

Molecular Characterization of Clinical and Environmental Strains of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Busan, Korea

Soo Myung Hwang*

Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan, Korea

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast that can cause life-threatening infections in immunocompromised patients. In this study, the genetic variability and epidemiological relationships of clinical and environmental isolates of *C. neoformans* from Busan, Korea, 2000~2005 were investigated. A total of 12 strains of *C. neoformans*, 7 clinical and 5 environmental isolates were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) using three different primers and PCR-fingerprinting with a minisatellite-specific core sequence of phage M13. All strains belonged to *C. neoformans* serotype A and mating type *MATa*. Two different RAPD profiles (I and II) and a single pattern by M13 PCR-fingerprinting were identified. The major RAPD profile was pattern I (8 of 12 strains) and pattern II was identified from 2 clinical and 2 environmental strains, which clearly distinguished among isolates. Clinical strains with pattern II were isolated from the patients with HIV positive. Taken together, molecular patterns provide a good characterization of strains of *C. neoformans* as a heterogeneous group and epidemiological relationships in clinical and environmental strains.

Key Words: *Cryptococcus neoformans*, Random amplified polymorphic DNA, PCR-fingerprinting

서 론

*Cryptococcus neoformans*는 협막을 보유한 basidiomycetes 효모양 진균으로 사람과 동물의 폐, 중추신경계 및 전신에 침범하여 생명을 위협하는 cryptococcosis를 일으킨다 (1).

최근 연구에 의하면 *C. neoformans*는 다당체 협막성분의 항원성과 생태학적, 분자생물학적 특성 차이에 의하여 *C. neoformans* (혈청형 A, D 및 AD)와 *C. gattii* (혈청형 B와 C)의 두 종 (species)으로 재분류되었으며, *C. neoformans*는 두 변이종 var. *grubii* (혈청형 A)와 var. *neoformans* (혈청형 D) 그리고 hybrid 형 AD로 나누어진 다 (2, 3). *C. neoformans* 혈청형 A와 D는 전 세계적으로

널리 분포되어 있으며, 특히 비둘기 배설물을 비롯하여 조류 분변에 오염된 토양, 그리고 썩은 나무 등이 이 균 종의 자연 서식처로 잘 알려져 있다 (4, 5). AIDS 환자를 비롯하여 면역기능에 장애가 있는 환자에서 주로 기회감염의 원인균이며, 인체감염의 대부분은 *C. neoformans* var. *grubii* (혈청형 A)이다. 이에 비교하여 *C. gattii* (혈청형 B와 C)는 열대와 아열대 지역에서만 제한적으로 분리되며, 자연 서식처는 오스트레일리아 원산 *Eucalyptus* 나무로 알려져 있으며 (6~8), 일부 열대 지역을 제외하고 AIDS 환자에서 *C. gattii*에 의한 감염증은 거의 없는 것으로 보고되고 있다 (9, 10). *Cryptococcus species*의 인체감염은 자연환경에서 basidiospore를 흡입함으로써 감염되는 것으로 알려져 있으나, 생태학적, 역학적 관련성은 여전히 의문으로 남아있다 (11).

*C. neoformans*는 heterothallic basidiomycetes로 두 종류의 mating type *MATa*와 *MATa*가 존재한다. 일반적으로 환경이나 임상검체에서 분리되는 *C. neoformans* mating type은 *MATa*가 대부분이며, 드물게 *MATa/a*인 diploid 균주도 분리된다 (1, 12).

