

SEDİMENTASYON VE EKÜVYON YÖNTEMLERİ İLE OKALİPTÜS AĞAÇLARINDA *CRYPTOCOCCUS* SPP. VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *CRYPTOCOCCUS* SPP. IN EUCALYPTUS TREES BY USING SEDIMENTATION AND SWABBING METHODS

Aylin ATEŞ¹, Aygül TURAÇ BİÇER¹, Macit İLKİT¹

¹ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Adana. (milkit@cu.edu.tr)

ÖZET

Cryptococcus cinsi maya mantarları yaşamı tehdit eden mikroorganizmalar olup, tüm dünyada hem bağışıklık sistemi sağlıklı hem de baskılanmış insanlarda ve hayvanlarda kriptokokkoz etkenidir. *Cryptococcus* türleri, doğada daha çok güvercin dışkısı ile bulaşlı toprakta, ayrıca okaliptüs ağaçları ve başka ağaç türlerinde bulunur. Bu çalışmada, okaliptüs ağaçlarından klasik sedimentasyon ve eküvyon yöntemleri ile alınan örneklerde *Cryptococcus* spp. varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Haziran 2006 ve Haziran 2007 dönemlerinde Adana ili ve çevresinde bulunan 61 okaliptüs ağacından (%95'inden fazlası *Eucalyptus camaldulensis* türü) alınan örnekler (gövdedeki oyuklar, çiçek ve yaprak), %0.1 ve %0.01 bifenil içeren ve içermeyen üç ayrı kuş tohumu yemli (*Guizotia abyssinica*) besiyerine ekilmiş ve aerob koşullarda, 28°C'de üç hafta süre ile inkübe edilerek nemli, mukoid ve kahverengi maya kolonileri varlığı yönünden değerlendirilmiştir. Ancak çalışmamızda hiçbir örnekten *Cryptococcus* spp. izole edilmemiştir. Sonuç olarak, başka ağaç türleri ve çevresel odaklarda bu maya mantarlarının araştırılması gerektiği ve böylece daha kapsamlı epidemiyolojik verilere ulaşılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Cryptococcus* türleri, ekoloji, eküvyon yöntemi, *Eucalyptus camaldulensis*.

ABSTRACT

Yeasts of the genus *Cryptococcus* are life-threatening microorganisms that cause cryptococcosis in both immunocompromised and immunocompetent humans and animals worldwide. In the nature, *Cryptococcus* species exist in eucalyptus trees and other species of trees as well as in the soil contaminated with pigeon droppings. The aim of this study was to investigate the presence of *Cryptococcus* spp. in the samples collected from eucalyptus trees by classic sedimentation and swabbing methods. Regarding these microorganisms, stem hollows, blossom and leaf samples from 61 trees (more than 95% were *Eucalyptus camaldulensis*) found in and around Adana province (located at Mediterranean region of Turkey) have been examined in June 2006 and June 2007 periods. The samples were then evaluated in terms of the growth of mucoid, dampish and brownish colonies after inoculation onto three media (*Gu-*

izotia abyssinica birdseed agar with 0.1%, 0.01% and without diphenyl) and incubation in aerobic conditions at 28°C for three weeks. However, no *Cryptococcus* spp. has been isolated from any of the samples. It was suggested that other species of trees and environmental samples should be examined for the existence of yeast fungi, so that more extensive epidemiological data could be obtained.

Key words: *Cryptococcus* species, ecology, swabbing method, *Eucalyptus camaldulensis*.

