

Parasitisme Intraselular *Cryptococcus neoformans* dalam Makrofag

Forman E. Siagian,^{1,3} Retno Wahyuningsih^{2,3}

¹Program Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia,

²Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia,

³Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia

Abstrak

Cryptococcus neoformans, khamir berkapsul golongan Basidiomycetes, dapat menyebabkan morbiditas dan mortalitas terutama pada populasi imunokompromis seperti HIV/AIDS. Tingginya prevalensi pada populasi tersebut menunjukkan perlunya sistem imun yang adekuat, baik selular maupun humoral, untuk mencegah dan mengendalikan infeksi. Sel fagosit mononuklear (monosit dan makrofag) berperan sentral dalam respons imun protektif terhadap mikroorganisme intraselular seperti *C. neoformans*. Makrofag normal memiliki kemampuan fagositosis dengan cara internalisasi patogen untuk kemudian membunuhnya melalui proses yang melibatkan enzim-enzim lisosom. Pada pasien terinfeksi HIV, walaupun proses internalisasi *C. neoformans* oleh makrofag masih terjadi namun khamir yang sudah terinternalisasi tidak diproses lebih lanjut untuk dimusnahkan, sehingga memungkinkan khamir tinggal dalam makrofag dan berreplikasi dalam kompartemen fagolisosom. Proses tersebut kemudian dikenal sebagai parasitisme intraselular. Selain itu, juga dapat terjadi transfer lateral yang memungkinkan jamur berpindah dari makrofag terinfeksi ke makrofag lain yang belum terinfeksi. Hal tersebut kemudian memungkinkan diseminasi jamur ketempat lain dengan bantuan makrofag.

Kata kunci: khamir, monosit, fagositosis, transfer lateral, sitokin, parasit

Intracellular Parasitism of *Cryptococcus neoformans* in Macrophages

Abstract

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast belongs to basidiomycetes, causing morbidity and mortality in specialized populations such as HIV/AIDS. It is related to the immune system of the host, both, cellular and humoral immunity. Furthermore, intact and adequate immune system is needed in order to prevent and control infection. Mononuclear phagocytic cells (monocyte and macrophage) plays a central role in protective immunity against this intracellular microorganism. Normal macrophage have the ability to phagocyte and destroy internalized pathogen, through the action of lysosomal enzymes. In HIV infected individuals, even though internalization still occur but instead of being destroyed, the yeast can reside and replicate inside the phagolysosome compartment, a process known as intracellular parasitism. During that process, internalized yeast cells can undergo lateral transfer from infected macrophages to non-infected ones. This process allows dissemination of the fungus to other part of the body.

Keywords: yeast, monocyte, phagocytosis, lateral transfer, cytokines, parasite

Pendahuluan

Cryptococcus neoformans adalah khamir berkapsul golongan Basidiomycetes, patogen penting pada pasien terinfeksi HIV yang menyebabkan kriptokokosis meningeal (KM) dan sering berakibat fatal. Park *et al*,¹ memperkirakan secara global terdapat 957 900 kasus meningitis akibat *C. neoformans* yang menyebabkan 624 700 kematian tiap tahun. Kriptokokosis meningeal menjadi pembunuh utama pada pasien terinfeksi HIV dengan mortalitas yang berkisar antara 30-60%, tergantung pada lokasi geografisnya.^{1,2}

Tingginya kriptokokosis pada pejamu imunokompromi menunjukkan pentingnya sistem imun dalam pertahanan tubuh terhadap jamur tersebut. Pada kriptokokosis sistem kekebalan terutama dimediasi oleh sel T.³⁻⁵ Sistem kekebalan bawaan (*innate immunity*) dan didapat (*adaptive immunity*) sama-sama berperan dalam mengatasi infeksi. Sel fagosit mononuklear (monosit dan makrofag) berperan sentral dalam respons imun protektif terhadap mikroorganisme intraselular seperti *C. neoformans*.³⁻⁹ Makrofag normal melakukan fagositosis dengan cara internalisasi patogen untuk kemudian dibunuh melalui proses yang melibatkan enzim-enzim lisosom.³⁻¹³

