

CRIPTOCOCOSIS: DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Y ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD *IN VITRO*

Estrella Martín-Mazuelos, Anastasio Valverde-Conde
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme. Sevilla

La criptococosis es una micosis sistémica producida por un hongo levaduriforme encapsulado denominado *Cryptococcus neoformans*, descubierto hace aproximadamente cien años por Sanfelice, quien aisló originalmente el microorganismo de un jugo de melocotón. Es una enfermedad de distribución universal que adquiere protagonismo con la aparición de la epidemia del sida. Antes era rara y afectaba a pacientes con alguna enfermedad de base que producía una alteración de la inmunidad celular (neoplasias, lupus eritematoso sistémico, trasplantes de órgano sólido o médula ósea, tratamiento con corticoides u otra medicación inmunosupresora, diabetes, sarcoidosis, etc.). Por el contrario, en los pacientes con sida, es la micosis sistémica más frecuente. Entre el 80-90% de los casos de criptococosis están descritos en este grupo, aunque la incidencia es variable, según la zona. En EEUU, Europa y Australia se observa en un 5-10% de los pacientes, mientras que en Sudamérica y África estos porcentajes aumentan al 10-30%.

Está claro, pues, que el sida es el grupo de riesgo más importante, seguido de los trasplantes. Aunque se conozcan otros múltiples factores de riesgo, se sabe que en más de la mitad de los casos de criptococosis producidos en otros grupos de pacientes distintos a los señalados anteriormente, no es posible establecer cuál es el desencadenante último. Así, la criptococosis es más frecuente en los hombres que en las mujeres, hecho relacionado tal vez con la mayor exposición de los hombres a este microorganismo.

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El género *Cryptococcus* incluye muchas especies, de las que solo *C. neoformans* se considera patógeno humano, aunque existen referencias en la literatura de otras especies (*Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus*) que han producido enfermedad en humanos, especialmente en los inmunodeprimidos.

Los criptococos son levaduras redondas u ovales (3,5-8 μm), que se reproducen por gemación única, con un cuello estrecho entre la célula madre y la hija. Excepcionalmente se observa gemación múltiple, formas alargadas y pseudohifas. Poseen una cápsula de naturaleza polisacariídica que le confiere virulencia, protegiendo al hongo de la fagocitosis, y cuyo tamaño varía dependiendo de la cepa y del medio de cultivo que se utilice para aislar la levadura. Se puede observar por examen en fresco con tinta china, tinción negativa que tiñe toda la preparación excepto la cápsula.

Crece muy bien en todos los medios de cultivo formando colonias mucosas, aunque con el tiempo pueden aparecer secas; el color es muy variable (crema, ocre, rosa, amarillo), virando a tonos más oscuros con la edad. Las cepas que poseen un cápsula muy pequeña, forman colonias similares a las del género *Candida*. Tienen metabolismo aerobio, por lo que no son fermentadoras, producen ureasa y utilizan varios hidratos de carbono. Las distintas especies de criptococos se diferencian entre sí por una serie de características: crecimiento a 37° C, asimilación de la sacarosa, lactosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, rafinosa, trealosa y dulcitol, utilización de KNO_3 y producción de ureasa y fenil-oxidasas.

Dentro de *C. neoformans*, según la composición de la cápsula, se han descrito al menos cuatro serotipos distintos, denominados A, B, C y D. Los serotipos A y D se identifican como *C. neoformans* var. *neoformans* y los B y C como *C. neoformans* var. *gattii*. Existen diferencias entre las dos variedades, tanto desde el punto de vista patogénico como de distribución geográfica, de tal forma que *C. neoformans* var. *neoformans* se ha relacionado con la infección en los pacientes inmunodeprimidos, siendo de distribución mundial, mientras que el *C. neoformans* var. *gattii* se ha descrito en infecciones de pacientes inmunocompetentes y su distribución está más restringida a países tropicales y subtropicales. También se diferenciaban estas variedades por sus características bioquímicas: los tipos B y C, asimilan los ácidos 1-málico, fumárico y succínico, producen pigmento sobre agar niger, de color verde, y sobre agar con L-cavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimilan la glicina como única fuente de carbono. Los serotipos A y D, por el contrario, no presentan estas reacciones. Existen también diferencias genéticas por hibridación del DNA. La distribución en la naturaleza es asimismo diferente: los tipos A y D se asocian con las deyecciones de palomas y otros pájaros, mientras que los otros dos tipos C se han encontrado en distintas especies de eucaliptos (*Eucalyptus calmadulensis*, *Eucalyptus rudis*, etc.) y en los koalas de Australia.

