

PERBANDINGAN PEMERIKSAAN LATERAL FLOW ASSAY CAIRAN SEREBROSPINAL DENGAN TINTA INDIA DALAM MENDETEKSI MENINGITIS KRIPTOKOKUS PADA PASIEN AIDS

Darell Paruntu*, Arthur H.P. Mawuntu, Danny J. Ngantung**, Janno B. Bernadus*****

* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado
** Staf, Divisi Neuroinfeksi, Neuro-AIDS, dan Neuroimunologi Bagian Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi/

RSUP Prof. dr. R.D. Kandou Manado

*** Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado
Email: darelparuntu@yahoo.com

ABSTRACT

Background: Cryptococcal meningitis is an opportunistic infection that may occur in AIDS patients. The definite diagnosis remains a challenge and essential in administering the standardized antifungal therapy. Lateral Flow Assay (LFA) is an easy to use antigen examination of cryptococcus that is currently being developed while Indian ink staining is a standard microscopic examination to detect the pathogen in the cerebrospinal fluid (CSF) and requires a skillful examiner. **Purpose:** To know whether the LFA was able to detect more cryptococcal meningitis cases than India ink staining in R.D. Kandou hospital Manado. **Method:** A retrospective study using CSF LFA and India ink results from hospitalized AIDS patients with intracranial opportunistic infections who undergone CSF examination. We compared the result of CSF LFA and India ink in each patients and also study the clinical characteristics of those patients. **Result:** We found six eligible subjects and two samples were positive for cryptococcal meningitis. All subjects were male aged of 31-40 years old. Headache was experienced by five subjects and altered consciousness. In routine CSF analysis, mean CSF protein in subjects with positive and negative results were 30 g/dl and 145 g/dl subsequently. All samples tested positive for CSF India ink also positive for CSF LFA and samples tested negative for CSF India ink also negative for CSF LFA. **Conclusion:** CSF LFA was not better than CSF India ink stain in detecting cryptococcal meningitis in our study. However, LFA has advantage over India ink stain in the circumstance where no skillful examiner is available.

Keywords: Cryptococcal meningitis, Lateral Flow Assay, Indian Ink

ABSTRAK

Latar Belakang: Meningitis kriptokokus merupakan suatu infeksi oportunistik yang bisa terjadi pada pasien AIDS. Diagnosis definit masih menjadi tantangan dan masih bersifat esensial dalam mengatur terapi anti jamur yang terstandarisasi. Lateral Flow Assay (LFA) merupakan suatu pemeriksaan antigen yang mudah dilakukan pada kriptokokus yang sedang berkembang sementara Tinta India merupakan suatu standar pemeriksaan mikroskopik untuk mendeteksi patogen dalam cairan serebrospinal dan membutuhkan seorang ahli yang terampil. **Tujuan:** Untuk mengetahui apakah LFA mampu mendeteksi lebih banyak kasus dari pewarnaan Tinta India di RSUP Prof. R. D. Kandou Manado. **Metode:** Suatu penelitian retrospektif menggunakan hasil pemeriksaan LFA CSS dan Tinta India dari pasien AIDS yang dirawat dengan infeksi oportunistik intrakranial yang telah dilakukan pemeriksaan CSS. **Hasil:** Didapatkan 6 subyek yang memenuhi syarat dan 2 sampel positif meningitis kriptokokus. Semua subyek adalah laki-laki yang berusia 31-40 tahun. Nyeri kepala dan penurunan kesadaran dialami oleh 5 subyek. Pada analisis rutin CSS, rerata protein CSS pada subjek dengan hasil positif dan negatif adalah 30 g/dl dan

145 g/dl. Semua sampel yang diperiksa positif untuk CSS LFA juga positif untuk CSS Tinta India dan sampel yang diperiksa negatif untuk CSS LFA juga negatif pada CSS Tinta India. **Konklusi:** Pemeriksaan CSS LFA tidak lebih baik dari pewarnaan CSS Tinta India dalam mendeteksi meningitis kriptokokus pada penelitian ini. Tetapi, LFA memiliki keunggulan dibandingkan pewarnaan Tinta India pada keadaan dimana tidak ada ahli yang terampil.

