

Deteksi Antigen pada Kriptokokosis

Robiatul Adawiyah, Ridhawati Syam

Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Abstrak

Kriptokokosis merupakan infeksi sistemik yang disebabkan *Cryptococcus* sp. Predileksi jamur tersebut adalah susunan saraf pusat dan selaput otak. Terdapat 5 spesies *Cryptococcus* sp. yang menyebabkan penyakit pada manusia; yang paling banyak adalah *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*. Diagnosis kriptokokosis ditegakkan berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan laboratoris serta radiologis. Pemeriksaan laboratoris dilakukan dengan identifikasi morfologi, serologi dan PCR. Pemeriksaan secara morfologi dengan tinta India positif bila jumlah sel jamur 10^3 - 10^4 sel/ml spesimen. Kultur dilakukan di media sabouraud dextrose agar (SDA) dan niger sheed agar (NSA), jamur tumbuh setelah 5-7 hari. Deteksi antigen dan antibodi dilakukan pada cairan tubuh dan tidak membutuhkan waktu lama. Deteksi antibodi *Cr. neoformans* memiliki kelemahan yaitu tidak menunjukkan hasil positif pada infeksi akut, IgA masih positif setelah 1-2 tahun fase penyembuhan, IgG dapat persisten, pada individu imunokompromis menunjukkan hasil yang sangat kompleks dan dalam menentukan diagnosis sering tidak konsisten. Polisakarida adalah komponen paling berperan dalam virulensi *Cr. neoformans*. Komponen polisakarida terutama glucuronoxylomannan merupakan petanda penting dalam diagnosis kriptokokosis secara serologis. Deteksi antigen *Cr. neoformans* memiliki kelebihan yaitu menunjukkan hasil positif pada infeksi akut/kronis, sensitivitas dan spesifisitas tinggi, dapat mendeteksi polisakarida hingga 10 ng/ml sehingga dengan kadar antigen yang minimal tetap dapat mendiagnosis kriptokokosis.

Kata kunci: *Cr. neoformans*, glucuronoxylomannan, antigen

Antigen Detection in Cryptococcosis

Abstract

Cryptococcosis is systemic infection that caused by *Cryptococcus* sp. Predilection of this fungi is the central nervous system and brain membrane. There are 5 species of *Cryptococcus* sp. that cause cryptococcosis in human; but the majority are caused by *Cr. neoformans* and *Cr. gattii*. The diagnosis of cryptococcosis is made based on clinical symptoms, laboratory and radiological examinations. Laboratory examinations performed by morphological identification, serology and PCR. Morphological examination with India ink is positive when the number of fungi is around 10^3 - 10^4 cells/ml. Cultur examination is performed in Sabouraud dextrose agar (SDA) and niger sheed agar (NSA) medium, fungi grows in 5-7 days. Antigen and antibody detection could be performed on body fluid and do not take a long time. Detection of *Cr. neoformans* antibody can not show positive result in acute infection, IgA still positive after 1-2 years of healing phase and IgG can be persistent. The immunocompromised person showed very complex result and inconsistent in determining the diagnosis. Polysaccharides are the most instrumental component in *Cr. neoformans* virulence. The component of Polysaccharide especially glucuronoxylomannan is the most important marker in the diagnosis of cryptococcosis. Antigen detection of *Cr. neoformans* can show positive result in acute/chronic infection, high sensitivity and specificity. Polysaccharides can be detected from 10 ng/ml of body fluid, so in minimal level of antigen we still can diagnose cryptococcosis.

Keywords: *Cr. neoformans*, glucuronoxylomannan, antigen

Pendahuluan

Kriptokokosis adalah infeksi sistemik yang disebabkan oleh jamur ragi *Cryptococcus* sp.¹ Pada manusia kriptokokosis dapat ditemukan diberbagai jaringan/organ yaitu paru, hati, limpa, pankreas, sumsum tulang, otot, payudara, ginjal, saluran kemih, kelenjar prostat, kelenjar pituitari, jantung, saluran cerna, serta kepala dan leher yang manifestasinya berupa sinusitis, gingivitis serta massa dileher dll.² Predileksi jamur terutama pada individu imunokompromis adalah susunan saraf pusat, selaput otak dan kulit.