Pada penderita terinfeksi HIV, walaupun proses internalisasi *C. neoformans* oleh makrofag masih terjadi namun khamir yang sudah terinternalisasi tidak diproses lebih lanjut untuk dimusnahkan, sehingga memungkinkan khamir tinggal dalam makrofag dan berreplikasi.^{5,10,11,13} Proses di atas selanjutnya dikenal sebagai parasitisme intraselular.¹³ Selain proses tersebut, dikenal proses transfer lateral, dari sel makrofag yang terinfeksi ke makrofag lain yang belum terinfeksi. Ketidakmampuan sistem kekebalan mengenali parasitisme intraseluler *C. neoformans* serta kegagalan makrofag ‘membunuh’ jamur yang sudah

diinternalisasi memungkinkan khamir tersebut menginfeksi, hidup dalam makrofag, dan bahkan berreplikasi.^{5,10,13} Parasitisme intraselular dan transfer lateral memungkinkan *C. neoformans* bertahan untuk waktu yang lama dalam tubuh pejamu tanpa menimbulkan gejala klinis berarti dan melalui cara tersebut terjadi fungemia dan diseminasi ke organ lain, terutama otak.^{4,5,13}

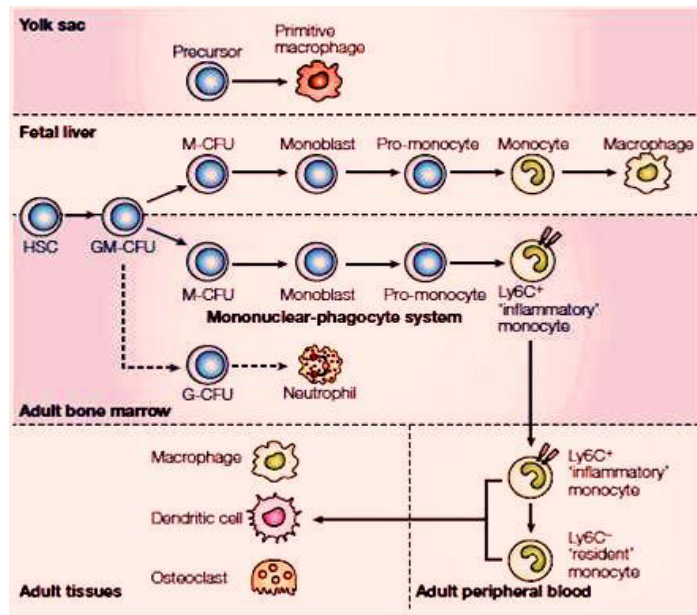
Pemahaman tentang respons imun terhadap *C. neoformans* terutama tentang interaksi parasitisme intraselular dalam makrofag serta faktor yang berpengaruh, menjadi penting dalam upaya memahami perjalanan penyakit yang menjadi dasar tatalaksana kriptokokosis.

Sel Efektor Fagositosis: Monosit dan Makrofag

Monosit ditemukan dalam aliran darah, berasal dari sel progenitor myeloid yang sama dengan neutrofil, dan kemudian dilepaskan ke dalam aliran darah perifer.⁶⁻⁹ Monosit berada dalam darah selama beberapa hari, untuk kemudian memasuki jaringan dan menjadi makrofag jaringan, tergantung pada jenis jaringan atau menjadi sel khusus seperti sel dendrit dan osteoklas.⁸ Kemampuan itu menjadi ciri atau penanda sifat dan kemampuan heterogenitas dan plastisitas sel yang termasuk populasi monosit-makrofag, yang meskipun berasal dari sel yang sama, namun dapat berkembang menjadi jenis sel yang berbeda tergantung lokasi dan lingkungan imun.⁹

Morfologi monosit matang bervariasi dengan bentuk nukleus dan taraf granularitas berbeda-beda, hingga kadang sulit dibedakan dari sel granulosit, limfosit, sel *natural killer* atau sel dendrit. Sebanyak 5-10 % populasi sel leukosit yang berada dalam sirkulasi darah perifer adalah monosit.^{8,9}

