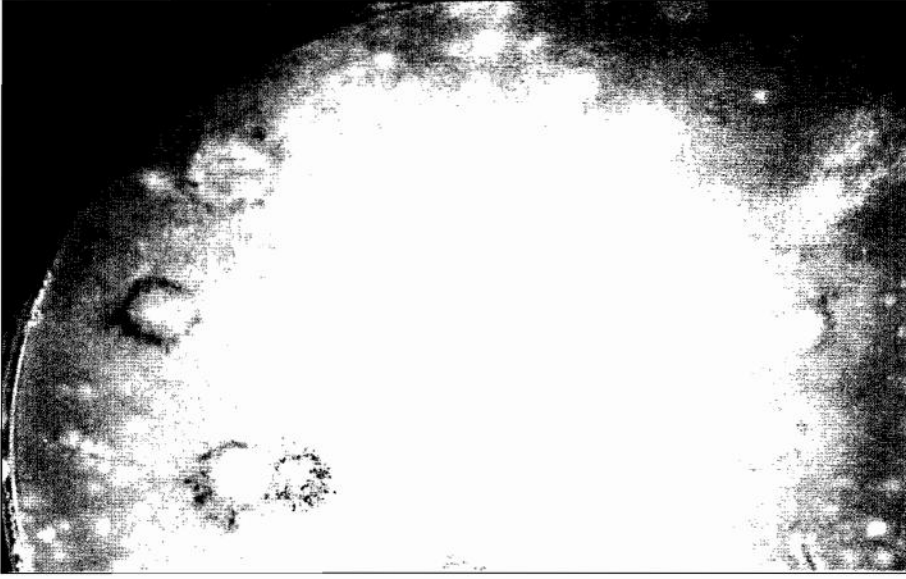
BULGULAR

Kaklik Magarasi'mın 15 farklı dip bölgesinden alınan örneklerin sadece birinden, mikroskopik incelemesinde Histoplasma benzeri makrokonidyumları bulunan çok sayıda aym morfolojide koloni üretilmiştir. Köken beyin-kalp infuzyon agar besiyerinde saf kultur halinde elde edilmiştir. Geniş bir hemoliz zonu olan bu kökenden ya-pılan 12 altpasaja rağmen maya çekline dönüşüm olma-mıştır. *Histoplasma capsulatum* ekzo-antijen testi olum-suzdur, ancak *H. capsulatum*'un M antijeni kodlayan DNA bölgesinin varligi gösterilmiştir. Bu dizinin amplifiye edilmesi, kökenin farklı genotipte *H. capsulatum* olabi-leceğini düşündürmüştür. Bu nedenle, DNA dizi analizi yapılmıştır. Sonuç olarak test edilen kökenin *Renispora flavissima* (Uyumluluk oranları CEH313 ile %98, CEH404 ile %98 ve CBS708.79 ile %97) olduğuna karar verilmiştir.

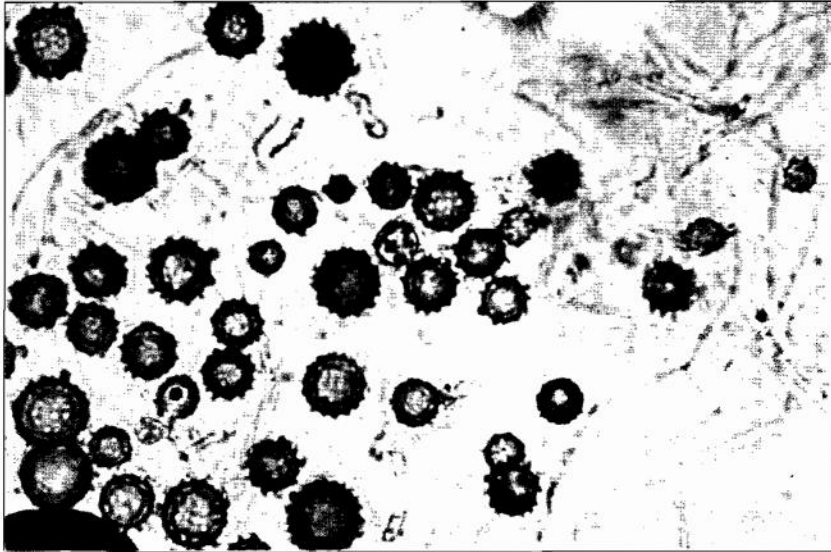
Yeni turizme açılmış olan Kaklik Magarasi'ndan örnek-lerde dogrudan kiiltur yöntemi ile *H. capsulatum* buluna-mamıştır.