C. neoformans pertama kali diisolasi dari jus buah peach tahun 1894 oleh Francisco Sanefelis. Setelah itu diketahui bahwa habitat jamur tersebut di alam adalah tanah dan feses burung merpati. Isolasi dari tanah pertama kali dilakukan pada tahun 1951 oleh Emmons dan isolasi *Cr. neoformans* dari feses merpati berhasil dilakukan pada tahun 1955. Koloni jamur difeses merpati dapat mengandung lebih dari 10⁶ mikroorganisme per gram, namun belum ada bukti merpati mengalami kriptokokosis.¹

Kriptokokosis mulai diperhatikan dan dipelajari secara intensif serta diketahui sebagai penyakit jamur oportunistik sejak insidens penyakit tersebut meningkat tinggi pada individu imunokompromis, terutama pada penderita AIDS dan penerima transplantasi organ.² Pada makalah ini dibahas cara diagnosis kriptokokosis secara laboratoris.

Kriptokokosis

Kriptokokosis ditemukan di seluruh dunia dengan insidens 2%- 72%.³⁻⁹ Insidens tertinggi ditemukan di Sub Sahara-Afrika sebanyak 720.000 kasus per tahun dan menempati urutan pertama infeksi oportunistik pada AIDS.¹⁰⁻¹² Di Asia Selatan dan Asia Tenggara insidens mencapai 120.000 kasus pertahun.¹²⁻¹⁶

Cryptococcus sp. yang menyebabkan kriptokokosis pada manusia ada lima spesies, yaitu *Cr. neoformans*, *Cr. gattii* (yang sebelumnya merupakan varian dari *Cr. neoformans*), *Cr. laurentii*, *Cr. albidus* dan *Cr. curvatus*.² Jamur yang paling banyak menyebabkan infeksi adalah *Cr. neoformans* dan *Cr. gattii*. *Cr. neoformans* tersebar kosmopolit, hampir di semua benua, sedangkan *Cr. gattii* terbatas di Afrika, Amerika dan Australia.¹⁷

Cryptococcus dapat menginfeksi individu dengan atau tanpa gangguan imunitas. Pada individu imunokompeten kriptokokosis seringkali tidak menimbulkan gejala dan jika ada gejalanya ringan. Pada penderita imunokompromis gejala lebih jelas dan dapat berakibat fatal.⁴ Peningkatan

infeksi tergantung pada faktor hospes yaitu gangguan imunitas, infeksi HIV atau kondisi imunokompromis lainnya.^{2,11} Manifestasi klinis yang dapat muncul adalah meningitis-meningoencefalitis (mayoritas, 30% penderita), kriptokokosis paru, kriptokokosis kulit (15%), perikarditis dan lain-lain.^{2,4}

Jamur menginfeksi secara inhalasi dan inokulasi primer di kulit.^{2,4} Jamur yang terinhalasi akan ditangkap oleh makrofag dan bertahan intraseluler. Kapsul melindungi jamur dari fagositosis dan *oxidative injury* bersama dengan melanin. Setelah terinhalasi jamur mengalami kolonisasi kemudian menyebar secara hematogen dan limfogen ke organ lain terutama otak.^{1,2} Inokulasi primer dikulit sangat jarang terjadi. Inokulasi terjadi karena rusaknya barrier perlindungan dikulit.⁴

