

Sensibilidad *in vitro* de cepas chilenas de *Cryptococcus neoformans* de origen clínico

In vitro susceptibility of Chilean *Cryptococcus neoformans* strains of clinical source

Rodrigo Cruz Ch.¹, Peggy Vieille O.¹ y Jana Stojanova²

¹Laboratorio de Micología, Universidad de Valparaíso, Chile.

²Departamento de preclínicas, Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso, Chile.

Conflictos de Interés: Ninguno.

Financiamiento: Laboratorio de Micología Universidad de Valparaíso.

Recibido: 1 de septiembre de 2019 / Aceptado: 3 de marzo de 2020

Resumen

Introducción: Las infecciones por levaduras del género *Cryptococcus* afectan principalmente a pacientes con déficit de la inmunidad mediada por células. Han sido escasos los estudios de sensibilidad realizados para este género en Chile. **Objetivos:** Determinar la sensibilidad *in vitro* de *Cryptococcus* sp a antifúngicos de uso habitual y evaluar la concordancia esencial entre sensibilidad determinada por microdilución en caldo y por difusión en agar con tiras comerciales. **Materiales y Método:** Estudio descriptivo de 21 cepas aisladas desde líquido céfalo-raquídeo y sangre. Las CIM₅₀ y CIM₉₀ para fluconazol, voriconazol y anfotericina B se determinaron por microdilución en caldo (Sensititre Yeast One®) y por difusión en agar con tiras comerciales (MIC Test Strips). **Resultados:** Todas las cepas correspondieron a *C. neoformans*. Los rangos de CIM₅₀ y CIM₉₀ para cada antifúngico estudiado fueron amplios por ambos métodos. La concordancia esencial entre microdilución y difusión en agar con tiras comerciales fue de 24, 62 y 29% para fluconazol, voriconazol y anfotericina B, respectivamente. **Conclusiones:** La prueba de Sensititre Yeast One® y la de difusión en agar con tiras comerciales, MIC Test Strips, tienen una pobre concordancia esencial para fluconazol y anfotericina B.

Palabras clave: Prueba de sensibilidad microbiana; antimicóticos; *Cryptococcus neoformans*; concentraciones inhibitorias mínimas.

Abstract

Background: *Cryptococcus* yeast infections primarily affect immunocompromised patients. There have been few susceptibility studies conducted for this genus in Chile. **Aims:** To determine the *in vitro* susceptibility to commonly used antifungals and evaluate the concordance between susceptibility determined by microdilution in broth and commercially available strips. **Methods:** Descriptive study of 21 *Cryptococcus* strains, isolated from cerebrospinal fluid and blood. The MIC₅₀ and MIC₉₀ for fluconazole, voriconazole and amphotericin B was determined by broth microdilution (Sensititre Yeast One®) and by commercial drug sensitivity strips (MIC Test Strips). **Results:** All strains corresponded to *C. neoformans*. The ranges of MIC₅₀ and MIC₉₀ for each antifungal studied were wide by both methods. The essential agreement between Sensititre Yeast One test and strips was 24, 62 and 29% for fluconazole, voriconazole and amphotericin B, respectively. **Conclusions:** The Sensititre Yeast One test and MIC Test Strips exhibited poor essential concordance, especially for fluconazole and amphotericin B.

Keywords: Microbial sensitivity test; antifungal antibiotics; *Cryptococcus neoformans*; minimum inhibitory concentrations.

Correspondencia a:

Rodrigo Cruz Choappa
rodrigo.cruz@uv.cl

Introducción

La criptococosis es una infección fúngica sistémica provocada por levaduras del género *Cryptococcus*, las que son capsuladas y de amplia distribución mundial en distintos sustratos. Pueden causar enfermedades en paciente con inmunocompromiso, especialmente en aquellos con infección por VIH-SIDA^{1,2}. Los humanos pueden adquirir estas levaduras principalmente por inhalación desde el medioambiente².

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* son los principales agentes etiológicos; sin embargo, otras especies como *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. adeliensis*, *C. curvatus* y *C. uniguttulatus* también pueden provocar infecciones ocasionalmente^{3,4}. *Cryptococcus neoformans* está constituido por los serotipos A (grubii) y D (neoformans), además de existir un híbrido AD. *Cryptococcus gattii* posee los serotipos B y C⁵. Estas especies tienen similares características morfológicas en medios no selectivos. La identificación molecular ha permitido clasificar a *C. neoformans* y *C. gattii* en ocho tipos, siendo *C. neoformans* var. grubii clasificado en los tipos moleculares VNI y VNII, la variedad neoformans en VNIII y VNIV y *C. gattii* como VGI, VGII, VGIII y VGIV^{4,5}.