Received: May 10, 2010/ Revised: May 26, 2010

Accepted: May 28, 2010

*Corresponding author: Soo Myung Hwang. Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea.
Phone: +82-51-0563, Fax: +82-51-510-0568
e-mail: smhwang@cup.ac.kr

전 세계적으로 *C. neoformans*에 관한 분자역학적인 연구방법으로 M13 primer 및 (GACA)₄ 반복서열에 의한 PCR fingerprint 분석법 (13, 14), amplified fragment length polymorphisms (15), rDNA intergenic space regions I과 II 분석 (16), multilocus gene sequence typing (MLST) 등이 (17, 18) 이용되고 있으며, 이들 분석법에 의하여 8가지의 주요 유전자형이 알려져 있다. 우리나라에서는 *Cryptococcus* 균종의 분리율이 저조하며, 이 균종에 관한 몇몇 의학적인 보고만 있을 뿐, 생태적 특성을 비롯하여 역학 연구는 거의 없는 실정이다 (19, 20). 본 연구에서는 2000년에서 2005년 사이에 부산지역 임상검체와 환경에서 분리된 환경균주, 특히 비둘기 분변에서 분리된 *C. neoformans* 균주를 이용하여, 이들의 혈청형, mating type, random amplified polymorphic DNA (RAPD)와 M13 PCR fingerprint 법에 의한 분자생물학적 특성을 분석하여 비교함으로써 지역에서 분리된 *C. neoformans*의 생태학적, 역학적 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

부산지역 종합병원 4곳에서 2000년에서 2005년 사이 분리된 임상균주 7주와 2002년 비둘기 분변에서 분리된 환경균주 5주를 포함한 총 12균주를 사용하였다 (Table 1).

임상검체에서 분리된 7주는 각 병원 미생물 검사실에서 *C. neoformans*로 동정된 균주으로써, 목집염색에 의한 협막관찰, API 20C AUX system (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)을 이용한 당 동화시험과 Christensen's urea broth (Difco, Detroit, MI, USA)를 이용한 urease 시험 양성, nitrate 환원시험 음성, 37°C 성장능 양성인지를 재확인하였고, bird seed media (BSM)에서 phenol oxidase 생성에 의한 갈색집락을 확인하여 동정하였다 (19).

환경균주는 Oh 등 (20)에 의하여 2002년 부산시내 비둘기 서식처 12곳의 비둘기 분변으로부터 분리된 *C. neoformans* 균주를 사용하였으며, 균주 분리방법을 간단히 소개하면 다음과 같다. 매우 건조된 비둘기 동지에서 얻은 약 2.0 g의 비둘기 분변에 10 ml의 멸균식염수를 가하고, 용액이 균질해질 수 있도록 20분간 진탕한 후 1500 ×g에서 5분간 원침하였다. 상층액 100 µl를 균일하게 BSM에 접종하고, 30°C에서 2~10일간 배양한 후에, 균주의 phenol oxidase 활성의 결과로 나타나는 멜라닌 색소생성, 즉 갈색집락만을 취하여 Sabouraud dextrose agar (SDA)로 옮긴 다음 다시 재배양한 후에 임상분리균주와 동일한 방법에 의하여 최종 동정하였다.

혈청형과 변종확인시험

C. neoformans 변종의 확인은 협막성 다당체 항혈청을 이용한 혈청형 분석과 두 가지 생화학적 반응시험을 실

Table 1. Sources, serotypes, and mating types of *C. neoformans* isolates in Busan, Korea

No.	Strain	Type of isolates	Source	Year of isolation	Serotype	Mating type
1	C21	^a C	CSF	2000	A	<i>a</i>
2	C22	C	CSF	2001	A	<i>a</i>
3	C28	C	Blood	2002	A	<i>a</i>
4	C36	C	Blood	2003	A	<i>a</i>
5	C40	C	^c CSF	2003	A	<i>a</i>
6	C41	C	Blood	2005	A	<i>a</i>
7	C58	C	CSF	2004	A	<i>a</i>
8	C23	^b E	Pigeon excreta	2002	A	<i>a</i>
9	C24	E	Pigeon excreta	2002	A	<i>a</i>
10	C25	E	Pigeon excreta	2002	A	<i>a</i>
11	C26	E	Pigeon excreta	2002	A	<i>a</i>
12	C27	E	Pigeon excreta	2002	A	<i>a</i>