Kata Kunci: Meningitis kriptokokus, Lateral Flow Assay, Tinta India

Pasien yang terinfeksi HIV (*human immunodeficiency virus*) sering kali mengalami penyulit infeksi oportunistik. Hal ini terjadi karena virus HIV terutama menyerang limfosit T CD4 (*cluster differentiation 4*)⁺ yang berperan penting dalam imunitas diperantarai sel. Penurunan dan gangguan fungsi limfosit T CD4⁺ pada pasien HIV menyebabkan pasien tersebut rentan terhadap mikroorganisme yang pada orang yang kekebalan tubuhnya baik, tidak akan menimbulkan penyakit.¹

Meningitis kriptokokus merupakan salah satu infeksi oportunistik yang biasa terjadi pada pasien terinfeksi HIV, khususnya di daerah Asia Tenggara dan Afrika. Kejadian serupa juga terjadi pada pasien dengan bentuk immunosupresi lain dan pada individu dengan imunokompeten.²

Di Indonesia, sebelum pandemi AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), kasus kriptokokus jarang dilaporkan. Sejak tahun 2004, seiring dengan pertambahan pasien terinfeksi HIV, Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) mencatat peningkatan insidens meningitis kriptokokus pada penderita AIDS menjadi sebesar 21,9%.³

Meningitis kriptokokus pada pasien AIDS terus menyebabkan

beban kematian yang substansial di negara dengan pendapatan rendah dan menengah. Angka kematian kasus meningitis kriptokokus yang berhubungan dengan HIV masih tinggi (10-30%), bahkan di negara-negara maju. Hal dikarenakan ketidakcukupan obat antijamur dan komplikasi dari peningkatan tekanan intrakranial. Tanpa pengobatan dengan antijamur yang spesifik, mortalitas dilaporkan mencapai 100% dalam dua minggu setelah munculnya gambaran klinis meningitis pada populasi terinfeksi HIV.^{2,3}

Diagnosis meningitis kriptokokus pada fase asimtomatik dan simtomatik adalah komponen kunci untuk menurunkan angka kematian. Dalam mendeteksi meningitis kriptokokus pada pasien AIDS, ada beberapa pemeriksaan yang lazim digunakan. Dua diantaranya yaitu metode pewarnaan dengan tinta India dan dengan mendeteksi antigen kapsular polisakarida pada serum dan CSS (cairan serebrospinal). Deteksi antigen dengan metode LA (*latex agglutination*) atau EIA (*enzyme-linked immunoassay*) telah tersedia beberapa dekade terakhir.⁴

Belum lama ini, ditemukan satu pemeriksaan yang sensitifitasnya hampir sama dengan LA, yaitu Pemeriksaan antigen metode LFA (*lateral flow assay*). Pemeriksaan

antigen metode ini terbukti memiliki sensitifitas yang baik dalam mendeteksi meningitis kriptokokus yang berhubungan dengan infeksi HIV. Pemeriksaan ini terbukti lebih ringan dan mudah dilakukan dibandingkan pemeriksaan LA. LFA telah dikembangkan untuk mendeteksi seluruh serotipe jamur kriptokokus. Keuntungan lainnya dari tes LFA adalah prosedurnya yang mudah.

Deteksi meningitis kriptokokus dengan pewarnaan tinta India mulai dikerjakan di Manado sejak satu tahun terakhir. Pemeriksaan kultur belum dilakukan. Pemeriksaan dengan LFA pernah dilakukan sekitar dua tahun yang lalu tetapi hanya sebatas penelitian. Saat ini pemeriksaan LFA juga belum dikerjakan secara rutin. Belum pernah ada penelitian di Manado yang membandingkan hasil pemeriksaan tinta India CSS dengan LFA.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif menggunakan data primer dan sekunder yang dikerjakan RSUP Prof. dr. R.D. Kandou Manado selang bulan Februari-November 2016. Populasi terjangkau adalah pasien terinfeksi HIV dengan meningitis kriptokokus yang dirawat inap di RSUP Prof. dr. R.D. Kandou Manado. Kriteria inklusi adalah, pasien positif HIV dengan klinis meningitis, dirawat inap di RS RDK dalam kurun waktu penelitian, usia >16 tahun. Kriteria eksklusi adalah tidak memiliki catatan medis dan tidak dilakukan pemeriksaan tinta India DAN LFA CSS. Untuk pemeriksaan LFA, digunakan stik LFA untuk kriptokokus yang dibuat oleh dan untuk

pemeriksaan tinta India digunakan teknik pemeriksaan tinta India standar. Pemeriksaan CSS dikerjakan di Laboratorium Parasitologi FK Unsrat (Biosafety Level-2).