Makrofag merupakan bagian kekebalan bawaan dengan banyak peran, yaitu mulai



Gambar 1. Sistem fagosit mononuklear. Pada fase perkembangan, sel mirip makrofag yang berasal dari *yolk sac* sudah dapat ditemukan didalam hati janin. Bentuknya agak berbeda dengan makrofag produk hematopoiesis dan makrofag jaringan (makrofag orang dewasa). Pada tahap awal kehidupan, proses hematopoiesis dalam hati janin menjadi sumber utama makrofag yang dapat ditemukan pada berbagai organ. Monosit dapat menjadi *precursor* populasi makrofag di jaringan, namun makrofag jaringan kebanyakan berasal dari proses proliferasi lokal di jaringan dan bukan hasil rekrutmen monosit perifer produk hematopoiesis (dimodifikasi dari Gordon dan Taylor).⁸

dari respons primer terhadap patogen, homeostasis jaringan, proses peradangan, penyembuhan dan perbaikan jaringan.⁶ Sebagai sel yang bersifat heterogen, makrofag mampu mengenali ancaman melalui sejumlah reseptor yang dimilikinya dan mampu mengaktifkan sejumlah proses imun dengan memberikan sinyal yang akan mengaktifkan atau memodifikasi perangkat kekebalan baik secara langsung membunuh patogen atau secara tidak langsung dengan menginduksi pola ekspresi gen.^{3,6-8} Seluruh bentuk aktivasi makrofag bersifat kompleks dan multifaktor yang sangat tergantung pada status maturitas sel, lokasi peradangan serta produksi sitokin dan *pathogen associated molecular pattern* (PAMPS) yang dimiliki oleh jamur.⁶

Heterogenitas turunan makrofag sangat beragam, dan sebagian merupakan hasil spesialisasi makrofag jaringan di lingkungan mikronya. Heterogenitas morfologi monosit darah perifer mencakup variabilitas ukuran,

granularitas dan morfologi nukleus.⁶⁻⁸ Monosit awalnya dibedakan berdasarkan ekspresi CD14; namun identifikasi lebih lanjut terhadap ekspresi "*marker antigenic*" justru menunjukkan heterogenitas monosit di darah perifer.⁸ Hal tersebut memberikan bukti awal aktivitas fisiologis yang berbeda pada turunan monosit.⁶⁻⁹ Misalnya, ekspresi CD14 dan CD16 yang berbeda (dikenal juga sebagai FcγRIII) memungkinkan monosit berubah menjadi makrofag tertentu, sesuai dengan lingkungan mikronya.

Monosit yang bersirkulasi dalam aliran darah juga heterogen dan memasok makrofag matang bagi jaringan meskipun relevansi fisiologisnya belum jelas.⁶ Heterogenitas monosit dapat ditemukan pada manusia dan mencit sehingga memungkinkan penelitian tentang monosit atau makrofag manusia dilakukan pada mencit karena ada relevansi selular fungsional diantara kedua spesies.⁷ Perbedaan turunan monosit merefleksikan tahap perkembangan peran fisiologis yang

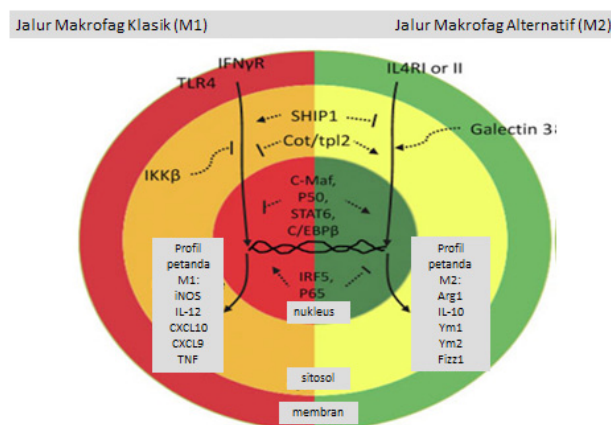
berbeda, diantaranya apakah sel monosit akan di rekrut ke daerah lesi atau masuk ke jaringan normal.⁶⁻⁹

Monosit dan makrofag merupakan efektor utama fagositosis pada sistem kekebalan nonspesifik.³⁻¹⁷ Proses tersebut dipicu pengenalan langsung mikroorganisme dan kemudian dilanjutkan dengan presentasi antigen ke sel limfosit T yang selanjutnya menginduksi sistem kekebalan spesifik untuk bereaksi terhadap antigen tersebut.^{4,6-10,13-15} Neutrofil dan makrofag yang teraktivasi akan memproduksi sitokin yang berperan dalam proses pertahanan atau peradangan.^{5,10} *Reactive oxygen* dan *nitrogen species* dihasilkan oleh sel-sel tersebut sebagai respons terhadap sitokin yang dilepaskan sel imunokompeten atau dipicu oleh sinyal yang dihasilkan oleh sistem kekebalan terkait.^{17,18} Sebagai respons terhadap sitokin dan produk mikroorganisme, sel fagosit mononuklear mengekspresikan kemampuan fungsional yang khusus dan terpolarisasi.⁴⁻¹⁰

