

İZMİR İLİNDE DOĞAL VE KLİNİK *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* KÖKENLERİNİN VARYETE VE SEROTİPLERİ

VARIETY AND SEROTYPES OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS AND ENVIRONMENTAL SOURCES IN IZMIR, TURKEY

Yeşer KARACA DERİCİ¹ ve Emel TÜMBAY²

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

Anahtar Sözcükler: *Cryptococcus neoformans*, varyete, serotip, klinik örnekler güvercin dışkısı, ökaliptus debris

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, variety, serotype, clinical specimens, pigeon droppings, eucalyptus debris

Geliş: 26 Kasım 2007

Kabul: 03 Ocak 2008

ÖZET

Bu çalışma, *Cryptococcus neoformans* için doğal kaynak olarak kabul edilen güvercin dışkısından ve ökaliptus debrsinden mantarı izole edip bu doğal kökenlerin ve ayrıca bölgemizdeki kriptokokkozlu hastalardan izole edilmiş olan *C. neoformans* klinik suşlarının varyete ve serotiplerini saptamak amacıyla yapıldı. İzmir ve çevresinden toplanan toplam 90 güvercin dışkısı örneğinden plak yöntemi ile sekiz (%8.8) *C. neoformans* kökeni izole edilip bunların tümünün kanavanin-glisin-bromtimol agar yöntemi ile var. *neoformans* ve Crypto-check lam aglütinasyonu testi ile beşinin (%62.5) serotip D ve üçünün (%37.5) serotip A olduğu saptandı. Ökaliptus debris örneklerinden *C. neoformans* izole edilemedi. Bölgemizdeki kriptokokkozlu hastalardan izole edilen beş klinik suşun tümünün yine sırasıyla aynı yöntemler kullanılarak *C. neoformans* var. *neoformans* ve serotip A olduğu belirlendi. Çalışmamızda doğal *C. neoformans* kökenlerinin A ve D serotipinde, klinik kökenlerin ise A serotipinde olduğu ilk kez ortaya konulmuş olmakla birlikte, konuya ilişkin çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır.

SUMMARY

The aim of this study was to isolate *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and eucalyptus debris which are known as the natural sources for this yeast and to determine the varieties and serotypes of these natural strains as of well as of the clinical strains isolated in cryptococcosis patients in Izmir, Turkey. In 90 pigeon dropping samples collected from Izmir and its environment eight (%8.8) *C. neoformans* strains were isolated using plate method and all of them were found as var. *neoformans* by canavanine-glycine-bromthymol agar method and five of these were of serotype D (%62.5) while three were of serotype A (%37.5) by Crypto-check slide agglutination method. From the eucalyptus debris samples no strain could be isolated. All of the five clinical strains isolated in cryptococcosis patients were determined as *C. neoformans* var. *neoformans* and serotype A using the same methods, respectively. It is concluded that, although for the first time it is determined that the natural *C. neoformans* strains are of serotypes A and D and clinical strains are of serotype A, multicenter studies are required on the subject.

GİRİŞ

Cryptococcus neoformans, kriptokokkoz etkeni kapsüllü bir maya mantarı olup fenotipik, serolojik, biyokimyasal, epidemiyolojik ve genetik farklılıklara dayanarak *C. neoformans* var. *neoformans* ve *C. neoformans* var.

gattii olmak üzere iki varyeteye ayrılmıştır. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* tüm dünyada yaygın olup toprakta, çeşitli kanatlı dışkısında ve özellikle güvercin dışkısında bulunur ve A, D ve AD serotiplerini içerir (1-5). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* ise, tropikal ve

subtropikal bölgelerde bulunur ve kaynağı ökaliptus ağacı olup B ve C serotiplerini içerir (6-8). Kriptokokkoz olgularında etken çoğunlukla *C. neoformans* var. *neoformans*'tır (1, 2). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*'nin neden olduğu infeksiyon ise tropikal ve subtropikal bölgelerle sınırlıdır. Türkiye'de kriptokokkoz olguları sınırlı sayıda olup bu yayınlarda etken varyetesi ve serotipi saptanmamıştır (9-12).