Subyek yang memenuhi kriteria penelitian dilakukan pengambilan data sosiodemografis dan klinis dari Rekam Medis subyek di Bagian Rekam Medis RSUP Prof. Dr. R.D. Kandou. Data yang tidak tercantum di Rekam Medis namun dapat ditanyakan pada pasien atau keluarganya diambil dengan anamnesis. Data yang dicari adalah umur, jenis kelamin, pendidikan, pekerjaan, demam, nyeri kepala, penurunan kesadaran, kejang umum, defisit neurologis fokal, luaran, hemoglobin, leukosit, kadar natrium, kadar albumin, jumlah sel CD4+ awal, hasil pencitraan neurologis, jumlah sel CSS , kadar protein CSS, kadar glukosa CSS, pewarnaan Gram, dan pewarnaan BTA CSS.

Demam didefinisikan sebagai suhu badan $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ pada pengukuran di aksila. Subyek dianggap mengalami penurunan kesadaran jika nilai skala koma Glasgow <15. Kejang umum adalah bangkitan konvulsif seluruh tubuh yang disertai penurunan kesadaran. Defisit neurologis fokal adalah gangguan fungsi neurologis yang tidak bersifat difus dan hanya mempengaruhi bagian-bagian tubuh tertentu saja seperti wajah kiri, wajah kanan, lengan kiri, lengan kanan, tungkai kiri, tungkai kanan, atau lidah. Subyek mengalami anemia bila hemoglobin <10g/dl, hiponatremia bila natrium serum <134 meq/l, dan hipalbuminemia bila albumin serum

<3,5 g/dl. Jumlah sel CD4+ awal didefinisikan sebagai data jumlah sel CD4+ yang pertama kali diperiksa saat pasien dirawat atau data sebelumnya dalam jangka waktu <3 bulan. Diagnosis meningitis dibuat sesuai diagnosis keluar rumah sakit dalam rekam medis pasien. Luaran adalah keadaan pasien setelah dirawat inap. Dibagi atas hidup atau mati.

Cairan serebrospinal diperiksa secara terpisah oleh dua pemeriksa. Pemeriksa pertama memeriksa tinta India sedangkan pemeriksa ke dua secara terpisah memeriksa LFA. CSS yang diperiksa adalah sisa dari CSS yang diambil untuk pungsi lumbal. CSS dapat berupa CSS segar atau yang telah disimpan di lemari es bersuhu 4°C selama maksimal 14 hari.

Pewarnaan tinta India dilakukan dengan mengambil 1ml CSS dari tabung steril untuk disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Sedimen yang terjadi setelah sentrifugasi diambil dengan pipet untuk dipisahkan dari supernatan. Satu tetes sedimen ditetaskan di kaca obyektif. Di atas sedimen ditetaskan satu tetes tinta India. Campuran diaduk dengan sengkeli lalu ditutup perlahan dengan kaca penutup sedemikian rupa hingga tidak timbul gelembung. Selanjutnya sediaan diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x10 dan dipastikan dengan mengamati dengan pembesaran 10x40.

Pemeriksaan LFA CSS dilakukan dengan menggunakan sedimen hasil sentrifugasi. Satu tetes

specimen diluent ditetaskan ke dalam tabung steril menggunakan pipet steril. Selanjutnya, 40 µl sedimen CSS ditetaskan ke dalam tabung steril tadi menggunakan pipet steril lainnya (atau dengan mengganti kepala pipet steril). Bagian ujung putih stik LFA dicelupkan ke dalam spesimen tadi dan diinkubasi selama 10 menit. Jika timbul dua garis di strip LFA maka hasilnya positif. Jika hanya garis kontrol yang terlihat maka hasilnya negatif. Jika hanya garis positif yang terlihat maka dianggap hasil tidak valid. Perlu diwaspadai hasil positif palsu pada Tinta India karena gelembung udara dan artefak lain. Hasil negatif palsu juga dapat terjadi akibat kemampuan pemeriksa, ketidaktepatan saat pengamatan, volume sampel CSS terlalu sedikit, atau tinta terlalu tebal. Hasil positif palsu pada LFA dapat terjadi jika ada *rheumatoid like factor* sedangkan negatif palsu dapat diakibatkan kesalahan prosedur atau kesalahan kit pemeriksaan.