Çekil 1. Kaklik Magarasi'ın traverten özellikli iç görünümü



Çekil 2. Mayaözütü-fosfat besiyerinde üreyen beyaz (albino) koloniler



Çekil 3. Şekil 2'de görülen kolonilerin mikromorfolojisi (Metilen mavisi, 400x)

TARTIÇMA

Histoplasma capsulatum ile ilgili araştırmalar, mantarin bulunduğu mağaraların ve toprakların yıl içinde sabit kalan bir isiya, devamlı nem bulunan bir ortama ve kanatlı hayvan dışkıları ile oluşan zengin organik maddelere sahip olduğunu göstermiştir.

Denizli-Kaklik Magarasi Çúruksu Vadisi'nin dođu ucunda yer alan bir oluşumdur. Bölgenin jeolojik yapısından dolayı mağaranın içinde bulunan kaynak suyu yüksek nemli havaya ve Pamukkale benzeri oluşumlara neden olmaktadır. Bu oluşumlar yeraltı suyunda bulunan çözünmüş karbonik asit nedeniyledir. Asit olarak yüzeye çıkan su ortamdaki kalsiyum karbonat ile birleşerek çökelmektedir. Sonuçta mağara içindeki suyun çevresindeki bölgelerde asidik bir ortam oluşmaktadır. Suyun pH'sinin ortalama 7.0 olduğu bulunmuştur (4). Suyun ve dolayısıyla etkilediği çevresel ortamın pH derecesi, *H. capsulatum* ve pek çok insan patojeni mantarin üremesine engelleyici bir faktör değildir. Bölgeye halk arasında "Kokan Hamam" denmektedir. Magaranın iç kesimlerinde turizm amaçlı düzenleme çalışmaları halen devam etmektedir. Çok sayıda yarasanın yaşadığı bu kesimlerden aydınlatmanın yapılmadığı zamanlarda yarasalar yine mağaranın girişinden açık alana çıkmaktadır. Dış ortam ile devamlı bağlantının olduğu ve insan hareketlerine açılan Kaklik Magarasi bu çekli ile *H. capsulatum* varlığında infeksiyon için risk oluşurmaktadır. Ancak mağaranın havasında yüksek oranda bulunan sülfürün ve iz elementlerin mantarin yaşam döngüsüne etkisi konusunda literatürde bilgi bulunamamıştır.

Bölgedeki halk tarafından mağara toprağının bazı deri hastalıklarında doğrudan lezyonlu bölgeye sürme yöntemiyle kullanıldığı öğrenilmiştir (9). Bu durum, olası patojenlerin doğrudan deriye bulaşmasına olanak sağlayacaktır. *Histoplasma capsulatum* genellikle solunum yolları patojeni olarak kabul edilmekle birlikte, Türkiye'de kültür ile doğrulanmayan primer deri histoplazmozunu olgusu bildirilmiştir (10). Rize ve Yozgat bölgelerinde yaça-

yan iki hastadan histopatolojik kesitlerinde mantarin gösterilmesi, yapılan seroprevalans çalışmalarında değişik bölgelerden farklı oranlarda olumlu sonuçların bildirilmesi Türkiye'de *H. capsulatum* varlığını detaylı olarak araştırılmasının gereğini düşündürmektedir (1, 2, 11). Serolojik yöntemler ile tam her zaman tartışmalı sonuçlar oluşurmaktadır. Seroloji testlerinin duyarlılığı hastalığın kliniğine göre %71-100 arasında değişmekle birlikte farklı cinslerdeki mantarlara karşı gelişen antikörler ile çapraz reaksiyonlar siktir (12). Türkiye'de 1965 yılından itibaren yapılan çevresel örneklerden *H. capsulatum* araştırmalarında sadece Manisa-Sardes antik çehir bölgesinden köken ayrılabilmiştir (3, 13, 14).