Bu çalışma, doğal kaynak olarak kabul edilen güvercin dışkısından ve ökaliptus debrsinden *C. neoformans* izole etmek, izole edilen doğal suşların ve ayrıca bölgemizdeki hastalardan izole edilmiş olan *C. neoformans* klinik suşlarının varyete ve serotiplerini saptamak amacıyla yapıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Cryptococcus neoformans için doğal kaynak olan güvercin dışkısı örnekleri için, Nisan-Eylül 2002 tarihlerinde İzmir'de güvercin yetiştiricilerinin çok sayıda bulunduğu Bayraklı, Gültepe, Yenişehir, Ferahlı, Bornova, Aliğa, Urla, Fahrettin Altay ve Buca semtlerindeki güvercin besleyicilerin evlerine gidilerek toplam 90 güvercin dışkısı örneği toplandı. Her bir örnek, güvercin kümesinin toprak zeminindeki kuru gübre yığınınından 25-30 g miktarda spatülle alınıp steril Petri kutularına konularak laboratuvara getirildi. Bir diğer doğal kaynak olan ökaliptus örnekleri için ise Ocak-Haziran 2002 tarihlerinde İzmir'in Bornova, Menemen, Foça, Karşıyaka, Buca, Konak ve Güzelbahçe semtlerine gidilerek toplam 50 ökaliptus debrs örneği (yaprak, tohum, çiçek) toplandı. Örnekler ağaç altındaki toprak zeminde bulunan yaprak, tohum gibi döküntülerden 20-25 g miktarda alınarak plastik torbalar içinde laboratuvara getirildi. Tüm örnekler inceleninceye değin +4° C'de saklandı. Klinik *C. neoformans* kökenleri olarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 1996-2002 yılları arasında yatan kriptokokozlu hastalardan izole edilen ve mikotekte korunan beş köken incelemeye alındı. Standart *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 kökeni, soyutlanan her kuşkulu mayanın mikolojik incelemesinde kontrol suş olarak kullanıldı.

Güvercin dışkısı ve ökaliptus debrsinden yaklaşık 5 g örnek 250-500 ml'lik steril Erlenmayer şişesine konulup üzerine 25 ml antibiyotikli tuzlu su (amikasin 500 mg + serum fizyolojik 1000 ml) katıldı. Erlenmayer 5 dakika vortekslenip daha sonra kaba partiküllerin dibe çökmesi için 20-30 dakika oda ısısında bırakıldı. Çökeltinin üstündeki sıvı bölümü üç kat steril gaz bezinden süzülerek steril bir tübe alınıp ve bu süzüntüden ekimler

yaşıldı. *Cryptococcus neoformans* izolasyonunda, Littman ve Schneerson (5), Bergman (13), Staib ve Seeliger (14)'in önerdiği yöntemler doğrultusunda, Tümbay (15)'in önerdiği bazı küçük modifikasyonlar yapılarak direkt plak yöntemi kullanıldı. Besiyeri olarak Staib-Seeliger besiyeri (*Guizotia abyssinica* kre-atinin agar) kullanıldı. Kuşkulu kahverengi kolonilerden yapılan preparatlarda kapsüllü maya hücresi görülünce sırasıyla, Staib-Seeliger besiyerinde saf kültür, tek bir kahverengi koloniden Saboraud-Dekstroz-Agar (SDA) plağına saf kültür, üreaz deneyi, mısır unu agarda morfoloji kontrolü, 37° C'de üreme kontrolü, hızlı nitrat indirgeme deneyi yapıldı. Morfolojik ve kimyasal özellikleri *C. neoformans*'inkine uyan maya suşunun otoma-tize sistem olan API 20C AUX (bio Mérieux, Fransa) ile de doğrulanması yapıldı.

Varyete saptamak için, kanavanin-glisin bromtimol agar (KGBA)'a ekim yapıldı (16). Her plağa *C. neoformans* suşu öze ile zigzag ekim yapılarak yoğun olmayacak şekilde ekildi. Ekili plaklar 26° C'de 5 gün süre ile inkübe edilip, inkübasyonun 2 ve 5. günlerinde üreme kontrolleri yapılarak renk değişikliği arandı.

