

Denizli Bölgesinde Kestane (*Castanea sativa*) Ağacından *Cryptococcus neoformans* İzolasyonu

Isolation of *Cryptococcus neoformans* from a Chesnut Tree (*Castanea sativa*), Denizli, Turkey

Mustafa ŞENGÜL¹, Murat KUTLU², Aylin DÖĞEN³, Levent AKSOY¹, Serpil GONCA⁴, Macit İLKİT⁵, Çağrı ERGİN¹

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

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

² Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

² Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Denizli, Turkey.

³ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

⁴ Mersin Üniversitesi, İleri Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin.

⁴ Mersin University, Advanced Technology Education Research and Application Center, Mersin, Turkey.

⁵ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

⁵ Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

* Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje no: 2017HZDP020) desteklenmiş ve çalışmanın sonuçları 20. Uluslararası İnsan ve Hayvan Mikoloji Derneği Kongresi (20th International Society for Human and Animal Mycology-ISHAM, 30 Haziran-4 Temmuz 2018)'nde poster olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Şengül M, Kutlu M, Döğen A, Aksoy L, Gonca S, İlkıt M ve ark. Denizli Bölgesinde Kestane (*Castanea sativa*) Ağacından *Cryptococcus neoformans* İzolasyonu. Mikrobiyol Bul 2019;53(1):61-69

ÖZ

Bazidiomycet bir maya mantarı olan *Cryptococcus neoformans* hayvanlar ve bağışık sistemi baskılı insanlarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Çevresel ortam havasında bulunan aerosolize partiküllerin solunması ile *C. neoformans*/*Cryptococcus gattii* enfeksiyonlarının oluştuğu düşünülmektedir. Bilinen çevresel kolonizasyon odakları; kanatlı çıkartıları, ağaçlar içindeki çürüyen oyuklar ve topraktır. Son yıllarda Anadolu'nun batı bölgelerinde yapılan çevresel taramalarda *Eucalyptus camaldulensis*, *Tamarix hispida*, *Platanus orientalis* ve *Punica granatum* gibi farklı ağaçların odunsu yapılarında *C. neoformans* kolonizasyonu bildirilmiştir. Eldeki verilere göre yapılan tahminler ülkemizin batı bölgelerinde yoğun *Cryptococcus* kolonizasyon odaklarının olabileceğini öngörmektedir. Bu çalışmada, yüksek rakımlı bölgelerde bulunan kestane (*Castanea* spp.) ağaçlarında *C. neoformans* kolonizasyonu varlığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, Aydın-Denizli-Ödemiş bölgesinde bulunan kestane (*Castanea* spp.) ağaçlarında *C. neoformans* kolonizasyonu araştırılmıştır. Çalışma, iki büyük nehir arasında kalan verimli, yüksek rakımlı dağlık arazide yapılmıştır. Bu bölge Anadolu'da yaygın kestane tarımı yapılan bölgeler arasında yer almaktadır. Bu alanda, 2017 yılının yaz aylarında, üzerinde derin yarık veya gövdesinde büyük oyuk bulunan 214 kestane ağacından örnek alınmıştır. Eküvyon tekniği ile alınan örnekler bifenil ve antibiyotik içeren Staib agar besiyerine ekim yapılmıştır. Kültürler on gün süre ile kahverengi koloni kontrolü yapılarak takip edilmiştir. Patojen *Cryptococcus* izolatlarını tanımlamak için şüpheli koloniler konvansiyonel yöntemler ve kanavanin glisin bromtimol agar reaksiyonu ile incelenmiştir. İzolatın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tanısı için ITS 1-4 primerleri kullanılmıştır. Bu amaçla, STE20 (Aa), STE20 (Aα), STE20 (Da) ve STE20 (Dα) primerlerini içeren STE20 PCR