^a C; clinical source, ^b E; environmental source, ^c CSF; cerebrospinal fluid

시하여 결정하였다. 혈청형의 감별은 협막성 다당체 항원을 확인하는 slide agglutination test (Crypto Check Iatron RM 304-K kit; Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 분리균주들은 30℃에서 yeast extract malt extract agar (YMA, Difco)에 배양하였고, 48시간 후에 McFarland scale pattern 2 (약 6×10^8 CFU/ml)에 맞춰 멸균식염수에 부유하였다. 각 항혈청 5종 (F1, F5, F6, F7, F8) 한 방울씩을 agglutination glass slide에 먼저 떨어뜨리고, 각 항혈청 당 50 µl의 *C. neoformans* 부유액을 떨어뜨려 혼합하였다. 혼합액이 균질화될 수 있도록 2분간 교반하면서 슬라이드에서 작은 응집이 생기는 것을 직접 관찰하여 다음과 같이 판정하였다.: 혈청형 A는 F1과 F7에 응집, 혈청형 B는 F1과 F5에 응집, 혈청형 C는 F1과 F6에 응집, 혈청형 D는 F1과 F8에 응집 그리고 혈청형 AD는 F1, F7, F8에 응집을 확인하여 결정하였다.

변종확인 생화학적 검사법으로, 첫 번째 시험은 canavanine-glycine-bromthymol blue (CGB)배지에서 glycine을 탄소원으로 이용할 수 있는 glycine decarboxylase의 생성유무에 성장능을 관찰하는 것으로, 최종 동정된 균주들을 CGB 배지에 접종하고 30℃에서 24~48시간 배양한 다음, CGB 배지의 색깔이 원래 배지의 색깔인 녹색에서 청색으로 색깔 변화를 보이면 양성으로 판정하였다 (21). 두 번째 시험은 Kwon 등 (22)의 EDTA를 이용한 urease 억제 시험법으로, 최종 동정된 균주들을 yeast extract-glucose-peptone agar (YEPG)에 100 µM EDTA를 첨가한 배지인 YEPGE에 접종하고 30℃에서 48시간 배양한 후, 자란 집락을 멸균 증류수 2 ml에 spectrophotometer (Jasco Co., Ishiawa-cho, Japan)를 이용하여 흡광도 (A_{600}) 0.8~1.0이 되도록 맞춘 다음 (균주 수, 약 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ /ml), 진탕 혼합한 뒤 혼합액 1 ml를 취해 rapid urea broth (RUH broth, Difco)를 2배 되도록 분주한 뒤 ice bath에서 적당 시간 방치하였다. 다시 이 RUH broth를 37℃ shaking water bath에 넣고 매 시간 마다 자홍색 (magenta red color)이 나타나면 음성, 그리고 황색 (yellow color)이 나타나면 양성으로 판정하였다.

위 두 가지 시험 모두에 양성이면 *C. gattii* (혈청형 B 또는 C)이며, 모두 음성이면 *C. neoformans* var. *grubii* 또는 var. *neoformans* (혈청형 A, D 또는 AD hybrid)로 변종을 확인하였다.

DNA 분리 및 mating typing

균주의 genomic DNA는 Yamamoto (23) 방법을 일부 변형하여 분리하였다. Brain heart infusion broth (BHI)에서 각 실험균주를 30℃, 48시간 배양한 후 원심분리하여 약 100 µl pellet를 수집하여 10 mM TE buffer (pH 8.0, 1 mM EDTA)로 두 번 세척하였다. 각 검체에 250 µl 100 mM TE (pH 9.0, 40 mM EDTA), 50 µl 10% sodium dodecyl sulfate와 200 µl benzyl chloride를 가하여 혼합한 후 50℃에서 30분 동안 가볍게 진탕하면서 방치한 다음, 10000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 분리하였다. 상층액에 3 M sodium acetate 50 µl를 가한 후 0℃에서 10분간 방치하였다. DNA 침전물은 250 µl isopropanol를 가하여 -70℃ 냉동고에서 1시간 방치하여 얻었으며, 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척하여 건조한 후 40 µl TE로 용해하여 사용하였다.