Perkembangan penyakit tergantung pada beberapa faktor antara lain jumlah inokulum jamur yang terinhalasi, faktor virulensi jamur dan interaksi mikroorganisme dengan respons imunitas seluler. Pertahanan tubuh yang pertama kali berperan dalam menghadapi *Cr. neoformans* adalah makrofag alveoli. Secara *invitro* makrofag dapat mengikat dan memfagositosis jamur.⁴ Netrofil, sel NK dan limfosit T berperan membunuh dan menghambat pertumbuhan *Cr. neoformans*. Sitokin terutama interleukin-2 dan interferon-yang dilepaskan oleh limfosit juga berperan penting dalam membunuh jamur. Peran imunitas humoral masih kontroversi namun beberapa penelitian menunjukkan peran antibody dalam menurun kansirkulasi antigen *Cr. neoformans*.^{2,4}

Faktor virulensi *Cr. neoformans* dalam konteks kemampuan jamur tersebut bertahan hidup adalah polisakarida, kemampuan jamur untuk tumbuh pada suhu tinggi (termotoleran) termasuk pada suhu tubuh, kemampuan membentuk melanin, produksi manitol dan mampu terlarut dalam cairan ekstraseluler. Komponen yang paling berperan dalam virulensi adalah polisakarida.⁴

Polisakarida terdapat di kapsul *Cr. neoformans*. Komponen polisakarida diantaranya *glucuronoxylomannan* (GXM) dan *galactoxylomannan* (GalXM). Komponen yang dianggap paling berperan dalam virulensi adalah polisakarida GXM yang juga merupakan petanda penting dalam menegakkan diagnosis kriptokokosis secara serologis.^{4,18,19}

Diagnosis Kriptokokosis

Diagnosis kriptokokosis ditegakkan berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan laboratoris serta radiologis. Pemeriksaan laboratoris dilakukan dengan identifikasi morfologi, serologi dan PCR.

Pemeriksaan secara morfologi dibagi dua yaitu pemeriksaan langsung dan kultur.

1. Identifikasi Morfologi

Pemeriksaan dengan Tinta India

Pemeriksaan laboratoris dengan menemukan sel *Cr. neoformans* pada pemeriksaan langsung dengan tinta India menghasilkan diagnosis pasti, karena ditemukannya elemen jamur di spesimen klinis. Hasil positif pada pemeriksaan tersebut bila jumlah sel jamur 10^3 - 10^4 sel/ml spesimen klinik.²

Pemeriksaan dengan Pewarnaan Giemsa

Pewarnaan Giemsa digunakan untuk spesimen klinik dari kulit yang diambil dengan teknik biopsi sentuh. Teknik tersebut dikembangkan oleh laboratorium Mikologi Departemen Parasitologi FKUI untuk mengambil spesimen kulit pada penderita HIV/AIDS dengan mikosis sistemik yang bermanifestasi di kulit.

Pemeriksaan Kultur

Pemeriksaan kultur dapat dilakukan di media *sabouraud dextrose agar* (SDA) dan agar NSA. Koloni jamur tumbuh setelah 5-7 hari. Kultur dapat dilakukan pada spesimen klinik yang berasal dari cairan otak, kurasan bronkhus, bilasan bronkhus (*bronchial alveolar lavage*; BAL) dan kulit. Cairan otak merupakan spesimen paling sensitif. Kultur pada media SDA menunjukkan koloni berwarna kuning hingga krem dan mukoid halus sedangkan kultur di media NSA koloni tampak krem kecoklatan hingga hitam dan mukoid halus.²⁰

2. Pemeriksaan Serologi

Pemeriksaan serologi merupakan salah satu pemeriksaan penunjang dalam diagnosis kriptokokosis. Deteksi antigen atau antibodi diperlukan karena kondisi pasien kriptokokosis yang mayoritas merupakan penderita HIV/AIDS memerlukan penanganan segera. Pemeriksaan langsung dengan tinta India pada individu imunokompeten hanya ditemukan 50% kasus dan pada penderita AIDS ditemukan pada 80% kasus. Hasil positif ditunjukkan bila kadar sel 10^3 - 10^4 sel/ml cairan otak.² Pemeriksaan kultur membutuhkan waktu lama yaitu lima hari.