Mengikuti nomenklatur Th1/Th2, banyak ahli merujuk polarisasi makrofag menjadi sel M1 dan M2.^{6,9} Makrofag M1 yang diaktivasi lewat induksi oleh IFN- γ atau bersama rangsangan mikrobial

(misalnya lipopolisakarida dinding sel) atau sitokin (misalnya TNF and GM-CSF).⁶⁻¹⁰ Interleukin-4 dan interleukin-13 menghambat aktivasi makrofag namun juga menginduksi aktivasi makrofag M2.^{6,10} Makrofag M2 merujuk pada sejumlah bentuk aktivasi makrofag, kecuali sel M1 klasik, yang terpajan IL-4 dan IL-13, kompleks imun, IL-10, glukokortikoid atau hormon secosteroid (vitamin D3).⁹

Secara umum, sel M1 memiliki fenotip IL-12^{tinggi}, IL-23^{tinggi}, IL-10^{rendah}; merupakan pembentuk molekul efektor efisien (*reactive oxygen and nitrogen intermediates*) dan sitokin anti-inflamasi (IL-1 β , TNF, IL-6); berpartisipasi sebagai pemicu dan sekaligus sel efektor respons imun Th1 serta membentuk kekebalan terhadap parasit intraselular dan tumor.^{8,9} Makrofag M2 secara umum memiliki fenotip IL-12^{rendah}, IL-23^{rendah}, IL-10^{tinggi} dengan kapasitas produksi sitokin inflamasi yang bergantung pada sinyal yang dihasilkan. Selain itu, sel M2 juga memiliki reseptor-reseptor tipe sapu jagat/*scavenger*, mannose dan galactose yang berbeda dengan sel M1.⁹ Secara umum, sel M2 terlibat dalam reaksi imun Th2, mempromosikan pembunuhan dan



Gambar 2. Aktivasi makrofag melalui jalur klasik maupun alternatif diinduksi oleh IFN- γ dan lipopolisakarida (LPS) atau IL 4 dan IL-13. Proses tersebut mempersiapkan makrofag untuk eliminasi patogen secara efektif, mencegah penyakit dan menginduksi perbaikan jaringan. Aktivasi diawali dibagian membran sel makrofag. Benda asing dengan reseptor yang sesuai akan merangsang makrofag untuk memproduksi sitokin. Sitokin yang diproduksi akan menentukan fungsi makrofag selanjutnya, apakah melalui jalur klasik-M1 atau jalur alternatif-M2 (dimodifikasi dari Martinez⁶).

enkapsulasi parasit, juga ditemukan pada tumor yang sudah terbentuk dan kemudian dapat menyebabkan perburukan, perbaikan jaringan dan atau *remodeling*.⁶⁻⁹ Sel supresor myeloid imatur memiliki sifat fungsional yang berhubungan dengan sel M2.

Jalur yang menyebabkan aktivasi M1 (klasik) atau M2 (alternatif) diawali di membran, dalam suatu bentuk stimulasi terhadap reseptor sitokin.⁶ Sinyal tersebut kemudian menyebar dari membran ke protein intraselular, bahkan kadang mencapai nukleus yang dapat memicu ekspresi gen secara spesifik. Reseptor sitokin *Thelper* penting untuk polarisasi sel makrofag *in vitro* dan *in vivo*.