Mating type은 Chaturvedi 법 (12)에 따라 *C. neoformans* 혈청형 A의 특이적 primer, *MATa* (5'-CTTCACTGCC-ATCTTCACCA-3')과 5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3'), *MATa* (5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3')과 5'-AACGC-AAGAGTAAGTCGGGC-3')를 이용하여 PCR법을 실시하였다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit (Bioneer Co. Ltd, Daejeon, Korea)를 사용하여, DNA 시료 (75 ng) 1 µl, primer (10 pmol)를 각각 1 µl 넣고 증류수로 총 20 µl로 최종부피를 맞추었다. PCR 반응조건은 95℃에서 3분간 초기반응, 94℃ 1분, 57.5℃ 1분, 72℃ 1분의 과정으로 30회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 7분 연장으로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 2% agarose gel을 통하여 전기영동을 실시하였고, 증폭산물의 크기에 따라 mating type, *MATa* (101 bp)와 *MATa* (117 bp)를 확인하였다.

RAPD 및 PCR-fingerprinting

RAPD 분석은 3종의 primer, OPH-02 (5'-TCGGACGTGA-3'), OPH-12 (5'-ACGCGCATGT-3'), OPH-20 (5'-GGGAG-ACATC-3')를 사용하여 실시하였다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit를 사용하여, DNA 시료 (75 ng) 1 µl, 한 종류의 primer (10 pmol)를 1 µl 넣고 증류수로 총 20 µl로 최종부피를 맞추었다. PCR 반응조건은 94℃에서 4분간 초기반응, 92℃ 30초, 34℃ 1분, 72℃ 1분의 과정으로 35회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 5분 연장으

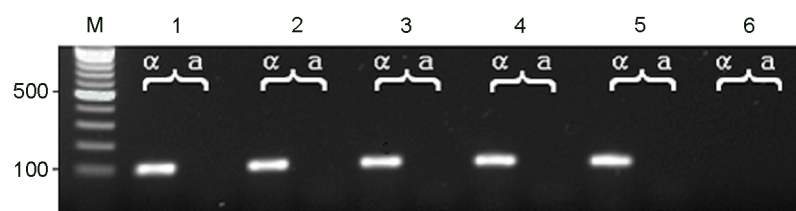


Figure 1. PCR products of *C. neoformans* isolates for determination of mating type α and a. Lane 1~5: clinical and environmental isolates, 6: negative control, M: molecular marker