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Çağrı Ergin, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 258 296 2491, **E-posta (E-mail):** cagri@pau.edu.tr

paneli ile serotip ve eşeyli şekil saptanmıştır. V8 agar besiyeri eşeyli çaprazlama kültürleri için kullanılmıştır. Çalışmada incelenen 214 ağacın yalnızca bir tanesinde (%0.47) *C. neoformans* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolat ITS 1-4 dizi analizi ile doğrulanmıştır. İzolatın A serotipinde MAT α şeklinde olduğu saptanmıştır. V8 agarda MAT α yapısına ait bazidiyum, bazidiosporlar ve hif yapılarındaki kelepçe "klamp" bağlantıları görülmüştür. Bu çalışmada, Denizli'de Anadolu kestane (*Castanea sativa*) ağacından *C. neoformans*'ın ilk defa izolasyonu gösterilmiştir. İnsan patojeni kriptokokların çevresel dağılımı ile yapılacak ileri araştırmalar, bölgemizdeki canlılarda risk oluşturan alanların saptanmasında yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Cryptococcus neoformans*; *Castanea sativa*; çevresel.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a basidiomycetous encapsulated yeast that can cause life-threatening infections in immunosuppressed humans and animals. *C. neoformans*/*Cryptococcus gattii* infections are considered to be acquired via inhalation of aerosolized particles from the environment. Avian guano, decaying tree hollows and soil are known as environmental niches. In recent years, colonization of the woody structures of different trees such as *Eucalyptus camaldulensis*, *Tamarix hispida*, *Platanus orientalis* and *Punica granatum* has been reported in the environmental study of the western Anatolian region. Based on the results of previous studies, our country may have intensive *Cryptococcus* colonization niches in the western regions. The aim of this study was to investigate the presence of the colonization of *C. neoformans* niche in chestnut (*Castanea* spp.) trees on higher altitudes. In the study, the colonization of *C. neoformans* was screened on chestnut trees (*Castanea* spp.) in Aydın-Ödemiş-Denizli geographical area. This area consists of mountainous terrain between the fertile plain formed by two major rivers. This region is one of the widespread areas of chestnut farming in Anatolia. Two hundred and fourteen chestnut trees that had deep fissures or trunk hollows were screened during mid-summer 2017. A swabbing technique was used, and all samples were cultured on Staib agar medium containing biphenyl and antibiotics. Cultures were checked for ten days for suspicious brown colonies. Suspicious yeast colonies were tested for the identification of pathogenic *Cryptococcus* by conventional methods and canavanine-glycine-bromothymol agar reactions. ITS 1-4 primers were used for strain PCR tests. We determined the mating type and serotypes by PCR analysis of the STE20 genes using STE20 (Aa), STE20 (A α), STE20 (Da), and STE20 (D α) primers. V8 agar medium was used for mating cultivation. Only one (0.47%) strain of *C. neoformans* was isolated from 214 screened trees. This strain was confirmed by ITS 1-4 sequencing. The serotype A MAT α mating type was observed. Basidium, basidiospores and clamp connections in hyphal structure were noted with MAT α mating on V8 agar medium. In this study, the first *C. neoformans* isolate from a chestnut tree (*Castanea sativa*) was determined from Denizli region. Further studies of distribution of human pathogenic *Cryptococcus* will be helpful to determine the risk areas for the living organisms in our region.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; *Castanea sativa*; environmental.

GİRİŞ

Cryptococcus neoformans ve *Cryptococcus gattii* özellikle bağışık sistemi baskılanmış konaklarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilen bazidiomycet maya mantarları grubunda yer almaktadırlar. Çoğunlukla odun flora ve kanatlı çıkartılarında kolonize olmakta ve çevresel ortamlarda çoğalmaktadırlar. Kolonize oldukları çevresel ortamlarda basidiosporların ve zor şartlarda bile yaşama özelliği bulunan maya hücrelerinin inhalasyon havasına karışması ile insanlara bulaşmaktadırlar¹⁻⁴. Moleküler araştırmalar insan kriptokokkozunun en önemli kaynağının mayaların kolonize olduğu çevresel ortamlar olduğunu göstermektedir^{5,6}.

