

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและจาก ผู้ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธี PCR-fingerprinting โดยใช้ primer (GTG)₅

พจนนา ศรีบุรี¹, ราเพย ผาสุชาติ², เสริมกิจ ขยัน¹, สุชาติ ปันจยสิทธิ์², จันทนา คำวรรณ³,
ประสิทธิ์ ธรวิจิตรกุล¹

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เชื้อ *Cryptococcus neoformans* เป็นสาเหตุของโรค cryptococcosis ที่พบบ่อยในผู้ป่วยเอดส์ทางภาคเหนือของประเทศไทย การศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่เกือบทั้งหมดเป็น *C. neoformans* serotype A ยังไม่มีข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและจากผู้ป่วยโดยวิธี PCR-fingerprinting ด้วย primer (GTG)₅ และศึกษาการใช้ primer นี้ในการตรวจหา serotype

วิธีการ: นำเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 25 เชื้อ และที่แยกได้จากผู้ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ 25 เชื้อ มาสกัด DNA เพื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ oligonucleotide (GTG)₅ เป็น primer ทำการตรวจดู PCR products ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis วิเคราะห์ความแตกต่างของแบบแผน PCR-fingerprints ของเชื้อทั้ง 50 เชื้อ และเปรียบเทียบกับแบบแผน PCR-fingerprints ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน serotype A, B, C และ D

ผลการทดลอง: เชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 24 เชื้อ และจากสิ่งแวดล้อม 23 เชื้อ มีแบบแผน PCR-fingerprints คล้ายคลึงกับแบบแผนที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน serotype A มี 3 เชื้อที่มีแบบแผนแตกต่างกัน และต่างจากแบบแผนของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน serotype A คือจากผู้ป่วย 1 เชื้อ มูลนกพิราบ 1 เชื้อ และจากดอกยูคาลิปตัส 1 เชื้อ

สรุป: วิธี PCR-fingerprinting โดยใช้ primer (GTG)₅ สามารถแยกแบบแผน PCR-fingerprints ของ *C. neoformans* ทั้ง 50 เชื้อ นี้ได้เป็น 4 แบบ และวิธีนี้ได้ผลสอดคล้องกับผลการทำ serotyping ด้วยวิธี slide agglutination test โดยเชื้อ serotype A 46 จาก 49 เชื้อ (93.8%) จะมีแบบแผน PCR-fingerprints เหมือนกับแบบแผนของเชื้อ serotype A สายพันธุ์มาตรฐาน วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2545; 35: 156-163.

คำห้ส: *Cryptococcus neoformans*, PCR-fingerprinting, เชียงใหม่

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์, ² ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์, ³ หน่วยปฏิบัติการจุลชีววิทยา งานปฏิบัติการกลาง โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: The Study of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai by PCR-fingerprinting Method Using (GTG)₅ as a Primer

Sriburee P¹, Pasukdee R², Khayhan S¹, Punjaisee S², Khamwan C³, Tharavichitkul P¹

Objective: *Cryptococcus neoformans* is the etiologic agent of cryptococcosis, the common opportunistic infection among AIDS patients in northern Thailand. A previous study revealed that almost all clinical and environmental isolates of *C. neoformans* in Chiang Mai belonged to *C. neoformans* serotype A. There was no data on the molecular epidemiology. The aims of this research were to study the genetic diversity of *C. neoformans* isolated from patients and environments by the PCR-fingerprinting method using (GTG)₅ as a primer and to study the efficiency of this primer for serotyping.

Methods: Twenty-five environmental and 25 clinical isolates of *C. neoformans* collected in Chiang Mai were studied by the PCR- fingerprinting method. Genomic DNA of each isolate was extracted for PCR amplification by using a (GTG)₅ primer. The PCR-products were identified by agarose gel electrophoresis. The PCR- fingerprinting patterns of all 50 isolates were analysed and compared with the PCR-fingerprinting patterns of *C. neoformans* standard serotypes A , B, C and D.

Results: The PCR- fingerprinting patterns of 24 clinical isolates and 23 environmental isolates were identical to the pattern of the standard strain of *C. neoformans* serotype A. One clinical isolate and two environmental isolates (one from pigeon droppings and one from eucalyptus flowers) produced other different patterns.