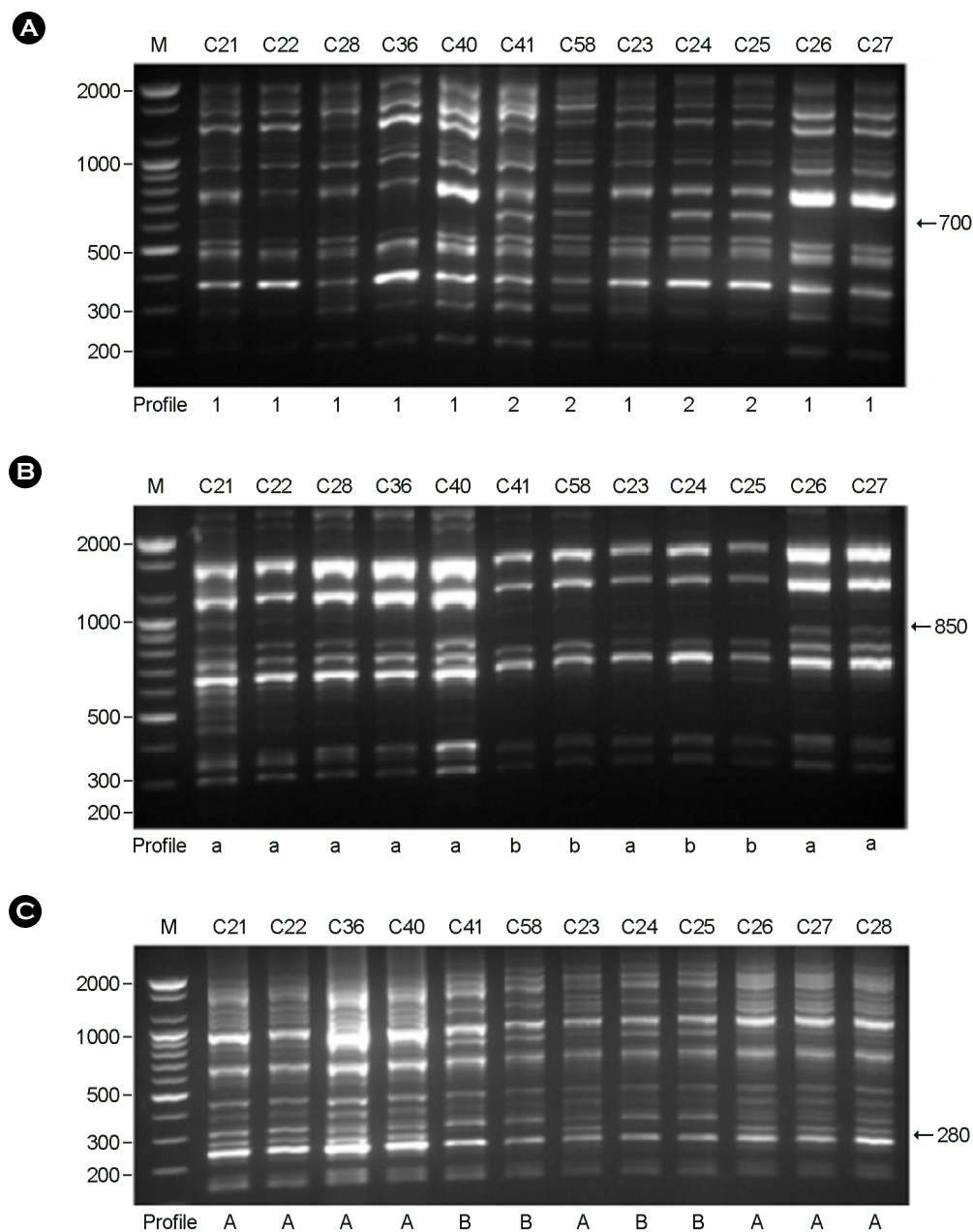


Figure 2. RAPD profiles of *C. neoformans* isolates amplified with the primers. (A): Primer OPH-02, (B): Primer OPH-12, (C): Primer OPH-20. M: molecular marker.

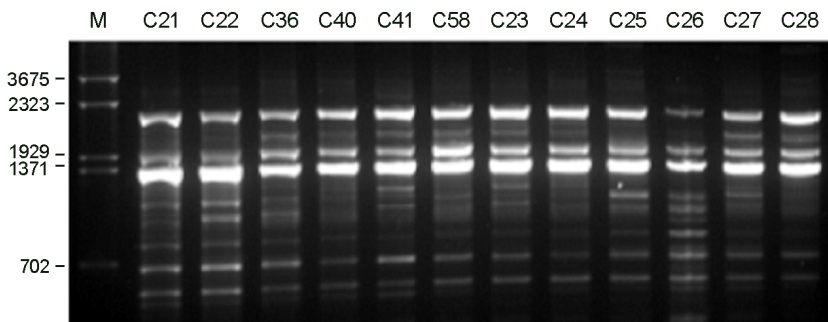


Figure 3. PCR fingerprint profiles amplified with the M13 primer. M: molecular marker.

Table 2. RAPD patterns of *C. neoformans* isolates from Busan, Korea

Pattern	RAPD profile			Strain No.
	Primer OPH-02	Primer OPH-12	Primer OPH-20	
I	1	a	A	C21 C22 C28 C36 C40 C23 C26 C27
II	2	b	B	C41 C58 C24 C25

로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, 증폭산물의 크기를 비교 확인하였다. Minisatellite 특이 M13 primer (5'-GAGGGTG-GCGGTTCT-3')를 이용한 PCR fingerprint 분석은 Meyer 법 (14)을 응용하여 실시하였다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit를 사용하여, DNA 시료 (25 ng) 1 µl, primer (10 pmol)를 1 µl 넣고 증류수로 총 20 µl로 최종부피를 맞추었다. PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 초기반응, 93℃ 20초, 50℃ 1분, 72℃ 20초의 과정으로 40회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 5분 연장으로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, 증폭산물의 크기를 비교 확인하였다.