Gangguan Aktivitas Fagositik pada Infeksi HIV

Selain mikroorganisme seperti jamur atau bakteri, virus juga dapat menginduksi aktivasi makrofag dan netrofil.^{12,18,19} Sejumlah mikroorganisme intraselular dapat mempengaruhi fungsi sel-sel tersebut. Fenomena itu memungkinkan koinfeksi atau bahkan superinfeksi yang memperberat kondisi penyakit, seperti yang kerap ditemukan pada penderita HIV.¹³

Gangguan aktivitas fagositik monosit dan makrofag pada penderita HIV terjadi akibat interaksi virus dengan monosit/makrofag melalui protein pembungkus virus yang secara langsung atau tidak langsung berikatan dengan antibodi spesifik.¹² Absorpsi virus mempengaruhi kerja reseptor CD4 dan kemokin, juga reseptor alternatif seperti fibronektin dan glikolipid membran sel. Beberapa protein virus seperti gp120, p24 dan Nef mengurangi kemampuan fagositosis dan aktivitas yang terkait dengan proses tersebut. Bahkan Tat menginduksi perubahan 'lalulintas' peredaran sel efektor fagosit dan merusak homeostasis sel fagosit mononuklear.^{4,12,19,20}

Penelitian Leong *et al*¹⁹ menunjukkan,

infeksi HIV-1 menyebabkan penurunan kemampuan makrofag alveolar mengikat dan menginternalisasi *C. neoformans*, meskipun viabilitas makrofag tidak terpengaruh.¹⁹ Gangguan fungsional tersebut menunjukkan defek pada proses antimikroba intraselular. Hal itu tidak disebabkan oleh sitotoksitas yang dimediasi virus, namun lebih oleh jenis makrofag yang terinfeksi. Cameron, (dikutip dari Leong *et al*.¹⁹) melakukan uji *in vitro* tentang aktivitas antifungal makrofag pada pasien terinfeksi HIV-1. Makrofag yang digunakan berasal dari monosit, makrofag perifer dan makrofag alveolar. Ternyata pada kondisi tersebut hanya makrofag alveolar yang tetap memiliki kemampuan antifungal.

Parasitisme Intraselular *C. neoformans* dalam Makrofag Alveolar

Monosit dan makrofag alveolar paru berperan paling awal karena jamur masuk kedalam tubuh melalui inhalasi partikel 'airborne' untuk kemudian berkolonisasi di paru lewat pembentukan kompleks primer nodus limfe. Di dalam paru jamur berada dalam keadaan *dormant*. Pada kebanyakan kasus tidak terjadi gejala klinik; yang menunjukkan pada orang yang imunokompeten terjadi pembersihan atau pengendalian infeksi sebelum terjadi diseminasi yang klinis simptomatik.¹⁻²⁴ Pada kriptokokosis kronik, jamur *Cryptococcus* sering ditemukan dalam fagosom makrofag; hal itu membuktikan sifat *C. neoformans* sebagai patogen intraselular fakultatif.¹⁶

Banyak penelitian *in vivo* menunjukkan, *C. neoformans* segera diinternalisasi oleh makrofag alveolar lewat proses fagositosis,^{4,13-16,20-22} yang dipicu oleh pengenalan sel jamur secara langsung atau dimediasi oleh reseptor mannose, glukon- β , komplemen atau antibodi.^{4,13} Fagositosis melalui dua reseptor yang disebutkan terakhir adalah yang paling efektif.⁴ Setelah berada dalam makrofag,

jamur berada dalam vakuol internal yang disebut fagosom, kemudian membentuk kompleks fagolisosom setelah berfusi dengan lisosom.^{10,13,20-24} Proses itu dikenal sebagai pematangan fagosom.^{13,24} Fagosom yang mengandung jamur akan mengalami asidifikasi, fusi dengan lisosom dan kemudian pematangan. Kompleks yang baru terbentuk itu memiliki sejumlah armamentarium yang berfungsi degradatif, termasuk diantaranya pH yang rendah, enzim hidrolitik untuk mencerna partikel, peptida bakterisidal serta kemampuan membentuk senyawa oksidatif toksik.^{17,18} Sehingga sangat efisien dalam mencerna mikroorganisme yang terjebak didalamnya.^{4,,11,15,20-22}