Ülkemizde çevresel ortamlardaki kanatlı çıkartılarından 1974'ten beri *C. neoformans* izolasyonları yapılmaktadır⁷⁻¹⁰. Ağaç florasından yapılan izolasyonlar ise 2004'ten günümüze kadar, flora farklılıklarını da içerecek şekilde bildirilmektedir¹¹⁻¹⁵. Ağaç florasından yapılan araştırmaların çoğunluğu primer odakların bulunması ve mayanın biyolojisi ile

Örnek Alımı ve Mikrobiyolojik Tanı

İçerisinde taşıma ortamı (%0.4 kloramfenikol içeren steril edilmiş %0.9 NaCl) bulunan steril eküvyonlar örnek alımında kullanıldı. Taşıma ortamı ile ıslatılan eküvyon, ağaç kovuğunun ve/veya derin yarıklarının farklı bölgelerine sürüldü ve örnekler steril tüp içine aktarıldı. Alınan örnekler aynı gün içinde laboratuvara ulaştırıldı. Eküvyonu çıkarılan örnekleme tüpü, bir dakika süreyle vortekslenildi ve çökme işlemi için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Sıvı yüzeyinden 100 µl alınarak %0.1 bifenil ve %0.5 kloramfenikol içeren Staib agara ekildi. Nemli ortamda, 28°C'de 15 gün süreyle inkübasyona devam edildi ve günün başı üreme kontrolü yapıldı. Staib agarda; kahverengi pigment oluşturan kolonilerin üreaz aktivitesi, 37°C'de üreyebilme ve Dalmau agarda yapısal özellikleri incelendi. Üreaz pozitif, 37°C'de üreyebilen ve hif oluşturmeyen kolonilerin kanavanin-glisin-bromtimol agar besiyerinde üremesi gözlemlendi. Bu besiyerinde üreyemeyen koloniler, *C.neoformans* kabul edilerek moleküler amplifikasyon ve V8 agarda eşeyli çaprazlama yöntemleri kullanılarak ileri tanımla yapıldı. Çalışmada kontrol olarak *C.neoformans* KN99 Aa ve *C.neoformans* KN99 Aα standart suşları kullanıldı.

Moleküler Yöntemlerle Tanı

İzole edilen koloninin ve standart *C.neoformans* suşlarının [JEC 20 (VNIV-Da), JEC 21 (VNIV-Da), KN99 Aa ve KN99 Aα] genomik DNA ekstraksiyonu Turin ve arkadaşları²² tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirildi. ITS 1-4 primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu, toplam hacim 25 µl olacak şekilde [12.5 µl 2X karışım (Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix, Odense, Danimarka); 0.5 µl her bir primerden (100 pmol/µl), 10.5 µl distile su ve 1 µl kalıp DNA] gerçekleştirildi (Tablo I). Isı döngü cihazı (Techne Prime, Birleşik Krallık)'nda, PCR amplifikasyonu 95°C'te 5 dakika ilk denatürasyonu takiben, 35 döngü 95°C'te 45 saniye denatürasyon, 57°C'te 60 saniye primer birleşmesi, 72°C'te 60 saniye çoğaltma ve 72°C'de 5 dakika son uzama olarak optimize edildi. PCR amplifi-

Tablo I. Araştırmada Kullanılan *Cryptococcus neoformans* Primerleri

	Primer adı	Nükleotid dizileri (5'-3')	Size (bp)
ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	STE20_Aa_Forward	CTA ACT CTA CTA CAC CTC ACG GCA	457
	STE20_Aa_Reverse	CGC ACT GCA AAA TAG ATA AGT CTG	
	STE20_Aα_Forward	GGC TGC AAT CAC AGC ACC TTA C	330
	STE20_Aα_Reverse	CTT CAT GAC ATC ACT CCC CTA T	
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	STE20_Da_Forward	CAC ATC TCA GAT GCC ATT TTA CCA	728
	STE20_Da_Reverse	AGC TCT AAG TCA TAT GGG TTA TAT	
	STE20_Dα_Forward	CTT AAT TCA CAG CAC CAG CCT A	592
	STE20_Dα_Reverse	GGT CAT CAC AGT CAG TCA CCA C	

kasyonu sonrasında elektroforez ile %1.2'lik agaroz jelde 120 voltta 30 dakika yürütülen örnekler jel görüntüleme cihazında incelendi. Hedeflenen bölgede bant gözlenen PCR örnekleri saflaştırıldıktan sonra, RefGen Biyoteknoloji ve Araştırma Merkezi'nde (ODTÜ, Ankara) dizi analizi ile doğrulandı.