Cryptococcus neoformans se aísla, con frecuencia, desde suelos contaminados con deposiciones de palomas y de otras aves en las distintas regiones del mundo^{5,6}, mientras que *C. gattii* se le ha asociado al árbol eucalipto en regiones tropicales y subtropicales del mundo; sin embargo, el brote en la isla de Vancouver demostró una asociación con otros árboles, incluyendo abetos y robles, además de un rango geográfico expandido de este agente^{5,6}.

El tratamiento de estas infecciones incluye anfotericina B, fluconazol y 5-fluorocitocina; no obstante, han sido escasos los estudios de sensibilidad realizados para este género, especialmente en países como el nuestro. Esto se ha debido probablemente por la dificultad de la metodología de referencia y a la ausencia de puntos de corte clínicos bien establecidos^{7,8}.

El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) de E.U.A, en su documento M27-A permite medir las CIMs de las principales levaduras oportunistas (*Candida* spp, *C. neoformans*) demostrando una adecuada reproducibilidad inter-laboratorios⁸. También se ha desarrollado un estándar europeo, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), que en su documento EDef 7.1, ha demostrado ser equivalente al estándar CLSI en levaduras⁹.

El objetivo de este trabajo fue conocer la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de uso habitual y la concordancia esencial entre los valores de CIM determinadas por microdilución en caldo y por difusión en agar con tiras comerciales de susceptibilidad, de cepas de

Cryptococcus aisladas de pacientes de la Región de Valparaíso, Chile.

Materiales y Método

Estudio descriptivo de 21 cepas de *Cryptococcus* aisladas de líquido céfalo-raquídeo (n = 17) y sangre (n = 4), de pacientes atendidos en los hospitales Carlos van Buren, Valparaíso y Gustavo Fricke, Viña del Mar.

Identificación de especie

La identificación se realizó por morfología de las colonias, microscopia, pruebas bioquímicas para la producción de melanina en agar Staib (alpiste negro 5%, glucosa 0,1%, creatinina 0,1%, fosfato monopotásico 0,1%, agar 2%) y ureasa en agar urea de Christensen (Merck) a una temperatura de 35°C, además de la prueba comercial de asimilación ID 32 C (BioMérieux). También se sembraron en medio agar canavanina-glicina-bromotimol (CGB) para la búsqueda de *C. gattii*. Posteriormente, cada cepa fue sub-cultivada en agar Sabouraud para las correspondientes pruebas de sensibilidad antimicrobiana^{10,11}.

Estudio de sensibilidad

Para microdilución en caldo se empleó el sistema comercial Sensititre Yeast One® (Trek Diagnostic Systems) para evaluar la CIM de fluconazol, voriconazol y anfotericina B, siguiendo las indicaciones del fabricante. El inóculo se preparó tomando dos a tres colonias jóvenes de 24 horas de incubación en agar Sabouraud, homogeneizando en 1 ml de solución salina al 0,9% hasta lograr una concentración Mc Farland de 1. De esta suspensión se transfirieron 20 µL a un tubo que contenía 11 ml de caldo Yeast One® obteniendo un inóculo de 1,5-8 x 10³ ufc/ml. Las microplacas fueron inoculadas con 100 µL por pocillo e incubadas a 35°C por 72 h. Las CIM para azoles se leyeron visualmente (método colorimétrico) como la concentración más baja del antifúngico que inhibió el crecimiento en 50%, en comparación con el crecimiento del pocillo control. Para anfotericina B, la CIM fue la concentración más baja que inhibió completamente el crecimiento en comparación con el crecimiento del control^{12,13}.

