

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

LISANDRA SIUFI DE ARAUJO

**VARIABILIDADE GENÉTICA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE
CEPAS DE *Cryptococcus* spp. NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Campo Grande - MS

2024

LISANDRA SIUFI DE ARAUJO

**VARIABILIDADE GENÉTICA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE
CEPAS DE *Cryptococcus* spp. NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças Infecciosas
e Parasitárias da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, como requisito final à
obtenção ao título de Mestre em Doenças
Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Márcia de Souza
Carvalho Melhem

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana
Possato Fernandes Takahashi

Campo Grande - MS

2024

LISANDRA SIUFI DE ARAUJO

**VARIABILIDADE GENÉTICA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE
CEPAS DE *Cryptococcus* spp NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito final à obtenção ao título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Campo Grande, 17 de dezembro de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Luana Rossato
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Wellington Santos Fava
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dra. Bárbara Casella Amorim
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Aos meus pais, exemplos de vida, sabedoria e coragem para enfrentar os desafios
com amor.

À minha família e amigos pela paciência com que suportaram a minha ausência.
Aos alunos e professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas
e Parasitárias/FAMED/UFMS

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor incondicional por nós.

Aos meus pais Fernando e Norma, pelo dom da vida.

Aos meus familiares que me deram suporte, carinho e amor durante esse período, especialmente à minha irmã Adriana por seus cuidados com minha mãe.

Ao meu marido Hugueney pela paciência, amor e dedicação sempre.

Ao meu Filho Juliano e meu neto Bernardo, verdadeiros refrigerios durante esse período.

Aos parceiros no trabalho, Karla, Orelice (*in memorian*), Solange sem os quais não seria possível essa dissertação.

Aos parceiros do Apoio Técnico do LACEN/MS, Cássia, Ramão, Sônia, Cleo, Nilma, Edna, Viviane, Rudley, Edileuza, Vanessa, Eledir, Manoel, Marcos, Luiza, Nilton e Rivaldo.

Aos alunos e professores do curso com quem tanto aprendi e continuo aprendendo.

À equipe do Setor de Micologia do LAC/UFMS, Maína, Glaucia e Dra. Marilene Chang.

Aos professores e alunos do LABDIP, Babi, Weg, Hafsa em especial, Dality e Francine pelo apoio técnico, essenciais para a conclusão do trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Juliana Possato Fernandes Takahashi, pelo apoio técnico-científico e por sua disponibilidade para me atender, mesmo à distância.

À minha orientadora Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem pelas exaustivas horas de trabalho e pelo carinho com que me recebeu sob sua tutoria. Pessoa da minha mais alta estima e admiração.

À Secretaria de Estado de Saúde que me permitiu a realização deste mestrado.

“O amor é paciente, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”

Cor 13: 4-7

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por *Cryptococcus* spp, levedura, por vezes oportunista, sendo a meningoencefalite a manifestação mais frequente. Devido às distintas características de tipos moleculares dos agentes de criptococose, faz-se necessário ampliar tais conhecimentos para orientar tratamentos menos empíricos. O objetivo deste estudo foi caracterizar cepas dos agentes de criptococose, obtidos entre 2002 e 2022, de regiões do estado de Mato Grosso do Sul (MS), determinar a ocorrência de fenótipos de resistência e avaliar sua variabilidade genética. Foram compilados dados contidos na requisição de exames: ano, procedência e tipo de amostra biológica. A identificação de gênero dos isolados foram previamente realizados por meio de técnicas convencionais de microbiologia e testes bioquímicos como microcultivo em lâmina, produção de fenol-oxidase em ágar Níger, cultivo em meio de Canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB) e auxanograma (assimilação de açúcares – equipamento Phoenix®). O perfil de sensibilidade foi determinado através da microdiluição em caldo pelo método do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) com os antifúngicos: anfotericina B, fluconazol e voriconazol. Para a confirmação das espécies e da variabilidade genética, os isolados foram identificados por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), e os espectros proteicos foram analisados em dois bancos de dados: Bruker Daltonics e Mass Spectrometry Identification- MSI V2. Entre 127 isolados estudados, todas foram classificadas a nível de espécie, sendo 113 (88,98%) *C. neoformans* e 14 (11,02%) *C. gattii*. A genotipagem realizada em 98 isolados, permitiu identificação adequada (score A) para 58 isolados (59,1%). Os resultados chamam a atenção para 44 genótipos AD híbridos VNIII (44,9%). A concentração inibitória mínima (MIC), foi determinada para os 127 isolados; não foram identificadas cepas resistentes a anfotericina B (ponto de corte clínico 1 mg/L) ou não-selvagens para voriconazol (ponto de corte epidemiológico, 0,5 mg/L para *C. neoformans*. Para o fluconazol, não há pontos de corte, clínicos ou epidemiológicos definidos, e os valores de MIC situados abaixo de 16 mg/L caracterizaram cepas sensíveis. Confirmase a maior prevalência, já esperada, de *C. neoformans* (114; 89,8%) sobre *C. gattii* (13; 10,2%), na região de MS. Ressalta-se a notável frequência de genótipos híbridos, como dado inédito que requer confirmação por metodologia padrão ouro. A completa sensibilidade dos agentes de criptococose na região de MS está em concordância com dados anteriores da região Centro Oeste e do Brasil.