En nuestro país se han aislado los serotipos A y D y A/D de pacientes humanos, siendo el más predominante el A. El serotipo B sólo se ha aislado en animales y en muestras ambientales. No se ha encontrado ninguna cepa del serotipo C en nuestro medio.

A pesar de que las heces de paloma son la fuente más importante de infección, estos animales no padecen la enfermedad y la adquisición en el hombre es por vía respiratoria. No se han descrito casos de transmisión aérea persona a persona, pero sí a través de los órganos transplantados. Tampoco se conocen casos de transmisión directa de los animales al hombre.

La infección se adquiere por inhalación de las levaduras desecadas (<3 μm) existentes en la naturaleza. La patogenidad viene determinada por la cápsula que impide la fagocitosis y la actuación del complemento y por la enzima fenil-oxidasas que contribuye al especial neurotropismo del hongo. Cuando el criptococo llega a los alveolos pulmonares se desencadena una respuesta de la inmunidad celular y humoral del huésped, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección. Según los

modelos experimentales, la resistencia a la infección parece que depende de la activación de los macrófagos y neutrófilos por los linfocitos más sensibilizados, siendo además necesaria una buena respuesta humoral con anticuerpos opsonizantes. Debido a que los pacientes más susceptibles a la infección por este hongo presentan una alteración de la inmunidad celular o humoral, el microorganismo no es eliminado por los mecanismos de defensa apropiados cuando penetra en las vías respiratorias. Así, progresa hacia el pulmón y se disemina por vía hematógena hasta el sistema nervioso central (SNC), siendo ésta la localización más frecuente, produciendo cuadros de meningitis o meningoencefalitis. Las manifestaciones clínicas variarán en función del tipo de enfermo. La aparición de la enfermedad suele ser aguda en pacientes con sida, en tratamiento con corticoides o que sufren neoplasias hematológicas, mientras que en los restantes suele presentarse de una forma más crónica. La mayoría de los pacientes presenta signos inespecíficos de fiebre, malestar general y cefalea. Los hallazgos físicos tampoco aportan mucho, porque los signos meníngeos son poco frecuentes, al igual que los signos neurológicos focales o las convulsiones. Es importante que el médico mantenga una alta sospecha de esta enfermedad para poder así llegar al diagnóstico.

Respecto a la localización pulmonar, en los pacientes no inmunodeprimidos la afectación puede progresar, regresar espontáneamente o permanecer estable durante largos períodos de tiempo, siendo raro que haya síntomas. Suele aparecer sola, aunque puede coexistir con otras manifestaciones extrapulmonares. En los pacientes inmunodeprimidos, la afectación puede ser desde asintomática a grave. Sólo el 5-25% de los enfermos de sida presenta tos y disnea, y en pocas ocasiones existe dolor pleural y alteraciones radiológicas. La mortalidad puede llegar al 42% en este tipo de paciente.