GİRİŞ

Son 20 yılda epidemiyolojisi, ekolojisi ve moleküler biyolojisi daha iyi anlaşılan, serotip ve genotip farklılığının patogenezdaki önemi tartışmaya açılan mikroorganizmalardan birisi de *Cryptococcus neoformans*'dır. Bu maya mantarının rDNA'sına ilişkin IS (Intergenic Spacer) DNA dizi analizi ve AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) genotiplemesi; *C.neoformans* var. *neoformans* (serotip D, AD), *C.neoformans* var. *grubii* (serotip A) ve *C.gattii* (serotip B ve C) şeklinde sınıflandırıldığını göstermiştir^{1,2}. *C.neoformans* var. *grubii* serotip A, tüm dünyada yaygın olup daha çok kanatlı dışkısı ile bulaşlı toprakta bulunur³. Bu varyeteye *Eucalyptus* spp. dışında *Syzygium cumini*, *Ficus religiosa* ve başka ağaç türlerinde rastlandığı bildirilmiştir⁴. Buna karşılık, *C.neoformans* var. *neoformans* serotip D, daha çok Avrupa'da görülür ve insan enfeksiyonlarından sorumludur⁵. Ayrıca bu serotipe, Brezilya'da *E.camaldulensis* ve *E.tereticornis*'de⁶, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde *Quercus alba*'da⁷, ülkemizde ise güvercin dışkısında rastlanmıştır⁸.

Ellis ve Pfeiffer⁹, 1990 yılında önemli bir buluşa imza atmış ve doğal ortamı Avusturalya olan okaliptüs ağaçlarının çiçek, yaprak ve ağaç kabuğu örneklerinde *C.gattii*'ye rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu tür, gerçekte Avustralya'da endemik olup Güney ve Kuzey Amerika, Afrika ve Güneydoğu Asya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde de saptanmış ve daha çok bu bölgelerde bulunan *E.camaldulensis* ve *E.tereticornis*'den izole edilmiştir⁹⁻¹³. Hindistan'da, *C.gattii*'ye *Tamarindus indica*, *Mangifera indica*, *Pithecolobium dulce*, *S.cumini* türü ağaçların gövdelerinde bulunan oyuklarda ve *S.cumini* ağacının kabuğunda; *C.neoformans* var. *grubii*'ye ise *T.indica*, *M.indica*, *Terminalia arjuna*, *Cassia fistula* ve *S.cumini* ağaçlarının debris örnekleri ile yine *S.cumini* ağacının kabuğunda rastlanmıştır⁴. Bu çalışmada ayrıca, çeşitli ağaç türlerinden izole edilen *Cryptococcus* türlerine ilişkin literatür verileri toplu olarak değerlendirmiş; serotip A'nın 10, serotip B'nin 20'nin üzerinde, serotip C'nin ise yalnızca bir ağaç türünden izole edildiği vurgulanmıştır.

Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda okaliptüs ağaçlarında *Cryptococcus* spp. varlığı araştırılmış¹⁴⁻¹⁷ ve bu çevresel odakta maya mantarı saptanmıştır¹⁴. Sunulan bu çalışmada ise, Adana ve çevresindeki okaliptüs ağaçlarının çiçek ve yaprak örneklerinden *Cryptococcus* türlerinin araştırılmasında klasik sedimentasyon yöntemi yanında gövde kısmında bulunan oyuklardan eküvyon yöntemi ile alınan sürüntü örnekleri de değerlendirilmiştir. Aynı ağaçlar bir yıl sonra aynı yöntemlerle yeniden incelenmiş ve elde edilen bulguların tartışmaya açılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Okaliptüs ağaçlarının çiçeklendiği mevsim, çalışma dönemi olarak seçildi. İlk araştırma Haziran 2006'da, aynı ağaçların izlemi ise Haziran 2007'de yapıldı. Çalışmaya, Adana, Çukurova Üniversitesi kampüsünde bulunan 20, Tarsus-Karabucak okaliptoryumundan 28 ve Mersin il merkezinden 13 olmak üzere toplam 61 okaliptüs ağacı (> %95 *E. ca-maldulensis*) alındı.