Serotip saptama için, Crypto-check kit (Iatron Co., Japonya) ile lam aglütinasyonu yapıldı. A, B, C, D ve AD serotiplerine ilişkin her bir bağışık serumdan ve serum fizyolojikten birer damla lama dağıtılıp ve 26° C'de inkübe edilen maya kolonilerinden plastik öze ile küçük bir miktar alınıp karıştırıldı. Lam nazıkçe elde çalkalanarak 2 dakika içinde gözle aglütinasyon arandı. Bu deney ile maya suşunun antijenik formülüne bakılarak serotipi belirlendi.

Kriptokokozlu hastalardan izole edilen beş *C. neoformans* kökeni için yeniden identifikasyon testleri ve doğrulandıktan sonra varyete ve serotipleri aynı yöntemler kullanılarak belirlendi.

BULGULAR

Doğal kaynak olarak incelenen toplam 90 güvercin dışkısı örneğinin sekizinden (%8.8) *C. neoformans* izole edildi. Bu kökenlerin tümü *C. neoformans* laboratuvar tanı göstergelerinin hepsine uyan özellikler gösterdiler (Tablo 1). Doğal *C. neoformans* kökenlerinin tümü ilk izolasyonlarında klinik kökenlerden farklı olarak ince kapsüllü olup besiyerinde pastöz koloni oluşturdular. Bir diğer doğal kaynak olarak incelenen toplam 50 ökaliptus debrsinde *C. neoformans* bulunmadı.

Tüm doğal *C. neoformans* suşları, var. *neoformans* olarak saptandı. Bu doğal kökenlerden beşi (%62.5)

serotip D ve üçü (%37.5) serotip A olarak saptandı (Tablo 2). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoteji'nde bulunan beş klinik kökenin *C. neoformans* olduğuna dair tanısal özellikler (Tablo 3)

tekrar gösterildikten sonra varyete ve serotip tayini yapıldı. Tüm klinik kökenler var. *neoformans* ve serotip A (%100) olarak saptandı (Tablo 4).

Tablo 1. Doğal kaynaklardan izole edilen *C. neoformans* kökenlerinin tanısal özellikleri

	Köken no.								m
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Koloni	P	p	p	p	p	p	P	p	
Kapsül	i	i	i	i	i	i	İ	i	o
37° C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kahverengi koloni	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Üreaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mısır unu agarda	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok
KGBA'da üreme	yok	yok	yok	yok	yok	yok	Yok	yok	yok
Nitrat indirgeme	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cn= *C. neoformans*, KGBA= Kanavanin-glisin-bromtimol agar

p= Pastöz koloni, m= Mukoit koloni, i= İnce kapsül, o= Orta kalınlıkta kapsül

Tablo 2. İzole edilen sekiz doğal *C. neoformans* suşunun varyete ve serotip dağılımı

	Köken no.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Varyete	neo	neo	neo	neo	neo	neo	neo	neo
Serotip	D	A	A	D	A	D	D	D

neo= *C. neoformans* var. *neoformans*

Tablo 3. Klinik *C. neoformans* kökenlerinin tanısal özellikleri

	Köken no.						Cn kontrol
	1	2	3	4	5		
Koloni	m	m	M	m	m	m	m
Kapsül	o	o	O	o	o	o	o
37° C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+
Kahverengi koloni	+	+	+	+	+	+	+
Üreaz	+	+	+	+	+	+	+
Mısır unu agarda	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok	hif yok	Hif yok	hif yok
Nitrat indirgeme	-	-	-	-	-	-	-
KGBA'da üreme	yok	yok	Yok	yok	yok	yok	yok

Cn= *C. neoformans*, KGBA= Kanavanin-glisin-bromtimol agar

p= Pastöz koloni, m= Mukoit koloni, i= İnce kapsül, o= Orta kalınlıkta kapsül

Tablo 4. Beş klinik *C. neoformans* kökeninin varyete ve serotip dağılımı

	Köken no.				
	1	2	3	4	5
Varyete	neo	neo	neo	Neo	neo
Serotip	A	A	A	A	A

neo= *C. neoformans* var. *neoformans*

TARTIŞMA

Cryptococcus neoformans var. *neoformans*, kanatlı dışkısı bulaşmış toprakta ve özellikle kuru güvercin dışkısı olmak üzere çeşitli kanatlı dışkılarında bulunur (1-5). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*'nin kaynağı ise ökaliptus ağacı olup özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerle görülür (6-8).