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan penelitian, didapatkan enam subyek yang memenuhi syarat untuk penelitian. Ada dua subyek yang terdiagnosis positif untuk meningitis kriptokokus.

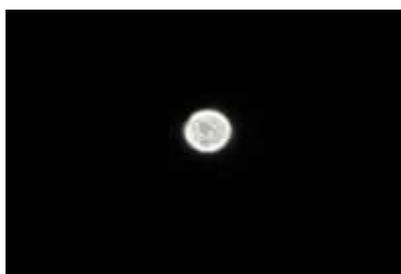
Keenam subyek yang diperiksa berjenis kelamin laki-laki dengan rentang usia 31-40 tahun. Gejala klinis yang paling banyak dikeluhkan adalah nyeri kepala dan penurunan kesadaran (lima subyek).

TABEL 1. Sebaran Pasien dengan Klinis Meningitis Kriptokokus

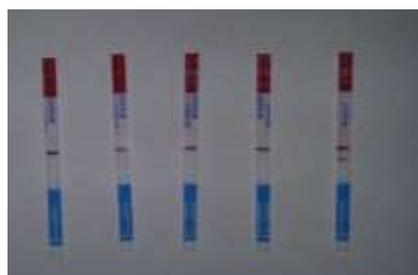
Variabel	Jenis Pemeriksaan								Total (n,%)
	LFA				Tinta India				
	Positif (n,%)	Negatif (n,%)	Positif (n,%)	Negatif (n,%)	Positif (n,%)	Negatif (n,%)	Positif (n,%)	Negatif (n,%)	
Jenis Kelamin									
Laki-laki	2	4	2	4	2	4	2	4	6 (100)
Perempuan	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
Usia									
Rerata Usia (31-40 tahun)	2	4	2	4	2	4	2	4	6 (100)
Gejala Klinis									
Demam	2	2	2	2	2	2	2	2	4 (66,7)
Nyeri Kepala	2	3	2	3	2	3	2	3	5 (83,3)
Penurunan Kesadaran	2	3	2	3	2	3	2	3	5 (83,3)
Kejang Umum	0	3	0	3	0	3	0	3	3 (50)
Gambaran Laboratorium	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	Seluruh (X)
Rerata Hb (n=6)	12,45	0,91	10,25	1,65	12,45	0,91	10,25	1,65	10,98
Rerata Leukosit (n=6)	6900	2969,84	5033,25	2961,07	6900	2969,84	5033,25	2961,07	5655,5
Rerata Albumin (n=3)	-	-	2,69	0,94	-	-	2,69	0,94	2,69
Gambaran CSS (n=4)	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	Seluruh (X)
Protein	30	0	145	134,35	30	0	145	134,35	87,5
Pencitraan Otak (n=4)	N	%	N	%	N	%	N	%	
Normal	0	0	1	25	0	0	1	25	
Penyngatan Meningen	1	25	0	0	1	25	0	0	
Hidrosefalus	1	25	0	0	1	25	0	0	
Lesi Fokal	0	0	1	25	0	0	1	25	

TABEL 2. Perbandingan Pemeriksaan Antigen LFA dengan Tinta India

		Tinta India	
		Positif	Negatif
LFA	Positif	2	0
	Negatif	0	4
Jumlah		2	4
Persentase (%)		33,3	66,7



Gambar 4. Hasil pemeriksaan Tinta India Positif pada salah satu pasien



Gambar 5. Hasil Pemeriksaan LFA pada 5 pasien

BAHASAN

Saat penelitian dilaksanakan, pasien yang masuk di Irina F RSUP Prof. R. D. Kandou Manado dan memenuhi kriteria inklusi hanya 16 pasien dan dari 16 pasien tersebut

hanya enam pasien yang dapat dijadikan sampel penelitian. Hal ini disebabkan oleh data pasien yang tidak lengkap, pasien tidak bersedia untuk dilakukan pemeriksaan, serta ada sebagian pasien yang berisiko untuk dilakukan pungsi lumbal (pengambilan CSS). Jumlah sampel ini tidak mencapai jumlah sampel minimal.