Ağaçların gövdesinde bulunan 20-40 cm çapındaki oyuklardan eküvyon yardımı ile alınan sürüntü örnekleri gentamisinli (25 mg/l) steril tuzlu su içeren steril tüplere konuldu ve aynı gün içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Tüpler 2 dakika süre ile vortekslendi ve 30 dakika çökelmeye bırakıldı. Çözeltiden 100 µl süpernatant alındı ve her bir örnek %0.1, %0.01 bifenil (Fluka, 14410, İsviçre) içeren ve ayrıca bifenilsiz kuş tohumu yemli besiyerine (*Guizotia abyssinica*) ekildi¹⁸. Çalışmada ayrıca her bir ağaçtan steril kaplara yaklaşık 5-10 g çiçek ve yaprak örnekleri de alındı. Steril tuzlu su ile 1/10 oranında sulandırıldı ve kuvvetli şekilde çalkalandıktan sonra yine 30 dakika bekletildi. Daha sonra, yukarıdaki yöntem ile incelendi. Besiyerleri aerob koşullarda, 28°C'de 3 hafta süre ile inkübe edildi. Süre sonunda nemli, mukoid ve kahverengi maya kolonileri varlığı yönünden değerlendirildi¹⁴⁻¹⁶.

BULGULAR

Çalışmada, okaliptüs ağaçlarının hem oyuklarından alınan sürüntü örneklerinden, hem de çiçek ve yaprak örneklerinden *Cryptococcus* spp. izole edilememiş, her üç besiyerinde de küf mantarlarının ürediği görülmüştür. Kuş tohumu besiyerine bifenil katkısının (%0.1 ve %0.01) bifenilsiz besiyerine göre küf mantarı bulaşını önlemediği belirlenmiştir ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

C.gattii enfeksiyonları, gerek bağışıklık sistemi normal gerekse baskılanmış bireylerde nadiren görülmektedir. Bu durum, bu türe doğada daha ender rastlanması ile açıklanabilmektedir^{4,5}. Bu mantarın (VGII/AFLP6), daha virülan "VGIIa/AFLP6A majör" ile daha az virülan olan "VGIIb/AFLP6B minör" olmak üzere iki genotipi bulunur¹². Kanada'da Vancouver adasında 1999 yılında saptanan ve halen devam etmekte olan salgında (genotip: AFLP6A veya RAPD VGIIa) insan ve hayvan enfeksiyonları yanında farklı çevresel odaklarda (hava, su, toprak, araba lastiği vb.) ve birçok ağaç türünde de *C.gattii*'ye rastlanmıştır¹¹⁻¹³. Bu salgında 100'ün üzerinde insan enfeksiyonu tanımlanmış ve en az altısının ölümle sonlandığı kaydedilmiştir. Ayrıca, Vancouver adasında 1-7 gün süre ile turist olarak bulunan ve *C.gattii* izolasyonu yapılan yedi kişide inkübasyon süresinin 2-11 ay arasında değiştiği (ortalama 6-7 ay) vurgulanmıştır¹⁹.

Avrupa'da da *C.gattii*'nin etken olduğu kriptokokkoz olguları bildirilmiştir²⁰⁻²². İngiltere'de 32 yaşındaki HIV pozitif ve menenjitli bir olguda *C.gattii* saptanmış ve öyküsünden Güney Amerika'da dört yıl süre ile yaşadığı anlaşılmıştır²⁰. Kanada'da Vancouver adasını yedi günlüğüne ziyaret edip ülkesine dönen 51 yaşında, bağışıklık sistemi sağlıklı bir Da-

nimarkalı turistin akciğer biyopsi örneğinden *C.gattii* (AFLP6A) izole edilmiş ve bu türün kıtalar arası geçişi gösterilmiştir²¹. Ayrıca, inkübasyon süresi altı hafta olarak hesaplanmış ve bu durum AFLP6A'nın daha virülan olması ile açıklanmıştır²¹. Bir başka çalışmada ise 33 yaşında ve bağışıklık sistemi sağlam bir Fransız erkeğin beyin omurilik sıvısından *C.gattii* (serotip C, AFLP4) izole edilmiş, hastanın yurt dışına çıkmadığı, askerlik hizmetini 18 yaşında Cibuti'de yaptığı ve o bölgede de okaliptüs ağacının olmadığı bildirilmiştir²². Esasen bu türün Avustralya kaynaklı olduğu düşünülmüşse de²³, AFLP ve MLST (Multi-Locus Sequence Typing) incelemeleri; salgından sorumlu genotipin Güney Amerika kaynaklı olduğunu ve bu izolatların Avustralya ve Asya izolatlarının atasal kökeni olduğunu ortaya koymuştur¹³.