Deteksi antibodi yang dapat dilakukan adalah IgA dan IgG. Deteksi antibodi *Cr. neoformans* memiliki kelemahan yaitu tidak menunjukkan hasil positif pada infeksi akut (terutama pada individu

imunokompeten), IgA masih positif setelah 1-2 tahun fase penyembuhan, IgG dapat persisten, pada individu imunokompromis menunjukkan hasil yang sangat kompleks dan dalam menentukan diagnosis sering tidak konsisten.² Deteksi antibodi lebih banyak digunakan dalam studi seroepidemiologi dan tidak digunakan untuk keperluan diagnosis.²

Deteksi antigen *Cr. neoformans* lebih banyak digunakan saat ini karena memiliki kelebihan: dapat menunjukkan hasil positif pada infeksi akut/kronis, sensitivitas dan spesifisitas tinggi (LA Latex agglutination 95%-100%), dapat mendeteksi polisakarida hingga 10 ng/ml sehingga dengan kadar antigen yang minimal tetap dapat mendiagnosis kriptokokosis. Deteksi antigen paling baik saat ini untuk mendeteksi antigen GXM *Cr. neoformans*. Jenis deteksi antigen *Cr. neoformans* adalah latex-aglutinasi, ELISA dan EIA. Antigen *Cr. neoformans* var. *neoformans* dapat dideteksi dari cairan otak, serum, bilasan bronkhus dan urin.

Teknik Latex Aglutinasi

Teknik latex aglutinasi merupakan teknik tersering yang dipakai saat ini bersama teknik ELISA. Tekniknya lebih sederhana dan lebih terjangkau harganya daripada ELISA. Hingga saat ini belum ada standar baku untuk menentukan diagnosis kriptokokosis. Hasil positif bila terlihat aglutinasi antara antigen GXM *Cr. neoformans* pada bahan klinik dengan antibodi monoklonal GXM yang melekat pada partikel latex. Hasil positif palsu dapat terjadi akibat *rheumatoid factor*, kontaminasi agar, *syneresis* selama pemeriksaan dengan menggunakan pipet di laboratorium, pemakaian *hydroxyethyl starch* dengan BM rendah pada saat pengolahan spesimen, reaksi silang dengan *Trichosporon beigeli* dan faktor lain yang belum diketahui. Negatif palsu sangat jarang, namun dapat terjadi karena efek prozon atau kompleks imun, rendahnya kadar antigen yang terkandung, diduga karena tipisnya kapsul pada strain tertentu dan belum dilepaskannya GXM oleh *Cr. neoformans* dari cairan tubuh yang diperiksa karena infeksi yang masih dini.² Teknik yang dipakai untuk mencegah positif palsu dan negatif palsu adalah:

- Pemberian enzim proteolitik (pronase) untuk *pre-treatment* bahan klinik
- Pemberian agen reduksi 2- β -mercaptoethanol
- Pemberian agen reduksi dithiothreitol
- Pemanasan bersamaan dengan EDTA
- Pemanasan sampai mendidih pada *waterbath*

Teknik ELISA

ELISA merupakan teknik deteksi antigen *Cr. neoformans* yang terbanyak dipakai saat ini bersama dengan teknik LA. Teknik tersebut telah memiliki standar baku untuk menentukan diagnosis kriptokokosis namun membutuhkan keahlian khusus teknisnya karena tekniknyalebih rumit dari LA dan lebih mahal dibanding LA.

Teknik EIA

Teknik EIA Dapat mendeteksi antigen dan antibodi *Cr. neoformans*, tidak dipengaruhi oleh efek prozondan tidak bereaksi dengan *rheumatoid factor* serta tidak membutuhkan pronase. Teknik EIA dapat mendeteksi antigen *Cr. neoformans* pada awal infeksi dan pada kadar konsentrasi antigen yang rendah namun harganya mahal serta cara pengerjaannya lebih rumit daripada teknik latex-aglutinasi.