Karakteristik Subyek

Dari penelitian yang dilakukan pada sampel yang memenuhi kriteria penelitian, distribusi pasien dengan klinis meningitis kriptokokus berdasarkan jenis kelamin didapatkan bahwa semua sampel adalah laki-laki-laki, yaitu sebesar 100% (Tabel 1). Penelitian yang dilakukan oleh Charlier pada 62 pasien pasien meningoensefalitis kriptokokus menunjukkan hal yang hampir serupa dimana terdapat dominasi oleh pasien laki-laki yaitu sebesar 79% (49 pasien). Di Amerika pada akhir tahun 2010, sebanyak 76% dari semua pria dewasa dan remaja terinfeksi HIV.^{13,14}

Dari penelitian yang dilakukan pada pasien yang dijadikan sampel dan sesuai dengan kriteria inklusi, distribusi pasien dengan klinis meningitis kriptokokus berdasarkan kelompok usia didapatkan bahwa semua penderita AIDS dengan Gejala Klinis Meningitis Kriptokokus berada pada kelompok usia 31-40 (100%) (Tabel 1). Pada studi yang dilakukan Charlier pada 62 pasien dengan meningoensefalitis didapatkan bahwa

median usia pasien adalah 36 tahun dengan rentang usia 36-44 tahun.¹³

Dari penelitian yang dilakukan pada pasien yang dijadikan sampel dan sesuai dengan kriteria inklusi, distribusi pasien dengan klinis meningitis kriptokokus berdasarkan gejala klinis didapatkan bahwa terdapat 4 pasien (66,7%) mengalami demam, 5 pasien (83,3%) mengalami nyeri kepala, 5 pasien (83,3%) mengalami penurunan kesadaran dan 3 pasien (50%) mengalami kejang umum (Tabel 1). Pada studi yang dilakukan oleh Vasant B dkk, gejala klinis yang paling sering ditemui pada pasien dengan meningitis kriptokokus adalah demam (100%), nyeri kepala (100%), penurunan kesadaran (100%). Hasil tersebut menunjukkan hal yang serupa dengan hasil penelitian ini, yaitu sebagian besar pasien yang dijadikan sampel penelitian mengalami penurunan kesadaran, serta sebagian besar pasien mengalami demam dan nyeri kepala serta mengalami kejang.¹⁵

Data hasil pemeriksaan darah tidak dapat diperoleh secara lengkap untuk semua kasus. Hal ini disebabkan oleh data hilang, keterbatasan biaya, tidak sempat diperiksa. Didapatkan pada pasien dengan hasil positif pada LFA dan Tinta India rerata Hb 12,45 dan rerata leukosit 6900. Pada pasien dengan hasil negatif pada LFA dan Tinta India, rerata Hb 10,25, rerata Leukosit 5033,25 dan rerata albumin 2,69. (Tabel 1). Sampel dalam penelitian ini memperlihatkan rerata kadar

albumin serum yang rendah dan rerata kadar hemoglobin di bawah normal. Rerata leukosit masih berada dalam batas normal (Tabel 1).

Pencitraan otak dilakukan pada 4 sampel (66,7%). Dari keempat sampel tersebut, temuan yang tidak normal ditemukan pada 3 sampel. Abnormalitas yang ditemukan berupa penyngatan meningen pada 1 sampel (25%), hidrosefalus pada 1 sampel (25%), dan lesi fokal pada 1 sampel (25%) (Tabel 1).