La afectación cutánea, que aparece en el 10% de pacientes de sida con criptococosis diseminada, especialmente en el cuello y la cabeza, pueden producir lesiones similares a las producidas por el virus del *molluscum contagiosum*. Se han descrito casos de endocarditis, endoftalmítis, pielonefritis, artritis, osteomielitis, afectación ganglionar y prostatitis. Se ha demostrado que la próstata puede ser un reservorio de *C. neoformans* y constituir la causa de las recidivas en pacientes aparentemente tratados con éxito con anfotericina B. Menos del 10% de los enfermos con sida presenta fungemias aisladas y, en ocasiones, hay pacientes con todos los cultivos negativos y la detección de antígeno criptocócico positiva. En raras ocasiones, ciertas lesiones extraneurales pueden estar originadas por la inoculación directa de esta levadura, incluyendo la linfadenitis esporotricóidea, la queratitis o la peritonitis relacionada con la diálisis peritoneal.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico es difícil, ya que las formas de presentación son inespecíficas, al igual que las pruebas analíticas habituales, por lo que el diagnóstico definitivo va a ser el microbiológico. Esto es especialmente cierto en los casos de meningitis que se producen en los pacientes con sida, en los que el líquido cefalorraquídeo (LCR) no suele mostrar alteraciones o, caso de estar presentes, éstas son mínimas. Debe seleccionarse la muestra adecuada (LCR, sangre, secreciones del tracto respiratorio, piel, etc.), según el foco de infección.

Tinciones

- Tinción negativa o tinción de tinta china, que tiñe toda la preparación excepto la cápsula y permite hacer un diagnóstico presuntivo de criptococosis. Se realiza a partir del sedimento del LCR, orina u otras muestras líquidas, tras centrifugación, colocando en un portaobjetos una gota de sedimento y otra de tinta china comercial; se le pone un cubreobjetos y se observa al microscopio con un objetivo seco. La preparación estará bien hecha si se puede leer a través de ella. Hay que examinar el porta completo. La sensibilidad de la tinción oscila entre el 25-50% en los casos de meningitis, aunque en los pacientes con sida puede ser mayor. Pueden producirse falsos resultados positivos en presencia de levaduras de los géneros *Rhodotorula* y *Candida*, de otras especies de criptococos, *Klebsiella pneumoniae*, así como por artefactos. Es importante diferenciar bien la célula con doble pared refringente, con su cápsula, y hay que buscar células en fase de gemación. La técnica requiere personal entrenado y siempre hay que confirmar este diagnóstico inicial con el cultivo.
- Tinción de la cápsula con mucicarmin de Mayer que colorea la cápsula de rojo rosáceo.
- Otras tinciones usadas en histopatología, como la de la metenamina-plata o la del ácido peryódico de Schiff (PAS), que permiten identificar el *C. neoformans* por el tamaño y la gemación con base estrecha.

Cultivo e identificación

Establece el diagnóstico definitivo. Se realiza a partir del sedimento del LCR en el caso de meningitis, y a partir de otras muestras en otro tipo de infecciones. El medio de cultivo más habitual es el agar Sabouraud sin cicloheximida, en el que crece la levadura al cabo de 48-72 h de incubación, presentando las características macroscópicas ya referidas.

En el caso de una criptococemia, que se produce especialmente en pacientes con sida, el hemocultivo es el método mejor para el diagnóstico, aún a sabiendas de que el 50% de los casos quedan sin diagnosticar. De todos los sistemas, el de la lisis-centrifugación, se consideraba hasta hace poco como la técnica de elección para el diagnóstico de las fungemias. Sin embargo, según datos recientes, no parece que este método ofrezca grandes ventajas en cuanto a sensibilidad respecto a los hemocultivos habituales.

La identificación se puede hacer por los métodos convencionales de asimilación y fermentación de azúcares, que requieren hasta 14 días de incubación. Alternativamente pueden utilizarse sistemas comerciales automáticos o semiautomáticos que, en tan solo 24-48 h, identifican la mayor parte de las levaduras patógenas. Entre estos últimos, señalamos el *Microscan Yeast Identification Panel* (Microscan-Dade), *Vitek AMS-Yeast Biochemical Card* (bioMérieux), *RapID Yeast Plus* (Innovative Diagnostic System), etc.