Conclusion: The PCR-fingerprinting method using (GTG)₅ as a primer differentiated 50 isolates of *C. neoformans* into 4 types. This method showed corresponding results with serotyping by the slide agglutination test. Forty-six of 49 isolates of serotype A (93.8%) produced the identical pattern as *C. neoformans* standard serotype A. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2002; 35: 156-163.

Key words: *Cryptococcus neoformans* , PCR-fingerprinting, Chiang Mai

¹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, ² Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, ³ Microbiology Laboratory Section, Central Laboratory Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Chiang Mai University.

บทนำ

โรค cryptococcosis เป็นโรคติดเชื้อราที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีแคปซูล (capsule) การติดเชื้อเกิดจากการหายใจเอาเซลล์ยีสต์แห่งจากในธรรมชาติเข้าสู่ปอด เชื้อจะกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายโดยเฉพาะที่สมองและเยื่อหุ้มสมองทำให้เกิดโรค cryptococcal meningitis เชื้อ *C. neoformans* แยกได้เป็น 3 varieties และ 4 serotypes คือ *C. neoformans* var. *grubii* หรือ *C. neoformans* serotype A¹ มีแหล่งตามมูลนกและดินที่ปนเปื้อนด้วยมูลนก², *C. neoformans* var. *gattii* (serotype B และ C) มีแหล่งอยู่ตามต้นไม้ตระกูลยูคาลิปตัส³, ซากพืช ตามโพรงไม้⁴ และ *C. neoformans* var. *neoformans* (*C. neoformans* serotype D) มีแหล่งอยู่ตามมูลนก² แต่เดิมในประเทศไทยพบโรค cryptococcosis ได้น้อย แต่หลังจากการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ทำให้อุบัติการณ์ของผู้ป่วย cryptococcosis สูงขึ้น โดยเฉพาะในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ซึ่งเป็นดินแดนที่ชุกชุมด้วยผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อเอดส์ อัตราการติดเชื้อ cryptococcosis ในผู้ป่วยเหล่านี้ สูงถึงร้อยละ 20.9⁵ การศึกษาเชื้อ *C. neoformans* จากสิ่งแวดล้อมและจากผู้ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงปี พ.ศ. 2542 - 2543 และตรวจหา serotype โดยใช้ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อ capsular polysaccharides ของ *C. neoformans* (Crypto Check, latron, Tokyo, Japan) พบว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็น *C. neoformans* serotype A⁶ ได้มีรายงานการนำวิธีทางอนุชีววิทยาไปใช้ในการศึกษาจำแนก serotype⁷ และใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาซึ่งมีหลายวิธี⁸⁻¹² ในบรรดาเทคนิคเหล่านี้ วิธี PCR-fingerprinting ที่ใช้

oligonucleotide primer เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน hypervariable repetitive DNA sequences ของ *C. neoformans* เป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่อง Thermal cycler แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาทางด้าน molecular epidemiology ของเชื้อนี้ในจังหวัดเชียงใหม่ ดังนั้นรายงานนี้จึงได้เสนอวิธี PCR-fingerprinting ที่ใช้ primer (GTG)₅¹⁰ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และเพื่อศึกษาการใช้ primer นี้ ในการตรวจหา serotype ของ *C. neoformans* ที่แยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและจากผู้ป่วยในจังหวัดเชียงใหม่ด้วยวิธี PCR-fingerprinting โดยใช้ oligonucleotide primer (GTG)₅ และเพื่อศึกษาการใช้ primer ชนิดนี้ในการตรวจหา serotype

วิธีการ

เชื้อที่นำมาศึกษา

เชื้อ *Cryptococcus neoformans* จำนวน 50 เชื้อ เป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำไขสันหลังผู้ป่วย cryptococcosis 25 เชื้อ และเชื้อจากสิ่งแวดล้อม 25 เชื้อ เชื้อทั้งหมดนี้ผ่านการตรวจหา serotype โดยวิธี slide agglutination test กับ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อ capsular polysaccharides โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Crypto Check, latron, Tokyo, Japan) พบว่าเชื้อจากผู้ป่วยเป็น serotype A 24 เชื้อ และ serotype AD 1 เชื้อ ส่วนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม (มูลนกเขา 12 เชื้อ มูลนกพิราบ 11 เชื้อ และตัวอย่างดอกยูคาลิปตัส 2 เชื้อ) ทั้ง 25 เชื้อ เป็นเชื้อ