Eşeyli tipin saptanması amacıyla; JEC 20 (VNIV-Da), JEC 21 (VNIV-Da), KN99Aa, KN99Aa ve test edilen izolatın genomik DNA ekstraksiyonu, STE20 Aa, STE20 Aa, STE20 Da, STE20 Da primerleri (Tablo I) kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. STE20 Aa, STE20 Aa, STE20 Da primerleri ile yapılan amplifikasyonda, 95°C'te 6 dakika ilk denatürasyon sonrası, 36 döngü 95°C'te 45 saniye denatürasyon, 60°C'te 45 saniye primer birleşmesi, 72°C'te 1.5 dakika çoğaltma ve takiben 72°C'de 7 dakika son uzama gerçekleştirildi. STE20 Da primeri ile yapılan amplifikasyon 95°C'te 6 dakika ilk denatürasyon sonrası, 30 döngü 95°C'te 45 saniye denatürasyon, 50°C'te 45 saniye primer birleşmesi, 72°C'te 1.5 dakika çoğaltma ve takiben 72°C'de 7 dakika son uzama olmak üzere ısı döngü cihazında gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PCR ürünleri elektroforez ile %1.4'lük agaroz jelde 120 voltta 60 dakika yürütülerek jel görüntüleme cihazında incelendi.

Eşey çaprazlama testinde; izolat *C.neoformans* KN99 Aa ve *C.neoformans* KN99 Aa suşları ile V8 agar [%5 V8 (Campbell's, Kanada), 3 mM KH₂PO₄, %4 agar; 1 N KOH ile pH= 5.5 ayarlandı] besiyerinde çaprazlanarak eşeyli üreme için karanlıkta, 25°C'te dört hafta süre ile inkübasyona bırakıldı²³. Süre sonunda, kontrol ve çaprazlama ekimleri, ışık mikroskopunda hif yapıları ve basidiyum/basidiyospor varlığı yönünden değerlendirildi.

BULGULAR

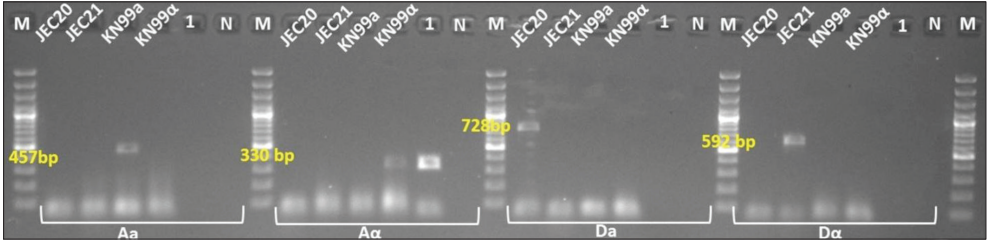
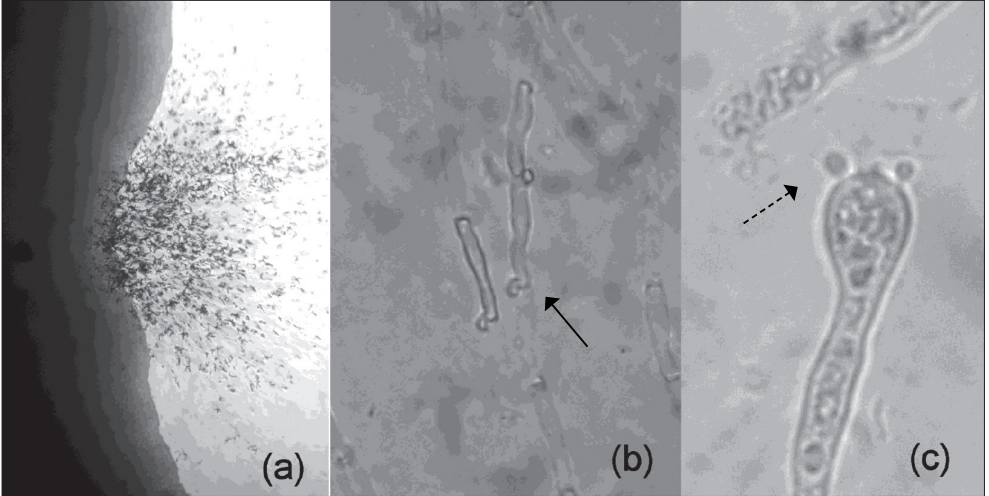
Çalışmaya alınan dört bölgedeki toplam 224 ağaçtan toplanan örneklerin yalnızca birinde *C.neoformans* üremesi saptanmıştır. Mayanın izole edildiği bölgenin Denizli İsrail Deresi civarı olduğu belirlenmiştir (Şekil 1, Tablo II). İzolatın A serotipinde ve MAT α genotipinde olduğu saptanmıştır (Şekil 2). V8 agarda yapılan eşeyli çaprazlama kültüründe filamentöz yapı oluşumunda dikaryotik "klamp" bağlantısı ve basidiyospor bulunduran terminal basidiyum görüntüsü KN99 Aa ile elde edilerek test izolatının MAT α olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3).