3. Teknik PCR

Teknik PCR sangat spesifik, namun pengerjaannya lebih rumit dan biayanya mahal. Teknik PCR tidak digunakan untuk pemeriksaan rutin pasien dan lebih banyak dipakai untuk keperluan riset.² Pemeriksaan PCR yang saat ini telah dilakukan diantaranya adalah penentuan spesies, penentuan serotipe, penentuan *mating type* dan penentuan genotipe dari *Cr. neoformans*. Penetapan serotipe dan *matingtype* dengan PCR menggunakan primer spesifik (table 1). Primer yang digunakan untuk menentukan *C. neoformans* (*C. neoformans* var. *neoformans* dan *grubii*), berdasarkan gen *STE12* dan *GPA1*,²¹ serta *STE20*. Pasangan primer yang digunakan adalah JOHE7264/JOHE7265, JOHE7267/ JOHE7268, JOHE7270/ JOHE7272, dan JOHE7273/ JOHE7275.

Tabel 1. Kombinasi Primer untuk Penetapan Serotipe dan *Mating Type* dengan PCR

Gen	Primer	Size (bp)
MAT α serotype A (STE20 α A)	JOHE 7264 JOHE 7265	1,200
MAT α serotype D (STE20 α D)	JOHE 7267 JOHE 7268	1,200
MATa serotype A (STE20aA)	JOHE 7270 JOHE 7272	870
MATa serotype D (STE20aD)	JOHE 7273 JOHE 7275	870

Penetapan genotipe dapat menggunakan beberapa metode diantaranya DNA fingerprinting,^{23,24} PCR fingerprinting berdasarkan mikrosatelit (M13) atau minisatelit-primer spesifik,²⁵⁻²⁷ analisis *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD),^{28,29} *amplified fragment length polymorphism* (AFLP),²² *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), analisis URA5 dan gen PLBI,^{21,30} analisis sekuens intergenic spacer (IGS),³¹ *multi-locus sequense typing* (MLST)³² dan *multi-locus microsatellite typing* (MLMT).³³ Sesuai dengan kesepakatan International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) *working group on Cryptococcus*, pada tahun 2009 MLST ditetapkan sebagai metode terbaik untuk mempelajari polimorfisme *Cryptococcus*.³⁴

Berdasarkan metode MLST tersebut penyebaran *Cr. neoformans* dan *Cr. gatii* di seluruh dunia dapat dipetakan.

Penutup

Diagnosis kriptokokosis ditegakkan berdasarkan gejala klinis, pemeriksaan laboratoris serta radiologis. Pemeriksaan laboratoris dilakukan dengan identifikasi morfologi, serologi dan PCR. Pemeriksaan morfologi dengan tinta India kurang sensitif dan biakan memerlukan waktu lama. Deteksi antigen *Cr. neoformans* menunjukkan hasil positif pada infeksi akut/kronis, sensitivitas dan spesifisitas tinggi sehingga paling baik untuk mendeteksi *Cr. neoformans*.