C. neoformans serotype A เชื้อ *C. neoformans* สายพันธุ์ มาตรฐาน ที่ใช้ในการศึกษา คือ *C. neoformans* serotype A (MUMT01), serotype B (MUMT25), serotype C (RV45978) และ serotype D (MUMT53)

การสกัด DNA

ชุดเชื้อ *C. neoformans* ที่เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ที่ 25 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วมา 3-4 loops ล้างด้วย PBS pH 7.2 ใน microtube (2 ครั้ง) โดยปั่นที่ความเร็ว 9,500 - 10,000 xg และ suspend เชื้อใน 500 µL ของ lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl และ 2% SDS) นำไป incubate ที่ 65 °C 1 ชั่วโมง และ incubate ต่อที่ 100 °C 5 นาที เติมน้ำ phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 µL ปั่นตามวิธีข้างต้นแยก supernatant ประมาณ 400 µL ใส่ใน microtube ใหม่ เติมน้ำ isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตร supernatant เพื่อตกตะกอน DNA นำ suspension ไปปั่นที่ความเร็วรอบเดิม แล้วดูด supernatant ทิ้ง ล้าง DNA ด้วย 70 % cold ethanol และทิ้งให้แห้ง แล้วละลาย DNA ด้วย TE buffer 50 µL เก็บที่ -20 °C จนกว่าจะใช้

การทำ PCR-fingerprinting

เตรียม PCR reaction ปริมาตร 50 µL ประกอบด้วย dNTPs ความเข้มข้นอย่างละ 200 µM, 100 pmol primer (GTG)₃, 1.5 mM MgCl₂, PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.001% gelatin), 2.5 U Taq DNA polymerase, 200 ng DNA template ปรับปริมาตรให้ครบ 50 µL ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง DNA Thermal cycler ของ Perkin-Elmer Cetus รุ่น 480

โดยตั้งโปรแกรมให้เครื่องทำงานดังนี้ initial denaturation 94 °C 5 นาที, denaturation 94 °C 30 วินาที, annealing 55 °C 30 วินาที, extension 72 °C 60 วินาที และ final extension 72 °C 5 นาที จะทำซ้ำ 30 รอบ แยก PCR products ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยทำ electrophoresis ใน 1.5 % agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide และบันทึกภาพไว้ ภายใต้ UV Transilluminator ในการทดลอง จะใช้เชื้อ *C. neoformans* สายพันธุ์มาตรฐานของแต่ละ serotype ทำควบคุมไปด้วย และ negative control คือ PCR reaction ที่เติมน้ำกลั่นแทน DNA ของเชื้อ

การวิเคราะห์ผล

ศึกษาความหลากหลายของแบบแผน PCR-fingerprints ของเชื้อที่แยกจากสิ่งแวดล้อม และเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย เปรียบเทียบแบบแผน PCR-fingerprints ของเชื้อที่ทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน โดยดูแถบ DNA จำเพาะที่เกิด

ผลการทดลอง

จากการศึกษากับเชื้อ *C. neoformans* สายพันธุ์มาตรฐาน serotype A, B, C และ D พบว่าแบบแผน PCR-fingerprints ของแต่ละ serotype มีรูปแบบที่จำเพาะ จำนวนแถบที่เกิดมีจำนวนตั้งแต่ 5 ถึง 9 แถบ (รูปที่ 1) เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกจากผู้ป่วย และจากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าเชื้อ 47 เชื้อ (serotype A 46 เชื้อ และ serotype AD 1 เชื้อ) มีแบบแผน PCR-fingerprints เหมือนกับ *C. neoformans* สายพันธุ์มาตรฐาน serotype A มีเชื้อ 3 สายพันธุ์ของ serotype A (เป็นเชื้อจากมูลนกพิราบ 1 เชื้อ, เชื้อจากดอกยูคาลิปตัส 1 เชื้อ และเชื้อจากผู้ป่วย 1 เชื้อ) ที่มีแบบแผนแตกต่างไปจากสายพันธุ์มาตรฐาน