Türkiye'de ilk insan kriptokokkozu 1953 yılında tanımlanmış ve bugüne dek 49 olgu bildirilmiştir. Bu olguların yıllara göre dağılımı irdelendiğinde; 1953-1990 yılları arasında 11 olgu, 1991-2000 arasında 13 olgu (üçü HIV pozitif) ve 2001 yılından sonra ise 25 olgu (yedisi HIV pozitif) bildirilmiştir²⁴. Son yıllarda *Cryptococcus* spp. ile oluşan enfeksiyonlarda görülen belirgin artış, bu maya mantarının çevresel odaklarda araştırılmasını zorunlu kılmıştır. Ülkemizde okaliptüs odaklı ilk çalışmada Batı (n= 476) ve Doğu (n= 699) Akdeniz bölgesinde toplam 1175 okaliptüs ağacına ilişkin debris ve çiçek örnekleri klasik sedimentasyon yöntemi ile incelenmiş ve yalnızca Batı bölgesinden alınan bir örnekte *C.neoformans* var. *grubii* (serotip A) saptanmıştır¹⁴. Yine Tarsus-Karabucak okalip-toryumu içerisinde bulunan arı kovanlarında *C.neoformans* var. *grubii*'nin izole edildiği bildirilmiştir¹⁵. Çukurova Bölgesinde 2005 yılında yaptığımız bir başka çalışmada, 1508 okaliptüs ağacından alınan çiçek ve debris örnekleri yine sedimentasyon yöntemi ile incelenmiş ve *Cryptococcus* spp. saptanmamıştır¹⁶. Sonuç olarak, Adana ve çevresinde yapılan bu üç çalışmada da *C.gattii*'nin varlığı gösterilememiştir. Bu durumun, klasik sedimentasyon yönteminin yetersizliğinden de kaynaklanabileceği düşünülmüş ve bu nedenle sunulan çalışmada eküvyon yöntemi denenmiştir. İzmir ve çevresinde Derici ve Tümbay¹⁷, 50 okaliptüs ağacından alınan yaprak, çiçek ve debris örneğini sedimentasyon yöntemi ile incelemiş ve benzer olarak *Cryptococcus* spp. saptamamışlardır.

Literatürde, *Cryptococcus* spp.'nin araştırılmasında eküvyon yönteminin kolay, çabuk ve etkili olduğu ve başarı ile kullanıldığı vurgulanmıştır^{18,25,26}. Ayrıca, örnek alımı sırasında aerosollerde bulunan *C.neoformans* ve diğer patojen mikroorganizmaların daha az solunduğu ve solunum yolu ile bulaş olasılığının en aza indirildiği, üstelik koloni sayımının da yapılabildiği bildirilmiştir¹⁸. Avustralya'da Vilcins ve arkadaşları²⁷, dokuz ağaç türünü temsil eden 99 ağaç örneğinde klasik sedimentasyon yöntemi ile üreme saptamamış, ancak eküvyon yöntemi ile 3 (%3) örnekte *C.gattii*'ye rastlamışlardır.