결 과

혈청형 및 mating type

부산지역 4곳의 종합병원에서 2000년에서 2005년 동안 분리된 임상균주 7주와 2002년 비둘기 분변에서 분리된 환경균주 5주를 포함한 총 12균주의 *C. neoformans*의 협막 다당체 항원성분은 모두 혈청형 A이었으며, 변종확인 생화학적 검사 결과에서 CGB 배지에서 음성, EDTA 억제 urease 시험 음성으로 *C. neoformans* var. *grubii* (혈청형 A)로 확인되었다. *C. neoformans* 혈청형 A 균주의

mating type을 *MATa*와 *MATa* 두 종류의 특이적 primer를 이용하여 PCR법을 실시한 결과 모두 101 bp가 검출되어 *MATa*임을 확인하였다 (Fig. 1).

RAPD 및 PCR-fingerprinting

Random primer 3종류를 이용하여 RAPD 분석 결과는 Figure 2와 같다. OPH-02 primer를 이용한 결과에서 (Fig. 2-A) 임상균주 2주 (C41와 C58) 및 환경균주 2주 (C24와 C25)는 700 bp에 해당하는 band에서 나머지 8균주와 차이가 있음을 확인하여 profile 1과 2로 구분되었으며, OPH-12 primer에서는 850 bp, OPH-20 primer에서는 280 bp band에서 각각 profile a와 b, A와 B로 구분되어져, 균주간의 현저한 차이를 나타내었다. 3종류 primer에 의한 RAPD profile을 분석한 결과, pattern I과 II의 두 종류로 분류되었으며, 임상균주 7주 중에서 5주, 환경균주 5주 중 3주는 pattern I이었고, 임상균주 2주와 환경균주 2주는 pattern II를 나타내었다 (Table 2). Minisatellite M13에 의한 PCR-fingerprinting 결과에서 12균주 모두 동일한 양상을 나타내어, 균주간의 차이점이 없음을 확인하였다 (Fig. 3).

고 찰

Cryptococcus 감염증은 주위 자연환경에서 이 균종의 basidiospore를 흡입함으로써 주로 감염되는 것으로 알려져 있으며, 특히 AIDS 환자를 비롯하여 면역기능이 현저히 떨어진 사람에게서 기회감염을 일으킴으로 사회적으로 문제가 되고 있다. *C. neoformans*와 그 변종들로 인해 야기되는 임상질환과 지역적인 분포 사이에는 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 전 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다. AIDS 환자에서 *Cryptococcus* 감염의 원인균은 *C. neoformans* var. *grubii*, 혈청형 A으로

알려져 있으나, 브라질에서는 *C. neoformans* var. *grubii*와 *C. gattii* 모두 그 원인균으로 보고되었다 (24).

우리나라의 경우에 1986년 Kim 등 (25)이 한국의 임상에서 분리된 10균주 모두가 *C. neoformans* 혈청형 A로 보고되었으며, Hwang 등 (26)은 1993년에서 2005년 사이 분리된 임상균주 51주와 환경균주 7주의 혈청형을 분석한 결과 혈청형 A형이 55주, B형 2주, D형 1주이었으며, 환경균주는 모두 A형으로 보고하였다. 일본의 경우에 Ikeda 등 (27)은 임상에서 분리된 62주 모두가 *C. neoformans* 혈청형 A임을 보고하였다. 이와 같이 *C. neoformans* 혈청형 A는 세계 각지에서 가장 많이 분리되고 있는 반면에, 혈청형 B의 경우에는 대만, 베트남, 호주, 브라질 그리고 아프리카 중부 등의 열대 또는 아열대 지방에서 분리율이 높다고 알려져 있고, 혈청형 D 균주는 유럽에서 다른 지역에 비해 더 많이 분리되는 것으로 알려져 있다 (4, 6). 본 연구에서 분리된 12균주는 모두 *C. neoformans* var. *grubii* 혈청형 A로 혈청형 A 균주의 높은 분리율을 확인하였다.