TARTIŞMA

Farklı çevresel ortamlarda kolonize olabilen *C.neoformans*'ın ekolojisine ilişkin bilgileri-miz henüz yeterli değildir. Bu mayanın bulunduğu odunsu yapılar ile birlikte çevrenin iklimsel özelliklerinin mayanın dağılımında önemli rol oynadığı da kabul edilmektedir. Daha soğuk iklimlere ve yazları daha yüksek neme uyum sağlamasından dolayı *C.neoformans*'ın *C.gattii*'ye göre, Akdeniz ülkelerinde daha yaygın olarak bulunduğu öne sürülmektedir. *C.neoformans*'ın dağılımı ile ilgili Cogliati ve arkadaşlarının²⁴ Akdeniz havzasında yürüttüğü geniş katılımlı bir araştırma ve buna bağlı iklimsel tür dağılım modellemesinde¹⁷, ülkemizin de içinde bulunduğu riskli bölgeler belirlenmeye çalışılmıştır. Yağışlı dönemlerde bu mikroorganizmaların ortamda hayatlarını sürdürebilme yeteneklerinin farklılığı, anahtar

Tablo II. Kestane Ağaçlarından Örnekleme Yapılan Bölgeler

Bölge	Örnek sayısı	Pozitif
I (Aydın)		
Hamamköy		-
Menteşeler	74	-
Cumayanı		-
II (Aydın)		
Apaklar		-
Ovacık	54	-
Yukanörencik		-
Aşağıörencik		-
III (Denizli)	36	-
Alandız		-
IV (Denizli)	50	1
İsrafil Deresi		1
Toplam	214	1

**Şekil 2.** Polimeraz zincir reaksiyonları: JEC20 (Da); JEC21 (Dα); KN99a (Aα); KN99α (Aα); Test örneği (1); Negatif kontrol (N); Marker (M).**Şekil 3.** (a) V8 agar eşeyli çaprazlama kültüründe filamentöz yapı oluşumu, (b) Hif dikaryotik "klamp" bağlantısı (Düz ok), (c) Basidiyospor (kesikli ok) bulunduran terminal basidiyum görüntüsü.