Hindistan'da Randhawa ve arkadaşları¹⁸ 40'ı *S.cumini*, ikisi *F.religiosa* olmak üzere toplam 42 ağaç örneğinden *Cryptococcus* spp. izole etmişlerdir. Klasik sedimentasyon yöntemi ile 32 (%76.2), eküvyon yöntemi ile 40 (%95.2) örnekte izolasyon yapılabildiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, klasik yöntem ile saptanan %24'lük yalancı negatiflik oranının, eküvyon yönteminde %5'e düştüğü kaydedilmiştir¹⁸. Çalışmada toplam 33 suş serotiplendirilmiş; *S.cumini*'de 26 *C.gattii* (24 serotip

B, iki tiplendirilemeyen) ve beş *C. neoformans* var. *grubii* (serotip A)'ye rastlanmış, iki *F. religiosa*'da ise serotip A saptanmıştır¹⁸. Connolly ve arkadaşları²⁵, 36 sağlıklı koalanın (*Phascolarctos cinereus*) burun boşluklarında asemptomatik *C. neoformans* taşıyıcılığının araştırılmasında eküvyon (%42) ve burun yıkama suyu (%47) örneklerinin etkinliğini karşılaştırmış ve her iki yöntemin birbirine yakın değerde olduğuna dikkat çekmişlerdir. Yazlar, burun yıkama suyunda saptanan bu görece yüksek izolasyon oranını süpernatan yerine sediment örneğinin kullanılması ile açıklamışlardır²⁵. Yine Hindistan'da Gugnani ve arkadaşları²⁸, çeşitli okaliptüs türlerine ait çiçek (n= 120), ağaç kabuğu (n= 81) ve yaprak (n= 32) örneklerinde klasik sedimentasyon yöntemi ile *Cryptococcus* spp. varlığını araştırmış; yaprak örneklerinde hiç maya mantarı saptamamış, iki *E. tereticornis*'in çiçek örneğinde *C. gattii* ve iki *E. camaldulensis*'in ağaç kabuğu örneğinde *C. neoformans* var. *grubii*'yi belirlemişlerdir. Küba'da Illnait-Zaragozi ve arkadaşları²⁹ okaliptüs ağaçlarında hiç rastlamadıkları *Cryptococcus* türlerini *Terminalia catappa* (n= 60), *Causarina equisetifolia* (n= 30) ve *F. retusa* (n= 30) ağaçlarından eküvyon yöntemi ile elde edilen toplam 250 örnekte araştırmış; 85 (%34) örnekte *C. neoformans* var. *grubii* (75 *T. catappa* ve 10 *C. equisetifolia*) ve 3 (%1.2) örnekte *C. gattii* (*T. catappa*-badem ağacı) saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda, okaliptüs ağaçlarında *Cryptococcus* türlerine rastlanmamış; üstelik bir yıl sonra aynı ağaçlardan yine aynı yöntemlerle alınan örneklerde de bu maya mantarı ürememiştir. Bu durum, çevresel örnekleme yönteminin öneminin yanında, gelecekteki araştırmaların kapsamına farklı ağaç türlerinin de alınması gerektiğine işaret etmektedir. Ülkemizde insan kriptokokkozu 50 yılı aşkın süredir bilinmesine karşılık, bugüne dek hem çevresel hem de klinik örneklerde *C. gattii* saptanmamıştır. Sunulan çalışmada, okaliptüs ağaçlarında örnekleme sırasında klasik sedimentasyon ve eküvyon yöntemlerinin her ikisi de denenmiş, ancak *Cryptococcus* spp. belirlenememiştir. Bu nedenle, farklı ağaç türleri ve çevresel odaklarda bu maya mantarlarının araştırılması gerektiği ve böylece daha kapsamlı epidemiyolojik verilere ulaşılabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. Syst Appl Microbiol 2000; 23: 535-45.
2. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2001; 147: 891-907.
3. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. 1998. ASM Press, Washington DC.
4. Grover N, Nawange SR, Naidu J, Singh SM, Sharma A. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. Mycopathologia 2007; 164: 159-70.
5. Tintelnot K, Schar G, Polak A. Epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland: part of the ECMM survey in Europe. European Confederation of Medical Mycology. Mycoses 2001; 44: 345-50.
6. Medeiros-Ribeiro A, Silva LK, Silveira-Schrank I, Schrank A, Meyer W, Henning-Vainstein M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from eucalypts in South Brazil. Med Mycol 2006; 44: 707-13.
7. Litvintseva AP, Kestenbaum L, Vilgalys R, Mitchell TG. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 2005; 43: 556-64.