Para la prueba de difusión en agar con tiras comerciales de sensibilidad se emplearon placas Petri de 90 mm de diámetro con 4 mm en altura con medio RPMI 1640 con L-glutamina, sin bicarbonato de sodio, con rojo fenol (Sigma Aldrich, Co.) suplementado con glucosa al 2%, agar 1,5% y tamponado con 165 mM MOPS pH 7,0 (Sigma Co.). Se emplearon tiras comerciales MIC Test Strips (Liofilchem®) de fluconazol, voriconazol y anfotericina B, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las placas fueron inoculadas e incubadas a 35°C por 48 h. Las CIM fueron determinadas visualmente por halo de

Tabla 1. Sensibilidad *in vitro* *Cryptococcus neoformans* según dos métodos y concordancia de resultados

		<i>Sensitre Yeast One</i>	<i>MIC Test Strips</i>
Fluconazol	Concordancia esencial	6/21 (29%)	
	Rango	1-64	0,075 - 256
	CIM ₅₀	8	2
	CIM ₉₀	16	24
Voriconazol	Concordancia esencial	13/21 (62%)	
	Rango	0,015 - 1	0,12 - 2
	CIM ₅₀	0,06	0,094
	CIM ₉₀	0,25	0,852
Anfotericina B	Concordancia esencial	5/21 (24%)	
	Rango	0,12 - 1	0,008 - 0,38
	CIM ₅₀	0,25	0,047
	CIM ₉₀	0,5	0,225

inhibición. Como cepa de control se utilizó *Candida albicans* ATCC 90028^{14,15}.

Análisis estadístico

La concordancia esencial entre los dos métodos se consideró cuando la discrepancia en las CIM no superó dos log₂ de diluciones de diferencia (es decir, no debió sobrepasar dos diluciones). Los valores de CIM para cada antifúngico y metodología fueron evaluadas usando STATA 15.0 (StataCorp)¹⁶. No evaluamos concordancia categórica debido a la falta de consenso en punto de ruptura para los antifúngicos evaluados.

Resultados

De las 21 cepas estudiadas, todas correspondieron a *C. neoformans*. En la Tabla 1 se muestran los datos de sensibilidad obtenidos, la CIM₅₀ y CIM₉₀ (concentraciones inhibitorias mínimas a la cual el 50 y 90 % de las cepas fúngicas estudiadas detienen su crecimiento) para fluconazol, voriconazol y anfotericina B, tanto por microdilución como por tiras comerciales. La concordancia esencial entre las dos metodologías fue baja para fluconazol y anfotericina B.

Discusión

Las infecciones por las distintas especies de *Cryptococcus* afectan principalmente a pacientes con algún grado de inmunocompromiso celular en las distintas regiones y países del mundo^{1,2,16}. *Cryptococcus neoformans* es la

especie más frecuentemente aislada en la mayoría de los países de América Latina, situación que coincide con nuestro trabajo¹. La mayoría de los aislados se obtienen de líquido céfalo-raquídeo debido al importante tropismo de estas especies por el sistema nervioso central, lo que también coincidió con nuestros resultados, donde sólo cuatro cepas se obtuvieron de hemocultivos¹⁷⁻¹⁹.

En Chile han sido escasos los trabajos sobre sensibilidad a los antifúngicos que incluyan levaduras del género *Cryptococcus*²⁰. Este es el primer trabajo realizado sólo con cepas de *C. neoformans* aisladas de muestras médicas.

Debido a la complejidad en la preparación de las pruebas de microdilución en caldo (guía CLSI M-27), se han buscado métodos alternativos para implementar pruebas de sensibilidad de fácil preparación dentro de la rutina de los centros de diagnóstico microbiológico. El método comercial cuyo formato se asemeja más a la metodología del CLSI es Sensitre[®] Yeast One (TREK Diagnostic Systems), aprobado por la FDA, el que se basa en la microdilución en caldo, en presencia de un sustrato cromogénico para facilitar la interpretación de la CIM^{21,22}. Varios trabajos han evaluado la equivalencia con el método estándar, demostrando que es una alternativa válida para determinar la CIM, tanto para levaduras del género *Candida*, como para *Cryptococcus* spp^{7,22,23,24}.