Amerika Birleşik Devletler'inde mantarın güvercin dışkısından izolasyon oranı %10-69 arasında olduğu bildirilmektedir (5, 17-21). Avrupa'da ise daha düşük izolasyon oranları elde edilmiş olup, bu oran %0.7-39 arasında değişmektedir (13, 22-24). Bu çalışma, Türkiye'de *C. neoformans*'ın kuş dışkısından izolasyonuna ilişkin dokuzuncu çalışmadır. Türkiye'de güvercin dışkısından *C. neoformans* izolasyon oranları %1-18.9 arasında yer almakta olup (25-31), çalışmamızda bu oran %8.8 bulundu.

Cryptococcus neoformans doğal ve klinik kökenlerinin varyete ve serotip açısından incelenmesi sonucu tüm Amerika kıtası değerlendirildiğinde, tüm serotiplere doğal ve klinik olarak rastlanmakla birlikte en yaygın serotip A'dır. Güney Kaliforniya eyaleti ve bazı Güney Amerika ülkelerinde var. *gattii* B ve C serotiplerine, B serotipi daha baskın olmak üzere Amerika'nın diğer bölgelerine oranla daha fazla rastlanmaktadır (32-35). Avrupa'da, Kuzey İtalya, Danimarka dışında en yaygın olan doğal ve klinik serotip var. *neoformans* serotip A olarak bildirilmektedir (32-34, 36-38). Asya kıtasında da en yaygın olan *C. neoformans*, serotip A'dır, ancak coğrafik özelliği nedeniyle serotip B de görülmektedir (33, 39-42). Afrika kıtasından doğal *C. neoformans* izolasyonuna ilişkin çalışmaya rastlanmamıştır, ancak klinik kökenlere ilişkin iki araştırmanın verilerine göre Afrika'da en yaygın serotipin A olduğu görülmektedir, ancak bu kıtada %20'ye varan var. *gattii* özellikle serotip B varlığı dikkate değer bir bulgudur (32, 34). Ökaliptus ağaçları açısından zengin olan Avustralya'da var. *gattii* (serotip B) yaygın olarak bulunmakta ve var. *neoformans*'a hemen hemen eşit sıklıkta kriptokokkoza neden olmaktadır (6, 43). Türkiye'de doğal *C. neoformans* kökenlerinin varyetele-

rinin saptandığı ilk çalışma Yıldırım ve ark. (26) tarafından yapılmıştır. Yazarlar, Türkiye'de 54 ilden topladıkları toplam 634 güvercin dışkısı örneğinin 29'undan (%4.6) *C. neoformans* var. *neoformans* izole etmişler, ancak kökenlerin serotiplerini belirlememişlerdir. Çalışmamızda, Türkiye'de ilk kez doğal ve klinik *C. neoformans* kökenlerinin serotiplendirilmesi yapıldı ve izole edilen sekiz *C. neoformans*'ın beşi (%62.5) serotip D, üçü (%37.5) serotip A olarak saptandı. İncelenen 50 ökaliptus ağacı debrsinden *C. neoformans* var. *gattii* izole edilemedi. Bunun nedeni, örnek sayısının sınırlı olması olabilir. Ancak var. *gattii*'nin izolasyonu kolay değildir. Ellis ve Pfeiffer (6), 2100 ökaliptus debrisi örneğinin ancak ikisinde var. *gattii*, Ergin ve ark. (44) ise 1175 ökaliptus debrisi örneğinin sadece birinde var. *grubii* serotip A izole ettiklerini bildirmektedirler. Ancak ökaliptus türleri, özellikle ilk var. *gattii* izolasyonunun yapıldığı *E. camaldulensis* Türkiye'de de bulunduğundan, gelecekteki çalışmalarda var. *gattii* izolasyonu üzerinde de durulmalıdır.