Daftar Pustaka

1. Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, Cryptococcosis in clinical mycology. Oxford: Oxford university Press. 2003.p.188-205.
2. Casadeval A, Perfect JR. Virulence factors. In: *C. neoformans*. Washington DC: ASM Press; 1998. p.145-76.
3. Richardson MD, Warnock DW. Fungal infection diagnosis and management. 3rd ed.Oxford: Blackwell Publishing; 2003.p.215-29.
4. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melrick, &Adelberg medical microbiology. North Lake Tahoe:A large medical book. International edition. 23rd ed. 2004.p.647-9.
5. Lakshmi V, Sudha T, Teja VD, Umabala P. Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. *Indian J Med Microbiol*. 2007;25:146-9.
6. Inverarity D, Bradshaw Q, Wright P, Grant A. The Spectrum of a HIV-related disease in rural Central Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;822-31.
7. Likasitwattanakul S, Poneprasert B, SirisanthanaV. Cryptococcosis in HIV-infected children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004;12:935-9.
8. Maher D, Mwandumba H. Cryptococcal meningitis in Lilongwe and Blantyre, Malawi. *J Infect Dis*. 1994;13:59-64.
9. Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A, the French *Cryptococcosis* study group. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). *Clin Infect Dis*. 1996;23:82-90.
10. Hakim JG, Gangaidzo IT, Heyderman RS, Mielke J, Mushangi E, Taziwa A, *et al*. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. *AIDS*. 2000;14(10):1401-7.
11. Gordon SB, Walsh AL, Chaponda M, Gordon MA, Soko D, Mbwvinji M, *et al*. Bacterial meningitis in Malawian adults: pneumococcal disease is common, severe, and seasonal. *J Clin Infect Dis*. 2000;31:53-7.
12. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009;23(4):525-30.
13. Banerjee U, Datta K, Casadevall A. Serotype distribution of *C.neoformans* in patients in a tertiary care center in India. *Medical mycology*. 2004;42(2):181-6.
14. Tay ST, Rohani MY, Hoo TS, Hamimah H. Epidemiology of cryptococcosis in Malaysia. *Mycoses*. 2010;53(6):509-14.
15. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*. 2007; 21(16):2119-29.
16. Pan W, Khayhan K, Hagen F, Wahyuningsih R, Chakrabarti A, Chowdhary A, *et al*. Resistance of Asian *C.neoformans* serotype a is confined to few microsatellite genotypes. *PLoS One*. 2012;7(3):1-9.
17. Kayser FH. Fungi as human pathogen in e-book medical microbiology. Stuttgart: Thieme; 2005
18. Abbas AK, Litchman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology.7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
19. Percival A, Thorkildson P, Kozel TR. 2011. Monoclonal antibodies specific for immunorecessive epitopes of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, reduce serotype bias in an immunoassay for cryptococcal antigen. *Clin Vaccine Immunol*. 18:1292-6
20. Murray RP, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 7th Philadelphia: Elsevier; 2012.
21. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC, Meyer W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (*PLB1*) gene for subtyping of *C. neoformans* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69:2080-6.
22. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E. Molecular typing of IberoAmerican *C. neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:189-95.
23. Varma A, Kwon-Chung KJ. DNA probe for strain typing of *Cr. neoformans*. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:2960-7.
24. Spitzer ED, Spitzer SG. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *C. neoformans*. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:1094-7.
25. Meyer W, Mitchell TG. PCR fingerprinting to distinguish species and strains of yeast. In: Maresca B, Kobayashi GS editors. Molecular biology of pathogenic fungi: A laboratory manual. New York: Telos Press; 1993.p.293-302.
26. Viviani MA, Wen H, Roverselli A, *et al*. Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. *J Med Vet Mycol*. 1997;35:355-60.
27. Cogliati M, Allaria M, Tortorano AM, Viviani MA. Genotyping *C. neoformans* var. *neoformans* with specific primers designed from PCR-fingerprinting bands sequenced using a modified PCR-based strategy. *Med Mycol*. 2000; 38:97-103.
28. Chen SCA, Brownlee A, Sorrell T.C, Ruma P, Ellis DH, Pfeiffer T *et al*. Identification by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of a common molecular type of *C. neoformans* var *neoformans* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1996;173:754-8.
29. Boekhout T, van Belkum A, Leenders AC, Verbrugh HA, Mukamurangwa P, Swinne D *et al*. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47:432-42.
30. 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
31. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, Fell JW. Molecular sequence analyses of the intergenicspacer (IGS)

- associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *C. neoformans*. *Systemat Appl Microbiol.* 2000; 23:535–45
32. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *C. neoformans* var *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics.* 2006; 172:2223–8.
 33. Hanafy A, Kaocharoen S, Jover-Botella A, et al. Multi-locus microsatellite typing for *C. neoformans* var *grubii*. *Med Mycol.* 2008; 46:685–96.
 34. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *C. neoformans* and *C. gattii*. *Med Mycol.* 2009; 47(6):561–70