Setelah difagositosis, *Cryptococcus neoformans* dapat mengalami: (1) segera dibunuh, (2) jamur menjadi laten dan (3) berproliferasi di dalam fagosom.¹³ Pada keadaan dua dan tiga yang disebut juga sebagai parasitisme intraselular, jamur dapat berreplikasi di dalam makrofag meskipun terjadi pembentukan kompleks fagolisosom.¹⁹ Keberadaan sel jamur di dalam makrofag, akan menghindarkannya dari pajanan elemen sistem imun.^{10,17,20-22,24} Penelitian Tucker dan Casadevall²⁰ membuktikan hal tersebut. Pada perekaman video, proses internalisasi *C. neoformans* yang sudah dilabel dengan zat fluoresens dekstran oleh galur sel makrofag J744 16, hasilnya, kompartemen fagolisosom yang sudah mengandung jamur akan bocor karena dinding kompleks tersebut meregang sangat kuat akibat vesikel polisakarida terisi sel jamur yang bertambah jumlahnya karena proliferasi intraseluler. Selain itu, pH fagolisosom juga sedikit meningkat.¹⁹ Levitz *et al*,²⁰ menyatakan pH fagolisosom tidak berubah meskipun mengandung *Cryptococcus*. Jamur tersebut tumbuh lebih baik dalam suasana asam dibandingkan dalam pH netral atau alkali. Hal itu menunjukkan patogenitas *C. neoformans*

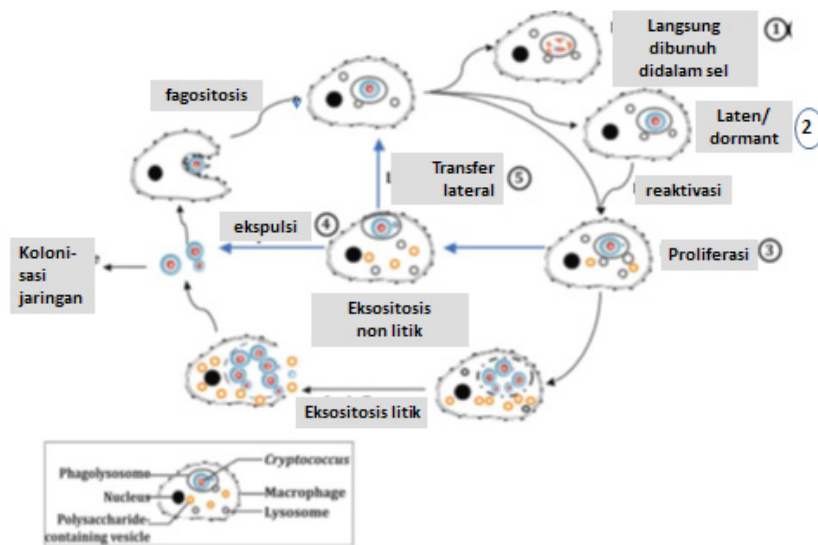
tidak tergantung kepada upaya menghindari suasana asam.

Pada parasitisme intraselular dapat terjadi (1). keluarnya sel jamur dari makrofag yang diikuti dengan hancurnya sel makrofag (eksositoses litik) atau (2). keluarnya sel jamur dari makrofag tanpa merusak inangnya (eksositoses non litik).^{113,16,22}

Eksositoses non litik merupakan aspek paling unik dalam patogenesis intraselular *Cryptococcus*. Fenomena itu juga dikenal sebagai ekstrusi atau ekspulsi atau vomositoses.^{13,22,23} Nicola *et al*,¹⁶ menggunakan nama tersebut karena frase itu menggambarkan proses tanpa membuat asumsi mengenai mekanisme. Proses tersebut biasanya berlangsung antara 2 - 24 jam pasca fagositosis dan agaknya lebih dipengaruhi oleh jenis patogen daripada jenis sel inang.⁴

Lebih lanjut, eksositoses non litik dapat diikuti oleh keluarnya sel jamur tanpa merusak makrofag terinfeksi, dan tanpa terekspos pada milieu ekstraseluler, jamur tersebut dengan segera dapat memasuki sitoplasma makrofag yang tidak terinfeksi; suatu proses yang disebut dengan transfer lateral.^{21,22} Mekanisme molekular atau biokimiawi proses tersebut masih belum jelas.

Pasca keluarnya sel jamur, baik sel pejamu maupun sel jamur secara morfologi tampak normal dan tetap dapat berproliferasi.^{13,22-24} Ma *et al*²¹ menggunakan mikroskop dengan perekam menunjukkan transfer lateral dapat terjadi pada *C. neoformans* serotype A maupun D. Selain itu, proses tersebut tidak terpengaruh oleh jenis sel (dapat terjadi pada galur sel immortal atau makrofag manusia primer) dan cara pengambilan awal (dapat terjadi *C. neoformans* yang diopsonisasi oleh serum maupun antibodi).