Detección del antígeno capsular

Entre las técnicas basadas en la detección de componentes fúngicos, está la detección del antígeno capsular del *C. neoformans* por una técnica de látex, que es útil en las muestras de suero, LCR, orina e incluso en muestras respiratorias. Es una prueba que tiene alta sensibilidad y especificidad y está comercializada, pero hay que ser cautos en su interpretación. Se han descrito

resultados falsos positivos debidos a la presencia de factor reumatoide, *Trychophyton beigeli*, *Capnocytophaga canimorsus*, y en el suero de enfermos con septicemia o neoplasias. Las placas donde se realiza la prueba deben estar libres de restos de desinfectantes y detergentes. También se conocen falsos negativos, a veces por el fenómeno de prozona, que se puede corregir diluyendo la muestra o tratándola con pronasa. La sensibilidad es superior al 90%; en los pacientes con sida es incluso mayor. Sin embargo, en este tipo de enfermos, se han descrito cepas de *C. neoformans* con poca cápsula en los que la concentración de antígeno puede ser anormalmente baja. La cuantificación del antígeno del *C. neoformans* es útil para controlar la evolución de la enfermedad, ya que el título desciende si la respuesta terapéutica es buena y aumenta días antes de que se produzca una recaída, especialmente en el LCR.

Diagnóstico molecular

Es una alternativa válida para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, especialmente para aquellas cuyo diagnóstico es difícil con las técnicas convencionales. En el caso de la criptococosis ya se han mencionado las limitaciones de las técnicas de detección de antígeno. El cultivo sobre agar Sabouraud dextrosa sin cicloheximida se considera el método de referencia, aunque requiere al menos 3-4 días de incubación. Las técnicas de biología molecular podrían obviar algunos de estos inconvenientes y, en este sentido, hay algunos estudios recientes que refieren una buena sensibilidad y especificidad en muestras pulmonares y de LCR. Queda aún mucho camino por andar para que estas técnicas puedan ser utilizadas como métodos habituales en un laboratorio de Micología.

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD *IN VITRO* A LOS ANTIFÚNGICOS

El incremento de las infecciones fúngicas en los últimos años, unido al aumento de la mortalidad y morbilidad de estas infecciones, así como a la aparición de nuevas especies patógenas, ha contribuido al uso más generalizado de los antifúngicos. La aparición de resistencias asociadas a fallos terapéuticos ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos compuestos. Todas estas circunstancias han conducido a que cada vez sea más importante realizar estudios de sensibilidad *in vitro* que permitan predecir el resultado terapéutico. A su vez, el disponer de estas pruebas podrá ser útil para la investigación de nuevas drogas y para llevar a cabo estudios epidemiológicos.

Los primeros intentos datan del año 1981, cuando micólogos franceses intentan introducir técnicas similares a las que se utilizaban para las bacterias. Estos estudios fracasaron. Un año después, el NCCLS creó un subcomité para estudiar los antifúngicos, pero no se consiguen resultados de estandarización aceptables hasta 1997, con la publicación del documento NCCLS M27-A. Dicho documento normaliza las técnicas de macro y microdilución estableciendo puntos de corte para el fluconazol y el itraconazol en la candidiasis orofaríngea, y para el fluconazol en las candidemias producidas en pacientes no neutropénicos. También establece puntos de corte para la 5-fluorocitosina. Por lo que respecta a la anfotericina B, no consigue establecer criterios firmes, ya que influyen mucho los factores del huésped. Sin embargo, se sabe que valores de CMI $\geq 0,8$ $\mu\text{g/ml}$ suelen asociarse con fallo clínico.

Respecto al *C. neoformans*, este documento establece algunas normas:

- Como medio de cultivo, recomienda usar el *Yeast Nitrogen Base* (YNB) a pH 7, en lugar del RPMI 1640, debido a la dificultad de crecimiento en este último. Otros autores recomiendan el mismo medio a pH 5,4.
- Propone usar un inóculo de 10^4 ufc/ml, en lugar de $0,5-2,5 \times 10^3$ ufc/ml.
- La lectura debe realizarse a las 48 h y a 492 nm, con espectrofotómetro.
- Para la detección de las cepas de *C. neoformans* resistentes a la anfotericina B, se recomienda el uso del *Antibiotic medium n° 3* (AM3), a pH 7, de forma similar a lo propuesto para el género *Candida*, aunque existen menos datos al respecto. Hay pocos casos descritos de cepas de *C. neoformans* resistentes a la anfotericina B, siempre relacionados con un tratamiento previo con esta droga en pacientes con sida y meningitis. A pesar de todo, **la interpretación de los resultados *in vitro* está aún por definir.**