ดังแสดงในรูปที่ 2 Lane ที่ 3 , รูปที่ 3 Lane ที่ 6 และ รูปที่ 4 Lane ที่ 10

วิจารณ์

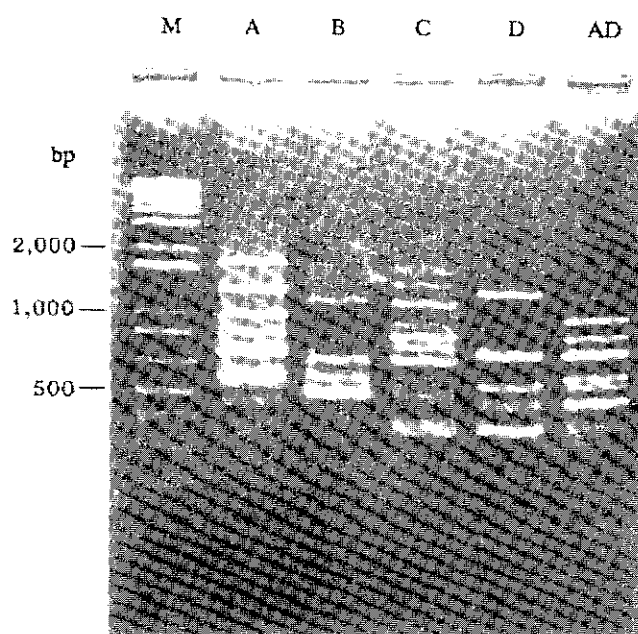
จากการที่ได้มีการนำเทคนิค PCR โดยใช้ repetitive primer ทำให้สามารถตรวจสอบแบบพิมพ์ PCR-fingerprints ของเชื้อราชนิดต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว ได้มีการพัฒนาเทคนิคนี้เพื่อใช้ศึกษา *C. neoformans* โดยใช้ oligonucleotide primers (GTG)₅¹⁰, (GACA)₄⁷ และ phage M13 core sequence (5'-GAGGGTGGXGGXTCT-3')¹³ พบว่าแบบแผน PCR-fingerprints จาก primer เหล่านี้สามารถใช้แยกความแตกต่างของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ และความแตกต่างระหว่าง serotype ได้ จากการศึกษาในเบื้องต้นโดยเสริมกิจขยัน⁽⁶⁾ ได้ทดลองเทคนิคนี้โดยใช้ primer (GACA)₄ ทดสอบกับเชื้อ *C. neoformans* จากผู้ป่วย 76 เชื้อ และเชื้อจากสิ่งแวดล้อม จำนวน 56 เชื้อ พบแบบแผน PCR-fingerprints 2 แบบ คือ AI และ AII โดยเชื้อส่วนใหญ่ (130 จาก 132 เชื้อ) รวมทั้งเชื้อ *C. neoformans* serotype AD มีแบบแผน PCR-fingerprints เป็นแบบ AI ส่วนเชื้อจากสิ่งแวดล้อม 2 เชื้อ (จากมูลนกพิราบ 1 เชื้อ และเชื้อจากดอกกุยคาลิปดัส 1 เชื้อ) มีแบบแผน PCR-fingerprints เป็นแบบ AII ได้เคยมีการใช้เทคนิค PCR-fingerprinting โดยใช้ primer (GTG)₅ ในการทำ strain typing ของ *C. neoformans* ที่แยกได้ในประเทศมอลต้า สามารถแยกเชื้อ *C. neoformans* serotype A จำนวน 14 เชื้อ ออกได้เป็น 2 type คือ type I (13 เชื้อ) และ type II (1 เชื้อ)¹⁰

จากงานวิจัยครั้งนี้ แม้ว่า primer (GTG)₅ จะสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดีกว่า