Histoplasma capsulatum varlığı saptamada uzun süren kültür işlemine gerek kalmadan doğrudan klinik örnekten hızlı tam ve tüberküllü makrokonidyumları ile *Histoplasma*'ya benzeyen *Chryso sporium*, *Corynascus*, *Renispora* ve *Sepedonium* gibi saprofitik cinslerden ayrımı M antijenini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu ile yapılmaktadır. Bu testin 37°C'da maya formuna dönüşmeyen ve ekzo-antijen testi olumsuz olan kökenlerde de kullanıldığı, duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğu belirtilmektedir (8). Doğal ortamdan ayrılan kökende *Histoplasma* benzeri makrokonidyumların bulunmasına ve ekzo-antijen testinin olumsuz olmasına rağmen M antijenini kodlayan DNA bölgesi amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonrasında kökenin *Histoplasma* olduğu düşünülmüştür. *Histoplasma capsulatum* monofilatik değildir, kökenler arasında moleküler farklılıkların görülmesi beklenebilir (15). Ancak kesin sonucun alınması için DNA dizi analizi yapılmış, köken beklendiğinden farklı olarak *Renispora flavissima* olarak tanımlanmıştır.

Bu sonuçlar *H. capsulatum* kuçkulu kökenlerde M antijenini kodlayan DNA dizisinin amplifikasyonu ile tanımlanması yeterli olmayacağı; mantarin adlandırılmasında önce standart konvansiyonel yöntemlerin mutlaka uygulanması gerektiği ve moleküler yöntemlerin konvansiyonel yöntemler ile birlikte tam desteklemek amacıyla kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Yuçel A, Kantarcioğiu AS. *Histoplasma capsulatum*un epidemiyolojisi. *T Parazitol Derg* 1999; 23: 56-61.
2. Tiimbay E, Metin DY. Dimorfik endemik mikozlar. Yegenoğlu Y, Erturan Z, ed. 3. *Ulusal Mantar Hastahklan ve Klinik Mikoloji Kongresi (27-30 Mayıs 2003, Bodrum) Tutanaklar'da*. İstanbul: Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2003: 145-51.
3. Yuçel A, Kantarcioğiu AS. Türkiye'de doğadan (Sardes Bintepelele 89 Tümülüğü odun buluntularından) ilk kez elde edilen *Histoplasma capsulatum* (telemorfu, *Ajellomyces capsulatus*) kökeni. *İnfek Derg* 2000; 14: 1-14.
4. Gökgöz A. Pamukkale-Karahayit-Gölemezli hidrotermal karstın hidrojeolojisi [Doktora Tez. Isparta: Suleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1994.

5. **Lenhart SW.** Recommendations for protecting workers from *Histoplasma capsulatum* exposure during bat guano removal from a church's attic. *Appl Occup Environ Hyg* 1994; 9: 230-6.
6. **Larone DN.** *Medically Important Fungi*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, **1995**: 252.
7. **Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe Jr GS.** Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1999; 67: 1947-53.
8. **Guedes HLM, Guimarães AJ, Muniz MM, et al.** PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 535-9.
9. **Gökgöz A.** Kişisel görüşme, **2003**.
10. **Çömçuoğlu C, Çalikoglu E, Üstun H.** immunkompetan bir primer kutanöz histoplazmozis olgusu. *XIX. Ulusal Dermatoloji Kongresi (3-7 Eylül 2002, Kapadokya) kitabında*. **2002**: 56.
11. **Karasu N, Sirman AA.** Ankara'da histoplasmin ve coccidioidin deri testleri ile yapılan araştırmalar. *Tüberküloz ve Toraks* **1953**; 1: 3-14.
12. **Wheat J.** Histoplasmosis: Experience during outbreaks in Indianapolis and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **1997**; 76: **339-54**.
13. **Unat EK, Yucel A.** Konak dışında *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum* araştırmaları. *İÜ Tıp Fak Mec* **1965**; 28: 47-51.
14. **Koç AN, Durkut S.** Kayseri yöresindeki guvercinliklerde *Cryptococcus neoformans*, diğer medikal önemli iireaz ureten mayaların ve *Histoplasma capsulatum*'un araştırılması. *İnfek Derg* 2001; 15: 335-40.
15. **Kasuga T, Taylor JW, White TJ.** Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 653-63.

İLETİÇİM

Yrd. Doç. Dr. Çağrı ERGİN

Posta Kutusu 119

DENİZLİ

e-posta: cagri@pamukkale.edu.tr