rol oynayan bir faktör olarak belirtilmiştir. Benzer şekilde bağıl nemin yüksek olduğu dönemlerde, ortamda bulunan mikrobiyotanın değişkenliğine de bağlı olarak, *C. neoformans* çevresel ortamlardan daha yüksek oranda izole edilmektedir^{25,26}. Sunulan araştırmanın yapıldığı bölge, Köppen-Geiger iklim sınıflamasına göre "CSA" (kış ılık, yazı çok sıcak ve kurak iklim (Akdeniz iklimi), $T_{sıcak} \geq 22^{\circ}\text{C}$) sınıfında yer almaktadır²⁷. Ülkemizde kestane tarımı genellikle 10°C üstünde ve yıllık yağışın 1000 mm^3 'ün altına düşmediği bölgelerde yapılmaktadır²⁰. Kestanenin daha soğuk iklimlerde yetiştirilebilir olması, sunulan araştırmada da elde edilen veriye uygun olarak, *C. neoformans* kolonizasyonu için uygun bir mikroklima ortamı sağlayacağını düşündürmektedir. Kestanenin ılıman iklim bölgesi ağacı olması ve kurak geçen mevsimlerin bitkiye zarar vermesinden dolayı, kestane yetişen Anadolu bölgelerinde floranın taranması, *C. neoformans*'ın ekolojisinin anlaşılmasında önemli bir çevresel yanıt olabilir. Bununla birlikte, Akdeniz havzasındaki patojen çevresel kriptokokların dağılımını inceleyen bir araştırmada 46 *C. sativa* ağacından örnek alınmış, ancak üreme saptanmamıştır²⁴. Bu durum, yapılan araştırmaların çoğunlukla iklim farklılıkları gösteren deniz seviyesi kısmında yürütülmesi, yoğun kestane tarımı yapılan yerlerin ise daha iç ve ormanlık bölgelerde bulunması nedeniyle olabilir. Cogliati ve arkadaşlarının¹⁷ Akdeniz havzasında muhtemel çevresel odakların yaygınlığını inceledikleri çalışmada, özellikle Marmara Bölgesi iç kısımlarında, kıyı bölgelere göre daha yüksek oranda *C. neoformans* var. *neoformans* görülme olasılığının yüksek olabileceği belirlenmiştir. Cogliati ve arkadaşları¹⁷ ile Acherson ve arkadaşlarının¹⁸ yaptıkları çalışmalarda *C. gattii* varlığının ise daha ılıman olan Ege ve Güney Anadolu coğrafyasında olabileceği bildirilmiştir.

Araştırmada saptanan izolat, MAT α eşeyli formunda olup, bu formun ülkemizde baskın olduğu önceki çalışmalar ile de gösterilmiştir²⁸. Dünya üzerinde de en baskın olan form α alel tipidir²⁹. Yapılan araştırmalarda MAT lokusundaki farklılıkların saptanmasının, *C. neoformans*'ın ekolojisi ve virölansı ile bağlantısının aydınlatılmasında önemli olduğu belirtilmektedir³⁰. Çaprazlama testlerinde de izolat KN99 Aa ile eşeyli şekil oluşturmuştur. V8 agar, Escandón ve arkadaşlarının²³ tanımladığına göre hazırlanmış ve pH= 5.5 olarak ayarlanmıştır. Bu ortamda da bazidiyum, bazidiyospor ve kelepçe "klamp" bağlantıları gösterilmiştir (Resim 3). Yapılan çalışmalarda eşeyli şeklin saptanması önemlidir. Konuyla ilgili laboratuvarlarda kullanılan V8 agar pratik, ucuz ve değerlendirmesi kolay bir besiyeri olarak tanıya yardımcı olmaktadır.