Si bien, el CLSI ha estandarizado las pruebas de sensibilidad antifúngica empleando métodos de difusión en agar, únicamente para el género *Candida*²⁵, Aller y cols., encontraron una concordancia de 81,1 y 89,2% para la sensibilidad de *Cryptococcus* a fluconazol y fluorocitocina entre Etest[®], la prueba original por tiras comerciales, actualmente producidas por BioMérieux, y microdilución; sin embargo, fue de 8,1 y 13,5% para itraconazol y anfotericina B, respectivamente²⁶. Thomson y cols., encontraron una concordancia de 97% para la sensibilidad a isavuconazol entre Etest[®] y el método de referencia²⁷. En nuestro estudio, se muestra que la concordancia entre los dos métodos fue solo de 24 y 29% para anfotericina B y fluconazol, respectivamente, antifúngicos que son los pilares en el tratamiento de estas infecciones²⁸. Voriconazol ha demostrado tener buena actividad contra *C. neoformans*, por lo que puede ser una alternativa al tratamiento de elección; sin embargo, su mayor costo económico y un menor número de estudios clínicos han limitado su uso²⁹. En nuestro estudio, sólo uno de los aislados con sensibilidad reducida a fluconazol (CIM \geq 16 μ g/ml) tuvo una CIM relativamente alta a voriconazol (CIM = 1 μ g/ml).

Respecto a la correlación *in vivo* de los datos *in vitro*, hay pocas referencias en la literatura médica. En lo que se refiere a *C. neoformans* y fluconazol, Witt y cols., observaron que la probabilidad de un fallo terapéutico en casos de meningitis por *Cryptococcus* era mayor de 80% cuando la CIM era \geq 16 μ g/ml³¹. En nuestro trabajo, cinco cepas

(23,8%) presentaron CIM $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ determinadas por microdilución. Si bien, la resistencia primaria es rara, se han descrito casos de resistencia secundaria relacionados con la administración previa de este fármaco, ya fuese con fines profilácticos o como tratamiento de mantención en pacientes con SIDA³⁰.

Si bien aún no se ha determinado la asociación entre los valores de CIM y la respuesta observada de los pacientes con meningitis, existe una tendencia a considerar a las especies de *Cryptococcus* con CIM $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ como no sensibles a anfotericina B³¹. En nuestro trabajo hubo sólo una cepa con CIM $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, lo que corrobora que la resistencia a este antifúngico es excepcional, como ha sido descrito en casos de tratamiento previo con este antifúngico en pacientes de SIDA y meningitis³¹.

Si bien la resistencia primaria de *C. neoformans* a los antifúngicos comunes es poco frecuente, además de no existir puntos de corte bien establecidos, creemos que

es necesario determinar CIM en caso de aislarse estas levaduras, ya que existen cepas con CIM elevada que pueden asociarse a fallo terapéutico en infecciones graves.

Conclusiones

Los rangos de CIM₅₀ y CIM₉₀ para fluconazol, voriconazol y anfotericina B fueron amplios por ambos métodos. La prueba de Sensititre Yeast One® y la de difusión en agar con tiras comerciales, MIC Test Strips, tienen una pobre concordancia esencial para fluconazol y anfotericina B.

Agradecimientos: Gerardo Peralta del Hospital Carlos van Buren de Valparaíso y Alejandro Joyas del Hospital Gustavo Fricke de Viña del Mar por colaborar con cepas de sus centros.