ALTERNATIVAS AL MÉTODO M27-A DEL NCCLS

Aunque este documento constituye el término de referencia, y es lo más aproximado a una estandarización, no es útil para ensayar todas las especies de hongos con todos los antifúngicos. Tampoco es el método ideal para introducir en la práctica habitual de un laboratorio clínico. Por ello se han buscado distintas alternativas, como las siguientes:

- **Métodos cualitativos (difusión en agar).** La utilidad de estos métodos para estudiar los antifúngicos ha estado limitada por la dificultad de difusión de la mayoría de estos compuestos y por la falta de correlación entre los halos de inhibición y la respuesta clínica. La excepción son las drogas más hidrosolubles, como el fluconazol y la 5-fluorocitosina. Así, los halos obtenidos con los discos de fluconazol de 25 y 50 μg en distintos medios (High Resolution Medium, Yeast Nitrogen Base, RPMI 1640 con o sin glucosa), se correlacionan bien con sus respectivos valores de CMI obtenidos por el método de referencia del NCCLS. En algunos casos, sin embargo, estos métodos no diferencian bien entre las categorías "Dependiente según dosis" y "Resistente".
- **Métodos cuantitativos:**

E-test® : Es un método cuantitativo de difusión en agar comercializado (AB Biodisk), basado en gradientes de concentración. La correlación con el método del NCCLS es variable (60-100%), según los distintos estudios, y depende de varios factores. Así, es importante el medio de cultivo, siendo mejor la casitona y el RPMI 1640 con un 2% de glucosa que el medio RPMI sin glucosa. La relación entre las distintas levaduras y los diferentes antifúngicos también es un factor a tener en cuenta. Por ejemplo, no hay buena correlación para *C. neoformans* y la anfotericina B. Una tercera variable es

el tiempo de incubación, por lo general mejor si se lee a las 24 h que a las 48 h. Por último, la lectura con los derivados azólicos puede ser más problemática por la aparición de un doble halo. En nuestra experiencia, la correlación fue buena con el fluconazol y la 5-fluorocitosina, pero no con el itraconazol.

Método colorimétrico: Es un método comercial (*Sensititre YeastOne*) basado en la técnica de microdilución del NCCLS, con un indicador de crecimiento (azul Alamar) que nos permite una lectura más objetiva mediante un cambio de color de éste. La correlación es también variable (43-100%), según los estudios y las parejas levadura/antifúngico. De nuevo, las lecturas de los azoles siguen siendo las más difíciles. Por lo que se refiere a *C. neoformans* se han obtenido valores del 94%, incluso superiores para el itraconazol y el fluconazol. La lectura de la CMI a las 24 h suele mostrar mejor correlación con la evolución clínica, excepto para la anfotericina B, en donde se aconseja efectuar la lectura a las 48 h.

- **Otros métodos:** una de las alternativas es el método de dilución en agar Yeast Morphology con distintas concentraciones de fluconazol (desde 0,125 a 256 µg/ml), inoculadas con una suspensión de *C. neoformans*. Se incubaba a 35°C y se lee a las 72 h. La CMI corresponde a la concentración donde se observa una disminución considerable del tamaño de las colonias. Algunos autores han observado una buena correlación con el método de referencia del NCCLS, de tal forma que se podría utilizar como método de cribado alternativo para el fluconazol. Además, es un método barato, que puede simplificarse más aún utilizando tres placas con 1, 8 y 32 µg/ml del antifúngico.

Se ha intentado introducir métodos con posibilidad de automatización, aunque sean más complejos. Así, un método fotométrico, basado en la cuantificación de células fúngicas mediante la reducción de un sustrato (3-4,5 dimetil 2-tiazol 2,5-difenil 2H bromuro tetrazolio), efectuando la lectura a las 24 h. En un estudio, se obtuvo una correlación del 94% con el método de referencia NCCLS.