Perbandingan Pemeriksaan LFA dengan Tinta India

Dari penelitian yang dilakukan pada pasien yang dijadikan sampel dan sesuai dengan kriteria inklusi, distribusi pasien dengan klinis meningitis kriptokokus berdasarkan pemeriksaan LFA dan Tinta India (Tabel 2) didapatkan bahwa dari 6 pasien, 2 pasien menunjukkan hasil positif dan 4 pasien menunjukkan hasil negatif pada kedua pemeriksaan, baik LFA maupun Tinta India. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan antara kedua pemeriksaan ini, kedua pemeriksaan ini dapat mendeteksi jumlah kasus yang sama banyak. Hal ini berhubungan dengan sensitivitas dari LFA dan Tinta India sendiri, dimana sensitivitas dari Tinta India 50% pada pasien yang tidak terinfeksi AIDS dan lebih dari 75% pada pasien dengan AIDS dan sensitivitas dari LFA sendiri 100%.^{6,7}

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa

Pemeriksaan LFA CSS tidak mendeteksi meningitis kriptokokus lebih baik daripada tinta India CSS pada penelitian kami.

Pada situasi tidak ada pemeriksa berpengalaman, maka pemeriksaan LFA CSS lebih unggul dibandingkan tinta India CSS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada dr. Arthur H. P. Mawuntu, dr. Danny J. Ngantung dan dr. Janno B. Bernadus dan kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam pembuatan artikel inidan memberi gagasan dalam pemikiran penulis sehingga dapat menyelesaikannya.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Robbins S, Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J.** Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Diseases of the immune system. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
2. **Bicanic T, Harrison T.** Cryptococcal meningitis. British Medical Bulletin. 2004;72:99-117
3. **Efrida, Ekawati D.** Kriptokokal Meningitis: Aspek Klinis dan Diagnosis Laboratorium. Jurnal Kesehatan Andalas. 2012;1(1):39-44.
4. **Vidal J, Boulware D.** Lateral Flow Assay for Cryptococcal Antigen: an important advance to improve the continuum of hiv

- care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*.2015;57(Suppl 19): 38-45
5. **AIDS.gov.** “What is HIV/AIDS?”. In: U.S. Government website managed by the U.S. Department of Health & Human Services. 2016. Available from: <https://www.aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/what-is-hiv-aids/>
 6. **Adawiyah R, Syam R.** Deteksi Antigen Pada Kriptokosis. *Dept. Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia* 2014;2:127-132
 7. **IMMY.CrAg LFA:** The New Gold Standard For Diagnosis Of Cryptococcal Disease. 2012
 8. **Fauci A, Lane H.** Human immunodeficiency virus disease: AIDS and related disorders. In: Kasper D, Fauci A, Longo D, Braunwald E, Hauser S, Jameson J, eds. *Harrison’s Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill. 2005;1076-139.
 9. **Mawuntu A.**Angka kematian pasien aids dengan Infeksi oportunistik otak di RSCM. [dissertation]. [Jakarta]: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2011.
 10. **Brown R, Ropper A.** Adams and Victor’s Principles of neurology 8-th ed. Infections of the nervous system (bacterial, fungal, spirochetal, parasitic) and sarcoidosis. New York: McGraw-Hill. 2005;620-2.
 11. **Casadevall A, Perfect JR.** *Cryptococcus neoformans*. Introduction to pathogen. Washington DC: American Society of Microbiology. 1998;1-28.
 12. **Kumar S, Wanchu A, Chakrabarti A, Sharma A, Bambery P, Singh S.** Cryptococcus Meningitis in HIV Infected: Experience from a North Indian Tertiary Center. 2008;56.
 13. **Charlier C, Dromer F, Lèvêque C, Chartier L, Cordoliani Y-S, et al.** Cryptococcal Neuroradiological Lesions Correlate with Severity during Cryptococcal Meningoencephalitis in HIV-Positive Patients in the HAART Era. *PloS ONE* 3(4): e1950. doi: 10.1371/journal.pone.0001950. 2008 [cited 2011 Jun 16]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001950>
 14. **Centers for Disease Control and Prevention.** HIV among Men in The United States. U.S. Department of Health & Human Services. 2016. Available from: <http://www.cdc.gov/hiv/group/gender/men/index.html>

15. **Baradkar V, Mathur M, De A, Kumar S, Rathi M.** Prevalence and Clinical Presentation of Cryptococcal Meningitis Among HIV Seropositive Patients. India: 2009 Jan-Jun;30(1):19-22.