Palavras chave: Criptococose. Meningite criptocócica. Variação genética. Fluconazol. Anfotericina B. Farmacorresistência fúngica.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by *Cryptococcus* spp, a yeast that is sometimes opportunistic, with meningoencephalitis being the most frequent manifestation. Due to the different characteristics of the molecular types of cryptococcosis agents, it is necessary to expand this knowledge in order to guide less empirical treatments. The aim of this study was to characterize strains of cryptococcosis agents obtained between 2002 and 2022 from regions in the state of Mato Grosso do Sul (MS), determine the occurrence of resistance phenotypes and assess their genetic variability. The data contained in the test requisitions was compiled: year, origin and type of biological sample. The genus identification of the isolates was previously carried out using conventional microbiology techniques and biochemical tests such as microcultivation on slides, phenol-oxidase production on Niger agar, cultivation on Canavanine, glycine and bromothymol blue (CGB) medium and auxanogram (assimilation of sugars - Phoenix® equipment). The sensitivity profile was determined by broth microdilution using the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) method with the antifungals: amphotericin B, fluconazole and voriconazole. To confirm the species and genetic variability, the isolates were identified by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI-TOF MS), and the protein spectra were analyzed in two databases: Bruker Daltonics and Mass Spectrometry Identification- MSI V2. Of the 127 isolates studied, all were classified at species level, with 113 (88.98%) being *C. neoformans* and 14 (11.02%) *C. gattii*. The genotyping carried out on 98 isolates allowed adequate identification (score A) for 58 isolates (59.1%). The results draw attention to 44 AD hybrid VNIII genotypes (44.9%). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for the 127 isolates; no strains resistant to amphotericin B (clinical cut-off point 1 mg/L) or non-wild to voriconazole (epidemiological cut-off point, 0.5 mg/L for *C. neoformans*) were identified. For fluconazole, there are no defined clinical or epidemiological cut-off points, and MIC values below 16 mg/L characterized sensitive strains. The expected higher prevalence of *C. neoformans* (114; 89.8%) over *C. gattii* (13; 10.2%) in the Mato Grosso region is confirmed. The notable frequency of hybrid genotypes stands out as an unprecedented finding that requires confirmation by gold standard methodology. The complete sensitivity of the cryptococcosis agents in the Mato Grosso do Sul region is in line with previous data from the Midwest region and Brazil.

Keywords: Criptococcosis. Cryptococcal Meningitis. Genetic Variation. Fluconazole. Amphotericin B. Fungal drug resistance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de concentração inibitória mínima (MIC, em mg/L) de três antifúngicos para duas cepas padrões, no método de microdiluição em caldo, de acordo com EUCAST, 2023.....	34
Tabela 2 - Pontos de corte clínicos (<i>breakpoints</i> clínicos) de três antifúngicos, no método de microdiluição em caldo por EUCAST, para espécies dos complexos <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	34
Tabela 3 - Pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) para antifúngicos em testes com <i>Cryptococcus</i> spp.....	35
Tabela 4 - Sensibilidade de 127 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> , 2002-2022, MS, Brasil.....	37
Tabela 5 - Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de três antifúngicos frente a 127 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> (2002-2022), MS, Brasil.....	38
Tabela 6 - Comparação das medianas de concentração inibitória mínima (MIC) de três antifúngicos, segundo a espécie, frente a 127 isolados de <i>Cryptococcus</i> spp. (2002-2022, MS – Brasil) - Teste U de Mann-Whitney	39
Tabela 7 - Relação de concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de três antifúngicos, frente a 58 isolados de <i>Cryptococcus</i> , segundo genótipo (2002-2022), MS, Brasil.....	40
Tabela 8 - Distribuição de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> em países da América Latina (2018 e 2021)	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Clados monofiléticos, denominados como tipos moleculares, por duas metodologias e proposta de novas espécies.....	19
Quadro 2 – Recomendações para o tratamento antifúngico de meningite criptocócica em pacientes com infecção por HIV.....	22
Quadro 3 - Origem de amostras biológicas de 127 isolados de <i>Cryptococcus</i> spp. (2002-2022), MS, Brasil.....	29
Quadro 4 - Classificação dos resultados fornecidos pelo equipamento MALDI-TOF MS da Bruker Daltonics®	31
Quadro 5 - Legenda de índices da biblioteca do MSI, para identificação proteômica de espécies e complexos de <i>Cryptococcus</i> e outros gêneros fúngicos.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ano de entrada no LACEN/MS, de amostras biológicas que deram origem a 127 isolados de <i>Cryptococcus</i> (2002-2022), MS, Brasil.....	29
Figura 2 - Genótipos de 57 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> (MS, Br) identificados por MALDI-TOF MS segundo a biblioteca do MSI.....	37
Figura 3 - Correlação entre as concentrações inibitórias mínimas (MIC, mg/L) de tres antifúngicos, frente a 127 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp. Coeficiente de correlação de Spearman (Rho) e a significância estatística (p) para cada par de antifúngicos.....	39
Figura 4 - Distribuição de genótipos em 129 isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> (1997-2014) no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AmB	Anfotericina B
API	Associação Panamericana de Infectologia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BTS	<i>Bacterial Test Standard</i>
CHCA	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
ECOFF	<i>Epidemiological Cut-off Values</i>
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FCZ	Fluconazol
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
LACEN/MS	Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul
LCR	Líquido Céfaloraquidiano
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - time of flight Mass Spectrometry</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NI	Não Identificados
MS	Mato Grosso do Sul
MSI	<i>Mass Spectrometry Identification</i>
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
ST	<i>Sequencing type</i>
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
VCZ	Voriconazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1. Breve histórico da criptococose e de seus agentes	15
1.2 Epidemiologia da criptococose	15
1.3 Agentes etiológicos	17
1.4 Aspectos clínicos	20
1.5 Diagnóstico laboratorial	20
1.6 Tratamento	21
1.7 Resistência a antifúngicos nos agentes da criptococose	22
1.8 Justificativa	25
1.9 Relevância	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Desenho do estudo	28
3.2 Isolados fúngicos	28
3.3 Variáveis e fonte da coleta	30
3.4 Identificação do gênero <i>Cryptococcus</i>	30
3.4.1 Identificação presuntiva do complexo de espécies	30
3.4.2 Identificação confirmatória do complexo de espécies	30
3.5 Determinação do tipo molecular	32
3.6 Sensibilidade a antifúngicos	33
3.7 Análise estatística	35
3.8 Manutenção dos isolados	35
3.9 Considerações éticas	36
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE	64