Amerika Birleşik Devletleri, Güney İtalya ve İspanya'da var. *neoformans* serotip A'nın en yaygın doğal serotip olduğunu gösterilmiştir (33, 36, 37, 40). Bunun yanında Danimarka ve Kuzey İtalya'da ise, en yaygın serotip D olarak saptanmıştır (33). Her iki ülkede incelenen köken sayısının sırasıyla 12 ve 5 gibi düşük olması doğal serotip dağılımı konusunda kesin bir sonuca varılması için yeterli değildir. Bu durum, bu çalışmada saptanan doğal köken serotipleri için de geçerlidir. Ege Bölgesi'nin, Güney İtalya ve İspanya'nın yer aldığı Orta Akdeniz Bölgesi'nin bir parçası olması, bu çalışmada her ne kadar serotip D egemen gibi görülse de, serotip A'nın en yaygın serotip olabileceği kuşkusunu uyandırmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada doğal *C. neoformans* kökenlerinin A ve D serotipinde, klinik kökenlerin ise A serotipinde olduğu ilk kez ortaya konmaktadır. Türkiye'de farklı coğrafi bölgelerde, çok sayıda kökenin incelenmesi ile serotip dağılımı konusunda daha sağlıklı bilgiler elde edilecektir.

KAYNAKLAR

1. Tümbay E. *Cryptococcus neoformans*. Ustaçelebi Ş, ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*'de. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1087-91.
2. Casadevall A, Perfect JR, eds. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1998.
3. Emmons CW. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol* 1951; 62: 685-90.
4. Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon. *Am J Hyg* 1955; 62: 227-32.
5. Littman ML, Schneerson SS. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *Am J Hyg* 1959; 69: 49-59.

6. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* **1990**; 28: 1642-4.
7. Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* **1992**; 30: 407-8.
8. Chen SC, Currie BJ, Campbell HM, et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in northern Australia: existence of an environmental source other than known host eucalypts. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1997**; 91: 547-50.
9. Anđ Ö, Tümbay E, Büget E, Güvener Z. Balgamdan izole edilen *Cryptococcus neoformans* suşu. *İstanbul Tıp Fak Mec* **1973**; 36: 850-5.
10. Söyletir G, Bayk M, Ener B, Göral M. Hairy cell lösemili bir hastada *Cryptococcus neoformans* menenjitli. *İnfek Derg* **1989**; 3: 291-6.
11. Leblebicioğlu H, Saniç A, Günaydin M, Emirler N, Özdemir Ş. Bir *Cryptococcus neoformans* menenjitli olgusu. *Mikrobiyol Bül* **1995**; 29: 203-7.
12. Akıncı E, Öngörü P, Çolpan A, Erbay A, Balaban N, Bodur H. Kriptokok menenjitli bir olgu. *İnfek Derg* **2004**; 18: 539-42.
13. Bergman F. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in Sweden. *Acta Med Scand* **1963**; 174: 651-5.
14. Staib F, Seeliger HPR. Zur Selektivzüchtung von *Cryptococcus neoformans*. *Mykosen* **1968**; 11: 267.
15. Tümbay E. İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve Kriptokokkoz. 1. Kısım: *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarından izolasyonu. TÜBİTAK 6. Bilim Kongresi, Tıp Araştırma Grubu Tebliği (17-21 Ekim 1977, Ankara) kitabında. TÜBİTAK Yayınları No. 429. Ankara: TÜBİTAK, **1979**: 839-66.
16. Kwon-Chung KJ, Polachek I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* **1982**; 15: 535-7.
17. Emmons CW. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Public Health Rep* **1960**; 75: 362-4.
18. Felton FG, Muchmore HG, McCarthy MA. Epidemiology of cryptococcosis: Evaluation of patients' environment. *Health Lab Sci* **1974**; 11: 205-9.
19. Denton JF, Di Salvo EF. The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats. *Sabouraudia* **1968**; 6: 213-17.
20. Halde C, Fracher MA. *Cryptococcus neoformans* in pigeon faeces in San Francisco. *Calif Med* **1966**; 104: 188-90.
21. McDonough ES, Lewis AL, Penn LA. Relationship of *Cryptococcus neoformans* to pigeon in Milwaukee-Wisconsin. *Public Health Rep* **1966**; 81: 1119-26.
22. Mishra SK, Staib F, Folkens U, Fromtling R. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Germany. *J Clin Microbiol* **1981**; 14: 106-7.
23. Partridge BM, Oxon VA, Winner HI, Cantab FC. *Cryptococcus neoformans* in bird droppings in London. *Lancet* **1965**; 15: 1060-1.
24. Hubalek Z, Dvorak J, Kubik V. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon excreta in the South Moravia region. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* **1971**; 20: 212-5.
25. Karaman A, Tümbay E, Demir O. Bursa'da güvercin ve çeşitli kuş dışkı örneklerinde *Cryptococcus neoformans* aranması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **1980**; 10: 31-40.
26. Yıldırım ST, Saraçlı MA, Gonlum A, Gun H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med Mycol* **1998**; 36: 391-4.
27. Yılmaz A, Göral G, Helvacı S, Kılıçturgay K, Gökırmak F. *Cryptococcus neoformans*'ın güvercin dışkılarında dağılımı. *Mikrobiyol Bül* **1989**; 23: 121-6.
28. Sivrel A, Tümbay E. İzmir'de güvercin dışkısından izole edilen *Cryptococcus neoformans* suşları ve bunların amfoterisin B'ye *in-vitro* duyarlılıkları. *İnfek Derg* **1993**; 7: 107-13.
29. Aygün G. İstanbul'da *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarda varlığının araştırılması. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* **1998**; 29: 18-22.
30. Koç AN, Durkut S. Kayseri yöresindeki güvercinliklerde *Cryptococcus neoformans*, diğer medikal önemli üreaz üreten mayaların ve *Histoplasma capsulatum*'un araştırılması. *İnfek Derg* **2001**; 15: 335-40.
31. Tümbay E, Demir O, Önder M. Use of soybean waste-hydrolysate medium in mycology. Part 4: Its use in routine cultures. *KÜKEM Derg* **1985**; 8: 17.
32. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* **1984**; 120: 123-30.
33. Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Howard DH. Epidemiological differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* **1977**; 105: 582-6.
34. Dromer F, Gueho E, Ronin O, Dupont B. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 359-63.
35. Rozenbaum R, Goncalves AJR, Wanke B, et al. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia* **1992**; 119: 133-6.
36. Criseo G, Gallo M. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental and clinical sources in extreme southern Italy (Calabria and Sicily, central Mediterranean area). *Mycoses* **1997**; 40: 95-100.

37. **Baro T, Rodriguez JMT, Morera Y, Alia C, Lopez O, Mendez R.** Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 1170-2.
38. **Tortorano AM, Viviani MA, Rigoni AL, Cogliati M, Roverselli A, Pagano A.** Prevalence of serotype D in *Cryptococcus neoformans* isolates from HIV positive and HIV negative patients in Italy. *Mycoses* **1997**; 40: 297-302.
39. **Hironaga M, Ikeda R, Fukazawa Y, Wanatabe S.** Mating types and serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates in Japan. *Sabouraudia* **1983**; 21: 73-8
40. **Ansheng Li, Nishimuro K, Taguchi H, Tanaka R, Shaoxi Wu, Miyaji M.** The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. *Mycopathologia* **1993**; 124: 1-5.
41. **Padhye AA, Chakrabarti A, Chander J, Kaufman L.** *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in India. *J Med Vet Mycol* **1993**; 31: 165-8.
42. **Ming-Long Hsu M, Chang JC, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M.** Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* isolated in Taiwan. *Mycopathologia* **1994**; 125:77-81.
43. **Pfeiffer TJ, Ellis DH.** Serotypes of Australian environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* . *J Med Vet Mycol* **1992**; 30: 407-8.
44. **Ergin C, Ilkit M, Hilmioglu S, 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**;158:43-7.

İLETİŞİM

Dr. Yaşar KARACA DERİCİ
156 sok. No: 5/13
Bornova, İZMİR
e-posta: yeserka@hotmail.com