*C. neoformans*의 mating type은 이 균종의 생태학적, 병원성 관련 연구에 중요하다. 임상균주나 환경균주에서 MATa type은 MATa type 보다 더 많이 존재하며, mating에 관계없이 적절한 환경에서 균사를 만들거나 눈으로 볼 수 있는 basidiospore를 형성하는 것으로 알려져 있다. Kwon-Chung 등 (28)은 MATa type 균주가 MATa type보다 병원성이 더 강한 것으로 보고하였다. Ohkusu 등 (24)은 임상균주 75주의 mating type 분석 결과 73주는 MATa이었고 2주는 type이 결정되지 않았음을 보고하였다. 본 실험에서 임상균주와 환경균주 모두 MATa type을 나타냄으로써 MATa *Cryptococcus* 균종이 우세함을 재확인하였다.

Cryptococcus 균종의 분자유전학적, 역학적 분석방법으로 여러 가지 분석법이 이용되고 있는데, 이 중에서 RAPD, M13 primer 및 (GACA)₄ 반복서열에 의한 PCR-fingerprint법 등이 널리 이용되고 있다. 특정 primer를 이용한 RAPD fingerprint법은 *C. neoformans*의 역학적 연구에 보다 쉽게 응용할 수 있는 방법으로 감염경로 등을 추정하는데 도움이 되고 있다 (29, 30). 본 실험에서 사용된 *Cryptococcus* 12주의 M13 primer에 의한 분석 결과는 모두 동일한 PCR fingerprint pattern를 나타냄으로서 *C. neoformans* var. *grubii* (혈청형 A)의 유전자형의 차이는 없었으나, 3종류의 primer에 의한 RAPD 분석 결과에서는 두 종류의 pattern I과 II를 나타냄으로서, 균주간의 차이

가 있음을 확인하였다. Pattern I을 나타낸 균주는 총 8주로 임상균주 (5주)와 환경균주 (3주)에서 우세하였으며, 나머지 임상균주 (2주)와 환경균주 (2주)는 pattern II를 나타내었다. 부산지역에 국한되었고 검체균주 수가 적었지만, 임상균주와 환경균주 사이에 상관성이 있음을 확인할 수 있었다. 특히 pattern II를 나타낸 임상균주는 모두 HIV 양성 환자에서 분리된 균주로서 흥미로운 결과를 얻었다. Yamamoto 등 (23)은 나가사키 지역에서 분리된 총 21주의 *Cryptococcus*를 이용하여 RAPD 분석을 한 결과 4종류의 pattern의 특성을 보고한 바 있다.

균종의 유전적 변이는 숙주의 면역반응에 중요한 역할을 하며, 유전자 기능변화는 병원성에 중요한 영향을 미치게 된다. 또한 미생물의 진화, 군집의 구조변화를 인식하는데 변이균주의 유전적 분석은 필수적이라 하겠다. *Cryptococcus* 균종은 자연환경인 조류의 분변이나 썩은 나무 등에 서식하면서 인체와 많은 접촉을 할 기회가 많으며, 노령인구의 증가, 면역기능저하 환자의 증가 등에 인한 기회감염균으로 중요시하고 있는 진균이다. 그러므로 전 세계적으로 *Cryptococcus* 균종에 관련하여 다양한 연구가 이루어지고 있는 반면에, 우리나라에서는 이 균종에 관하여 분자역학적인 연구가 거의 없는 실정이다. 이 분야의 연구가 저조한 이유로서는 여러 가지 요인이 있을 것으로 사려되나, 의진균성 감염에 관심과 임상에서 진균의 분리율이 저조한 까닭이 아닐까 생각한다.