Ülkemizde okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis*), ılgın (*Tamarix hispida*), doğu çınarı (*Platanus orientalis*), nar (*Punica granatum*) ve çam ağaçlarında *C. neoformans* izolasyonu daha önceki araştırmalar ile bildirilmiştir¹¹⁻¹⁵. Yapılan araştırmalar ve coğrafi analizler gözönüne alındığında, Marmara, Ege ve Çukurova (ve kısmen Doğu Karadeniz) bölgelerinde insan ve hayvan patojeni bu maya mantarının araştırılması ve yüksek kolonizasyon bölgelerinin saptanması mümkündür^{17,18}. Planlanarak yapılacak yeni araştırmalar hem mayanın ekolojisinin anlaşılmasına yardımcı olacak, hem de dünyada yoğun şekilde gerçekleştirilen çevresel kriptokok taramalarına önemli katkı sağlayacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The case for adopting the "species complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere* 2017;2(1):e00357-16.
2. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 2006;60:69-105.
3. Springer DJ, Saini D, Byrnes EJ, Heitman J, Frothingham R. Development of an aerosol model of *Cryptococcus* reveals humidity as an important factor affecting the viability of *Cryptococcus* during aerosolization. *PLOS One* 2013;8(7):e69804.
4. May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(2):106-17.
5. Chen Y, Litvintseva AP, Frazzitta AE, Haverkamp MR, Wang L, Fang C, et al. Comparative analyses of clinical and environmental populations of *Cryptococcus neoformans* in Botswana. *Mol Ecol* 2015;24(14):3559-71.
6. Kangogo M, Bader O, Boga H, Wanyoike W, Folba C, Worasilchai N, et al. Molecular types of *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses* 2015;58(11):665-70.
7. Tümbay E. İzmir yöresinde *Cryptococcus neoformans* ve kriptokokkoz. Birinci kısım: *Cryptococcus neoformans*'ın doğal kaynaklarından izolasyonu. TÜBİTAK 6'ncı Bilim Kongresi, 17-21 Ekim 1977, Ankara. Tıp Araştırma Grubu Tebliği Tutanağı, s:839-63.
8. Yıldırım ŞT, Saraçlı MA, Gönülüm A, Gün H. Isolation *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med Mycol* 1998;36(6):391-4.
9. Karaca Derici Y, Tümbay E. İzmir ilinde doğal ve klinik *Cryptococcus neoformans* kökenlerinin varyete ve serotipleri. *İnfek Derg* 2008;22(1):53-8.
10. Pelek Ş, Altınkaya S, Korkmaz UB, Ergin Ç. Denizli şehir merkezinde güvercin (*Columba livia*) çıkartılarında *Cryptococcus neoformans* varlığının araştırılması. *Pam Tıp Derg* 2011;4(1):21-4.
11. Ergin C, İlkut M, Hilmioğlu S, Gülbaba AG, Demirci M, Kaya S. 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.
12. Ergin C, Kaleli I. Denizli şehir merkezinde kovuklu ağaç gövdelerinden *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2010;44(1):79-85.
13. Ergin Ç, Şengül M, Kiriş Satılmış Ö. Türkiye'nin Güney-Batı Anadolu bölgesindeki ilgin (Genus: *Tamarix* L.) ağaçlarında *Cryptococcus neoformans* kolonizasyonu takibi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2014;44(4):158-62.
14. Gökçen H, Ergin Ç. Muğla-Milas ilçe yerleşimi bölgesi *Eucalyptus camaldulensis* ağaçlarından *Cryptococcus neoformans* izolasyonu. *Pam Tıp Derg* 2014;7(2):109-12.
15. 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.
16. Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Preeti Sinha K, Khan ZU, Sun S, et al. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. *Med Mycol* 2008;46(8):823-33.
17. 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.

18. 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.
19. Khayhan K, Hagen F, Norkaew T, Puengchan T, Boekhout T, Sriburee P. Isolation of *Cryptococcus gattii* from a *Castanopsis argyrophylla* tree hollow (Mai-Kaw), Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia* 2017;182(3-4):365-70.
20. Karadeniz V. Türkiye’de kestane tarımı ve başlıca sorunları. *Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi* 2013;6(27):279-91.
21. Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. *Med Mycol* 2005;43(1):67-71.
22. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur J Clin Invest* 2000;30(6):511-8.
23. Escandón P, Ngamskulrungron P, Meyer W, Castañeda E. In vitro mating of Colombian isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Biomedica* 2007;27(2):308-14.
24. Cogliati M, D’Amicis R, Zani A, Montagna MT, Caggiano G, De Giglio O, et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C.gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Res* 2016;16(4).
25. Granados DP, Castañeda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol* 2005;49(2):282-90.
26. Vélez N, Escandón P. Distribution and association between environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Bogota Colombia, 2012-2015. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016;111(10):642-8.
27. Öztürk MZ, Çetinkaya G, Aydın S. Köppen-Geiger iklim sınıflandırmasına göre Türkiye’nin iklim tipleri. *Cografya Dergisi* 2017;35:17-27.
28. Saraçlı MA, Yıldırım ŞT, Şener K, Gonlum A, Doganci 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.
29. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 1978;108(4):337-40.
30. Fu C, Sun S, Billmyre RB, Roach KC, Heitman J. Unisexual versus bisexual mating in *Cryptococcus neoformans*: Consequences and biological impacts. *Fungal Genet Biol* 2015;78:65-75.