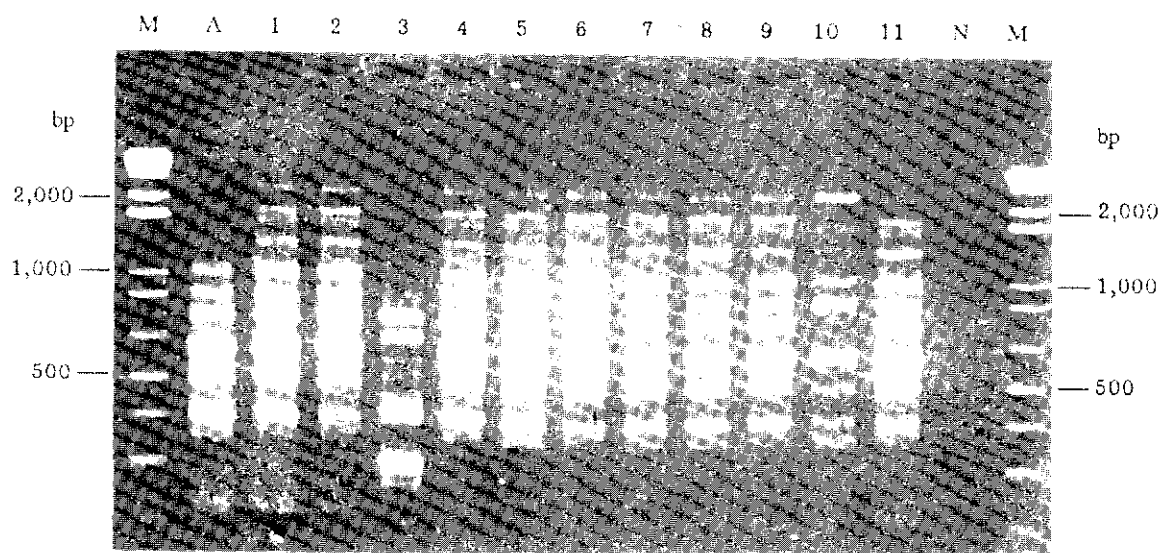
primer (GACA)₄ โดย primer (GTG)₅ ใช้แยก *C. neoformans* 50 เชื้อ ออกได้เป็น 4 แบบ แต่ primer (GACA)₄ แยกเชื้อ 132 เชื้อออกได้เพียง 2 แบบ⁶ แต่ร้อยละ 93.8 ของเชื้อ serotype A (46 จาก 49 เชื้อ) มีแบบแผน PCR-fingerprints ที่เหมือนกันและเหมือนกับแบบแผนของ *C. neoformans* สายพันธุ์มาตรฐาน serotype A ดังนั้นการใช้วิธี PCR-fingerprinting ด้วย primer (GTG)₅ อาจใช้ในการตรวจหา serotype (โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเอดส์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อ serotype A^{6,10}) แทนการใช้วิธี slide agglutination test ซึ่งต้องใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีราคาแพง และต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ โดยการใช้วิธี PCR-fingerprinting ต้องทำเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานของแต่ละ serotype ในการศึกษาพบว่าแบบแผน PCR-fingerprints ของ *C. neoformans* serotype AD เหมือนกับแบบแผนของสายพันธุ์มาตรฐาน serotype A อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อที่ทำการทดสอบเป็น serotype A ไม่ใช่ AD เนื่องจากเคยมีรายงานว่า serotype AD มักให้ผลที่ไม่แน่นอนเมื่อทดสอบด้วยวิธี slide agglutination test⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้สามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่อง Thermal cycler ไม่ต้องใช้สารรังสี และมี reproducibility สูง การทำ molecular typing เพื่อแยกความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ อาจพัฒนาวิธีการแยกให้ดียิ่งขึ้น โดยใช้ primer มากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป

กิตติกรรมประกาศ :