Gambar 3. Skema interaksi makrofag dengan *C. neoformans*. Setelah jamur difagosit oleh makrofag, maka dapat terjadi (1). langsung dibunuh didalam sel, (2). masuk ke fase laten/*dormant*, atau (3). berproliferasi didalam makrofag. Setelah itu, jamur dapat keluar dari sel makrofag dengan cara lisis (eksositosis litik) atau non lisis (eksositosis). Eksositosis non litik terjadi melalui dua cara, yaitu ekspulsi (4) dan kemudian terjadi kolonisasi jaringan, atau secara transfer lateral (5). diinfeksi ke makrofag lain yang belum terinfeksi (dimodifikasi dari Voelz²⁴).

Penutup

Telah dibahas mengenai interaksi parasitisme intraselular *C. neoformans* dalam sel makrofag serta faktor yang mempengaruhinya. Mekanisme biomolekular *C. neoformans* dalam proses tersebut masih belum jelas diketahui, demikian juga apakah ada faktor eksternal diluar jamur yang mempengaruhi respons parasitisme intraselular dalam makrofag. Pemahaman tentang hal tersebut dapat memberi jalan bagi pemahaman tentang patogenesis, upaya intervensi pengobatan bahkan pengembangan vaksin.

Daftar Pustaka

1. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among person living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009; 23 (4): 525-30

2. Wahyuningsih R., Naftasa Z, Syahbandar IN, Adawiyah R, Syam R, Mulyati M, *et al*. Yeast isolated from HIV infected patients in Jakarta Indonesia.: a first report. May 25-29, 2009. ISHAM Congress 2009. Tokyo.(poster)
3. Silva MT. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol.* 2010; 87: 805-13
4. Del Poeta M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot cell.* 2004; 3 (5): 1067-75
5. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009; 77 (1): 120-7
6. Martinez FO. Regulators of macrophage activation. *Eur J Immunol.* 2011; 41: 1531-34
7. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 209-12
8. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev Immunol.* 2005; 5(12): 953-64
9. Mantovani A, Sica Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 2005; . 23: 344-6

10. Voelz K, Lammas DA, May RC. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009; 77(8): 3450-7
11. Olszewski MA, Zhang Y, Huffnagle GB. Mechanism of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiol*. 2010; 5(8): 1269-88
12. Pugliese A, Vidotto V, Beltramo T, Torre D. Phagocytic activity in Human Immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diag Lab Immunol*. 2005; 12(8): 889-95
13. Ma H. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus*. PhD thesis. The University of Birmingham. 2009
14. Alanio A, Desnos-Ollivier M, Dromer F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal the fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. *mBio*. 2011; 2(4): e00158-11
15. Alvarez M, Burn T, Luo Y, Pirofski L, Casadevall A. The outcome of *Cryptococcus neoformans* intracellular pathogenesis in human monocytes. *BMC Microbiol*. 2009; 9:51
16. Nicola AM, Robertson EJ, Albuquerque P, Derengowski LS, Casadevall A. Nonlytic exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from macrophages occurs in vivo and is influenced by phagosomal pH. *MBio*. 2011; 2(4) e00167-11
17. Chaka W, Scharringa J, Verheul AFM, Verhoef J, Van Strijp AG, Hoepelman IM. Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(6): 753-9
18. Isman F, Palomaki GE, Natowicz MR. Lysosomal enzyme in human peripheral blood mononuclear cells and granulocytes. *Clin Chem*. 2005; 51 (3): 646-9
19. Leong MH, Reardon CC, Levitz SM, Kornfeld H. Human immunodeficiency virus type I infection of alveolar macrophages impairs their innate fungicidal activity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 966-70
20. Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *PNAS*. 2002; 99 (5):3165-70
21. Levitz SM, Nong SH, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun*. 1999; 67(2): 885-90
22. Ma H, Croudace JE, Lammas D, May RC. Direct cell to cell spread of a pathogenic yeast. *BMC Immunol*. 2007; 8: 15
23. Alvarez M, Casadevall A. Cell to cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol*. 2007; 8:16
24. Voelz K. Macrophage–*Cryptococcus* interactions during cryptococcosis. PhD thesis. The University of Birmingham. 2010