Referencias bibliográficas

- Teodoro V L, Gullo F P, Sardi J de C, Torres E M, Fusco-Almeida A M, Mendes-Giannini MJ. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46 (6): 759-64. doi: 10.1590/0037-8682-0025-2013.
- Chayakulkeeree M, Perfect J R. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 507-44. doi:10.1016/j.idc.2006.07.001.
- Griffin A T, Hanson K E. Update on fungal diagnostics. *Curr Infect Dis Rep* 2014; 16: 415. doi: 10.1007/s11908-014-0415-z.
- Tapia C, Correa N. Género *Cryptococcus*. *Rev Chil Infectol*. 2014; 31 (6): 719-20. doi: 10.182014000600012.
- Vieille P, Cruz R, León P, Caceres N, Giusiano G. Isolation of *Cryptococcus gattii* VGIII from feline nasal injury. *Med Mycol Case Rep*. 2018; 22: 55-7. doi: 10.1016/j.jmmcr.2018.09.003.
- Kronstad J W, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza C A, Griffiths E J, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 193-203. doi: 10.1038/nrmicro2522.
- García-Martos P, Noval J F, García-Tapia A, Marín P, Puerto J L, Sepúlveda A. Sensibilidad a antifúngicos de especies de *Cryptococcus* de interés clínico. *Med Clin (Barc)* 2002; 119 (6): 211-3. doi: 10.1016/S0025-7753(02)73366-6.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard NCCLS document M27-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standard; 2017. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>.
- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 398-405. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01935.x.
- Kwon-Chung K J, Polacheck I, Bennett J E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C) *J. Clin. Microbiol* 1982; 15 (3): 535-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272134/>.
- Staib F, Seibold M, Antweiler E, Frohlich B, Weber S, Blisse A. The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zent. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg A* 1987; 266 (1-2): 167-77. doi: 10.1016/s0176-6724(87)80030-5.
- Pfaller M A, Barry A L. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1992-96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989555>.
- Pfaller M A, Vu Q, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Grant C, et al. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1625-8. PMC263742.
- MIC Test Strip. Paper strips for determining the Minimum Inhibitory Concentration (M.I.C.) <https://www.liofilchem.com/en-us/products/featured-products/mic-test-strip-liofilchem.html>. Consultado 19/02/2020.
- <https://www.stata.com/stata15/>. Consultado 19/02/2020.
- Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragoza M T, Castañeda E, Latin American Cryptococcal Study Group. The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018; 113 (7): e170554. doi: 10.1590/0074-02760170554.
- Cortés J, Kral A, Wilson G. Criptococcosis en el Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso: una serie de casos. *Rev Chilena Infectol*. 2018; 35 (4): 420-23. doi: 10.4067/s0716-10182018000400420.
- Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora D J, da Silva P R, Andrade A A, Araujo N E, et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*. 2013; 51(6): 635-40. doi: 10.3109/13693786.2012.761737.
- Canessa J C, Cabrera D, Eskenazi J, Samalvides F. Associated factors for in-hospital mortality in patients with meningial cryptococcosis and HIV infection at a local hospital in Lima, Peru. *World J AIDS* 2011; 1 (1): 8-14. doi: 10.4236/wja.2011.11002.
- Silva V, Díaz C, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect* 2002; 19 (2): 149-56. doi: 10.4067/S0716-10182002019200016.

- 21.- FDA. 510(k) Premarket Notification. Susceptibility Test Plate. Antifungal. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K133038>. Acceso 15 Junio 2019.
- 22.- Archibald L K, Tuohy M J, Wilson D A, Nwyanwu O, Kazembe P N, Tansuphasawadikul S, et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (1): 143-5. doi: 10.3201/eid1001.020779.
- 23.- Pfaller M A, Chaturvedi V, Diekema D J, Ghannoum M A, Holliday N M, Killian S B, et al. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (7): 2155-9. doi: 10.1128/JCM.00493-08.
- 24.- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer S A, Knapp C C, Killian S, Norris H A, et al. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (3): 591-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84481/pdf/jm000591.pdf>.
- 25.- Alexander B D, Byrne T C, Smith K L, Hanson K E, Anstrom K J, Perfect J R, et al. Evaluación comparativa de los paneles Etest y Sensititre YeastOne frente al método de microdilución del caldo de referencia del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio M27-A2 para evaluar la susceptibilidad de *Candida* a siete agentes antimicóticos. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (3): 698-706. doi: 10.1128/JCM.01840-06.
- 26.- Aller A I, Martín-Mazuelos E, Gutiérrez M J, Bernal S, Chávez M, Recio F J. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46 (6): 997-1000. doi: 10.1093/jac/46.6.997.
- 27.- Thompson G R, Fothergill A W, Wiederhold N P, Vallor A C, Wickes B L, Patterson T F. Evaluation of Etest method for determining isavuconazole MICs against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (8): 2959-61. doi: 10.1128/AAC.00646-08.
- 28.- Abassi M, Boulware D, Rhein J. Cryptococcal meningitis: diagnosis and management update. *Curr Trop Med Rep* 2015; 2(2): 90-9. doi: 10.1007/s40475-015-0046-y.
- 29.- Govender N, Patel J, van Wyk M, Chiller T, Lockhart S, for the Group for Enteric, Respiratory and Meningeal Disease Surveillance in South Africa (GERMS-SA). Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (6): 2606-26. doi: 10.1128/AAC.00048-11.
- 30.- Witt M D, Lewis R J, Larsen R A, Milefchik E N, Leal M A, Haubrich R H, et al. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. *Clin Infect Dis* 1996; 22 (2): 322-8. doi: 10.1093/clinids/22.2.322.
- 31.- Meng L, Yong L, Min C, Weihua P, Lixing W. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. *Braz J Infect Dis* 2012; 16 (2): 175-9. doi: 10.1016/S1413-8670(12)70301-X.