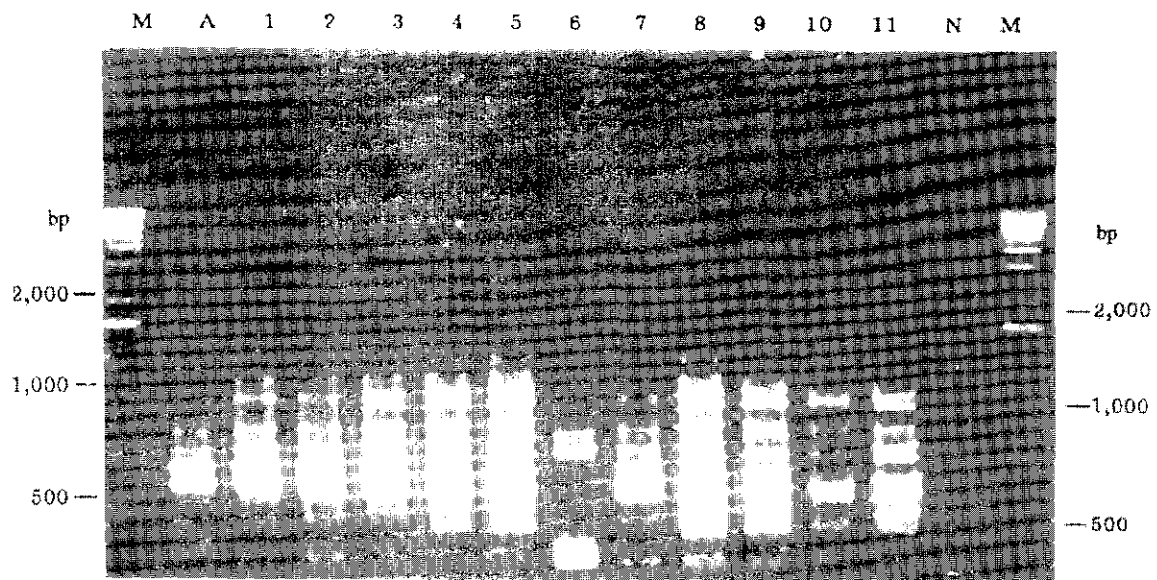
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



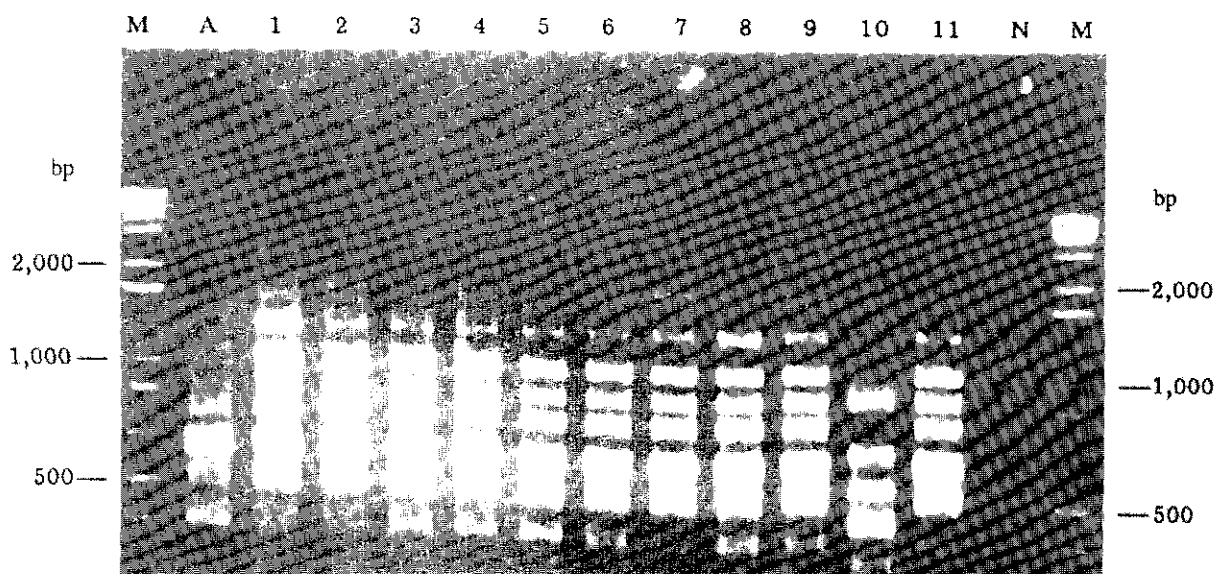
รูปที่ 1. PCR-fingerprints ของ *C. neoformans* standard serotype; Lane M: DNA Marker 1 Kilobase pair, Lane A: standard serotype A (MUMT01), Lane B: standard serotype B (MUMT25), Lane C: standard serotype C (RV45978), Lane D: standard serotype D (MUMT53) และ Lane AD เป็นเชื้อ *C. neoformans* serotype AD จากห้องปฏิบัติการเชื้อรา โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่