부산지역 임상과 환경검체에서 분리된 *Cryptococcus* 종은 모두 혈청형 A형인 *C. neoformans* var. *grubii*이었으며, M13 primer에 의한 유전자형도 동일하였다. 그러나 RAPD 분석에 의한 유전자형은 두 pattern으로 구분되었으며, 임상균주와 환경균주 모두에서 분리됨을 확인하였다. 비록 지역과 균주 수가 제한적이었지만, 비둘기 분변에 서식하는 *Cryptococcus* 환경균주는 환자에서 분리된 균주와 무관하지 않으며, 역학적 상관성이 있는 것으로 추정된다. 그러므로 우리나라 전 지역에서 분리되는 *C. neoformans* 변이균주의 생태적 특성, 병원성 및 분자역학 분야에 지속적인 연구가 활발히 이루어져, 글로벌 균주와의 상관성을 규명해야 될 것으로 사려된다.

참 고 문 헌

- 1) Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, Melhem Mde S, Medes-Giannini MJ. Genotyping, serotyping and

- determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007;49:41-7.
- 2) Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerg Infect Dis* 2008;14:755-62.
 - 3) Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. *FEMS Yeast Res* 2008;8:930-8.
 - 4) Benett JE, Kwon-Chung KJ, Howard DH. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1977;105:582-6.
 - 5) Walter JE, Coffee EG. Distribution and epidemiologic significance of the serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1968;87:167-72.
 - 6) Franzot SP, Hamdan JS, Currie BP, Casadevall A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: Evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2243-51.
 - 7) Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 1992;30:407-8.
 - 8) Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1642-4.
 - 9) Kuroki M, Phichaihumpon C, Yasuoka A, Chiranairadul P, Chosa T, Sirinirund P, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. *Yeast* 2004;21:809-12.
 - 10) Ito-Kuwa S, Nagamura K, Aoki S, Ninimiya K, Kato J, Vidotto V. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from AIDS patients. *Shigaku (Odontology)* 1994;82:360-4.
 - 11) Trilles L, Lazéra Mdos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:455-62.
 - 12) Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL, Chaturvedi V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT a pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J Clin Microbiol* 2000;38:2007-9.
 - 13) Jain N, Wickes BL, Keller SM, Fu J, Casadevall A, Jain P, et al. Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. *J Clin Microbiol* 2005;43:5733-42.
 - 14) Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999;20:1790-9.
 - 15) Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2001;147:891-907.
 - 16) Diaz MR, Boekhout T, Kiesling T, Fell JW. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 2005;5:1129-40.
 - 17) Brandt ME, Hutwagner LC, Kuykendall RJ, Pinner RW. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. The Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. *J Clin Microbiol* 1995;33:1890-5.
 - 18) Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* 2006;172:2223-38.
 - 19) Chung SM, Lee EY, Lee CK, Eom DW, Yoo B, Moon HB. A case of cryptococcal tenosynovitis in a patient with Wegener's granulomatosis. *J Kor Rheumatism Ass* 2004;11:66-71.
 - 20) Oh KS, Hwang SM. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* from environmental sources in Busan. *Mycobiology* 2005;33:188-93.
 - 21) Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J Clin Microbiol* 1982;15: 535-7.
 - 22) Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennett JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1987;55:1751-4.
 - 23) Yamamoto Y, Kohno S, Koga H, Kakeya H, Tomono K, Kaku M, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J Clin Microbiol* 1995;33:3328-32.

- 24) Ohkusu M, Tagonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki S, et al. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002;44:299-302.
 - 25) Kim SJ, Kim SO, Lee SH, Chong YS, Suk JS. A study on the mating types and serotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* and production of serodiagnostic antigen and antiserum for cryptococcosis. Korean J Microbiol 1986;21: 127-31.
 - 26) Hwang SM, Oh KS, Lee KW. Serotype and enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Korea. Korean J Microbiol 2006; 42:257-64.
 - 27) Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. J Clin Microbiol 1982;16:22-9.
 - 28) Kwon-Chung, KJ, Bennett JF. Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. Am J Epidemiol 1978;108:337-40.
 - 29) Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 2003;9:189-95.
 - 30) Boekhout, T, van Belkum A. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. Curr Genet 1997;32:203-8.
-