Respecto a la correlación *in vivo* de los datos *in vitro*, hay pocas referencias en la literatura. Por lo que se refiere a *C. neoformans* y fluconazol, en el trabajo de Witt *et al*, observan que la probabilidad de un fallo terapéutico en casos de meningitis criptocócica era mayor del 80% cuando la CMI era ≥ 16 µg/ml, siempre que los hemocultivos y los urocultivos fuesen positivos, los títulos de antígeno en suero y LCR fuesen altos y los pacientes no estuvieran recibiendo 5-fluorocitosina como antifúngico adicional. Sin embargo, en un estudio realizado por nosotros, se observaba una correlación del 100% entre el fallo del tratamiento y valores de CMI ≥ 16 µg/ml, con independencia de otros condicionantes. De otro estudio, parece desprenderse que la correlación *in vitro* e *in vivo* es mayor si la lectura de los valores de la CMI se hace a las 48 h en vez de 72 h.

Por lo que se refiere a la anfotericina B, hay pocos estudios al respecto, al igual que lo que ocurre con el género *Candida*. Aún a pesar de las limitaciones del método NCCLS (M27-A), parece que la resistencia clínica está relacionada con valores de CMI $\geq 0,8$ µg/ml. También se ha introducido el medio Antibiotico nº 3 para *C. neoformans*. No hay datos de correlación con el itraconazol ni con la 5-fluorocitosina.

RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS

No se han descrito casos de resistencia primaria a la anfotericina B en las cepas de *C. neoformans*, aunque sí algún caso aislado de resistencia secundaria tras el tratamiento previo con este antifúngico en pacientes de sida y con meningitis. La resistencia primaria de *C. neoformans* a la 5-fluorocitosina es rara (1-4%), no así la secundaria, especialmente cuando se usa como único fármaco. Por ello se recomienda usarla asociada a la anfotericina B o al fluconazol. Para este último, la resistencia primaria es asimismo rara, aunque se hayan descrito casos de resistencia secundaria relacionados con la administración previa de este fármaco, ya sea con fines profilácticos o como tratamiento de mantenimiento en los pacientes con sida.

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: Approved Standard. NCCLS document M27-A, Vilanova, 1997.

Baró T, Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Alía C, López O, Méndez R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. J Clin Microbiol 1999; 37:1170-1172.

Diamond RD. *Cryptococcus neoformans*. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principles and practice of infectious diseases (5ª ed). Churchill Livingstone, New York, 1995, pp 2331-2340.

Espinel-Ingroff A, White T, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility tests. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH (eds). Manual of clinical microbiology (7ª ed). ASM Press, Washington DC, 1999, pp 1640-1652.

Kordossis T, Avlami A, Velegriaki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, Legakis NJ. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. Med Mycol 1998; 36:335-339.

Martín-Mazuelos E, Gutiérrez MJ, Aller AI, Bernal S, Martínez MA, Montero O, Quindós G. A comparative evaluation of E-test and broth dilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida sp*. J Antimicrob Chemother 1999; 43:477-481.

Miró Meda JM, Mallolas Masferrer J, Moreno Camacho A, Marco Reverter F, García Alcaide F. Infecciones por *Cryptococcus neoformans* en pacientes infectados y no infectados por el VIH. Rev Clin Esp 1997; 197:49-59.

Powderly WG. Cryptococcal meningitis and AIDS. Clin Infect Dis 1993; 17:837-842.

Rappelli P, Are R, Casu G, Fiori PL, Cappuccinelli P, Aceti A. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1998; 36:3438-3440.

Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and others yeasts of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of clinical microbiology (7^a ed). ASM Press, Washington DC, 1999, pp 1184-1199.

Witt MD, Lewis RJ, Larsen RA, Milefchik EN, Leal MA, Haubrich RH, Richie JA, Edwards JE, Ghannoum MA. Identification of patients with acute AIDS-associated meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. Clin Infect Dis 1996; 22: 322-328.