รูปที่ 2. PCR-fingerprints ของ *C. neoformans* จากสิ่งแวดล้อม คือ มูลนกพิราบ 4 เชื้อ และมูลนกเขา 7 เชื้อ; Lane M: DNA Marker 1 Kilobase pair, Lane A: Standard Serotype A, Lane 1-4: เชื้อจากมูลนกพิราบ 4 เชื้อ, Lane 5-11: เชื้อจากมูลนกเขา 7 เชื้อ, Lane N: Negative control



รูปที่ 3. PCR-fingerprints ของ *C. neoformans* จากสิ่งแวดล้อม คือ มูลนกเขา 5 เชื้อ, ดอกยูคาลิปตัส 2 เชื้อ และเชื้อจากงานปฏิบัติการกลาง รพ. มหาราชนครเชียงใหม่ 4 เชื้อ; Lane M: DNA Marker 1 Kilobase pair, Lane 1-5: เชื้อจากมูลนกเขา 5 เชื้อ, Lane 6-7: เชื้อจากดอกยูคาลิปตัส 2 เชื้อ, Lane 8-11: เชื้อจากงานปฏิบัติการกลาง รพ.มหาราชนครเชียงใหม่ 4 เชื้อ, Lane N: Negative control



รูปที่ 4. PCR-fingerprints ของ *C. neoformans* จากผู้ป่วยรพ.มหาราชนครเชียงใหม่ 6 เชื้อ และเชื้อจากสำนักงานควบคุมโรคติดต่อเขต 10 จังหวัดเชียงใหม่ 4 เชื้อ; Lane M: DNA Marker 1 kilobase pair, Lane A: Standard Serotype A, Lane 1-7: เชื้อจากงานปฏิบัติการกลางรพ.มหาราชนครเชียงใหม่ 7 เชื้อ, Lane 8-11: เชื้อจากสำนักงานควบคุมโรคติดต่อเขต 10 จังหวัดเชียงใหม่ 4 เชื้อ, Lane N: Negative control

เอกสารอ้างอิง

1. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 838-40.
2. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. Lancet 1990; 336: 923-5.
3. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin microbiol 1990; 28: 1642-4.
4. Lazera MS, Salmito C, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2000; 38: 379-383.
5. Data of The Office of Communicable Diseases Control (Region 10), Ministry of Public health, Chiang Mai, Thailand, 1998.
6. Khayhan S. Serotyping and DNA analysis by PCR-fingerprinting of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai. M.S. Thesis in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.
7. Viviani MA, Wen H, Roverselli A, Caldarelli-Stefano R, Cogliati M, Ferrante P, Tortorano M. Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. J Med Vet Mycol 1997; 35: 355-360.
8. Crampin AC, Mathews RC, Halls D, Evans EGV. PCR-fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. J Med Vet Mycol 1993; 31: 463-5.
9. Currie BP, Freundlich LF, Casadevall A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York city. J Clin Microbiol 1994; 32: 1188-92.
10. Passo CL, Pernice I, Gallo M, Barbara C, Luck FT, Criseo G, Pernice A. Genetic relatedness and diversity of *Cryptococcus neoformans* strains in Maltese islands. J Clin Microbiol 1997; 35: 751-5.
11. Perfect JR, Ketabchi N, Cox GM, Ingram CI, Beiser C. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. J Clin Microbiol 1993; 31: 3305-9.
12. Yamamoto Y, Khono S, Koga H, Kakeya H, Tomono K, Kaku M, Yamasaki T, Arisawa M, Hara K. Random Amplified Polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. J Clin Microbiol 1995; 33: 3328-32.
13. Meyer W, Mitchell TG. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences strain variation in *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1993; 31: 2274-80.