8. Saraçlı MA, Yıldırım ŞT, Şener K, et al. Genotyping of Turkish environmental *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolates by pulsed field electrophoresis and mating type. *Mycoses* 2006; 49: 124-9.
9. Ellis D, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-4.
10. Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 407-8.
11. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 17258-63.
12. Meyer W. Genetic complexity of *C. gattii* from S.E. Asia, South and North America. 3rd Trends in Medical Mycology, 28-31 October 2007, Turin, Italy. *J Chemother* 2007; 19 (Suppl 3): 21.
13. Hagen F, Kuramae E, Bovers M, et al. Where is the origin of the *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak? 3rd Trends in Medical Mycology, 28-31 October 2007, Turin, Italy. *J Chemother* 2007; 19 (Suppl 3): 58.
14. Ergin Ç, İlkit M, Hilmioğlu S, et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. *Mycopathologia* 2004; 154: 43-7.
15. Ergin Ç, İlkit M, Kaftanoğlu O. Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Mycoses* 2004; 47: 431-4.
16. İlkit M, Ateş A, Turaç-Biçer A, Yula E. Environmental study of *Cryptococcus neoformans* in and around Adana, Turkey. *Ann Microbiol* 2006; 56: 97-9.
17. Derici YK, Tümbay E. Ege bölgesinde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri, s: 337. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2003, Bodrum. Yeğenoğlu Y, Erturan Z (ed), Tutanaklar. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 46, 2003. İstanbul.
18. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in the tree trunk hollows. *Med Mycol* 2005; 43: 67-71.
19. MacDougall L, Fyfe M. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1851-2.
20. Bodasing N, Seaton RA, Shankland GS, Kennedy D. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in an HIV-positive patient: first observation in the United Kingdom. *J Infect* 2004; 49: 253-5.
21. Lindberg J, Hagen F, Laursen A, Stenderup J, Boekhout T. *Cryptococcus gattii* risk for tourists visiting Vancouver Island, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 178-9.
22. Hagen F, Gari-Toussaint, Boekhout T, Cua E. Fatal *Cryptococcus gatti* infection in a healthy French man. 3rd Trends in Medical Mycology, 28-31 October 2007, Turin, Italy. *J Chemother* 2007; 19 (Suppl 3): 58.
23. Fraser J, Giles SS, Wenink EC, et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 2005; 437: 1360-4.
24. Kantarcıoğlu AS, Yücel A, Cogliati M, et al. Three cases and current epidemiological features of cryptococcosis in Turkey. 3rd Trends in Medical Mycology, 28-31 October 2007, Turin, Italy. *J Chemother* 2007; 19 (Suppl 3): 62-3.
25. Connolly JH, Krockenberger MB, Malik R, Canfield PJ, Wigney DI, Muir DB. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Med Mycol* 1999; 37: 331-8.
26. Krockenberger MB, Canfield PJ, Malik R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C. n.* var. *gattii* and investigation of environmental sources. *Med Mycol* 2002; 40: 263-72.
27. Vilcins I, Krockenberger M, Augus H, Carter D. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountain National Park, Sydney, Australia. *Med Mycol* 2002; 40: 53-60.
28. Guignani HC, Mitchell TG, Litvintseva AP, et al. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of *Eucalyptus* trees in India. *Med Mycol* 2005; 43: 565-9.
29. Illnait-Zaragozi MT, Martínez GF, Fernández CM, et al. First report of *Cryptococcus gattii* environmental isolates in Cuba. 3rd Trends in Medical Mycology, 28-31 October 2007, Turin, Italy. *J Chemother* 2007; 19 (Suppl 3): 55-6.