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica, causada por *Cryptococcus* spp, levedura capsulada, por vezes, oportunista. Compromete, principalmente, os pulmões e o sistema nervoso central (SNC), sendo a meningoencefalite a manifestação mais grave (KWON-CHUNG et al., 2014).

A incidência de meningite criptocócica, em 2014, era mundialmente estimada em 223.100 (IC 95% 150.600-282.400), com base em dados de antigenemia em pacientes com CD4 abaixo de 100 células/uL. A África Subsaariana até 2014, contribuiu com 73%, 162.500 (113.600-193.900) dos casos estimados de meningite criptocócica e 75%, 135.900 (93.900-163.900) dos casos de morte estimados. A mortalidade anual global relacionada à aids, foi estimada em 15%, 181.000 casos (IC 95% 119.400-234.300) (RAJASINGHAM et al., 2017).

Rajasingham et al. (2022) definiram risco alto para criptococose em adultos com HIV com CD4 < 200 células/uL (4,3 milhões de pessoas no mundo), por país e região. Estimaram em 179.000, 4.4% (95% CI 1,6 - 7,4%) casos de antigenemia criptocócica em 2020. Estimaram, também, 152.000 casos de infecção criptocócica, resultando em 112.000 mortes relacionadas à meningite criptocócica. Mundialmente, a doença criptocócica responde, em média, por 19% (13-24%) dos óbitos relacionados à aids.

Em nosso estado, dados ainda não publicados., indicam que em 73 casos de criptococose, ocorridos entre janeiro de 2013 a dezembro de 2016, *C. neoformans* foi responsável por 87,7% dos casos (87,5% em aids) e *C. gattii* por 12,3% (88,9% em HIV negativos), com maior incidência de óbitos pelo complexo *C. neoformans* (40,6%) (TSUJISAKE, 2019).

No intuito de fortalecer a vigilância epidemiológica dos agentes de criptococose, hoje relacionados entre as Micoses Sistêmicas Prioritárias pelo Ministério da Saúde, este trabalho foi realizado, no sentido de caracterizar os complexos de espécies causadoras da doença, contribuindo para os dados existentes no estado de MS (CHANG et al., 2008; LINDENBERG et al., 2008; GOMES et al., 2011; PASA et al., 2011; TSUJISAKE, 2013 e 2019; NUNES et al., 2018). Além disso, avaliou-se a variabilidade genética, bem como a ocorrência de fenótipos de resistência.

1.1. Breve histórico da criptococose e de seus agentes

Em 1833, Kutzing denominou como gênero *Cryptococcus* (que vem de Kryptus - *hidden* - escondida) um grupo de leveduras que perderam a habilidade de produzir endósporos. A primeira descrição clínica aconteceu em 1894, por Busse na Alemanha. Ele observou corpúsculos redondos a ovais, dentro e fora de células gigantes em lesão tibial, tipo sarcoma, em paciente feminino de 31 anos. Buschke revisou o caso e descreveu como linfadenopatia e lesão secundária de pele. A paciente evoluiu para óbito com lesão de múltiplos órgãos e sem tropismo pelo SNC (BOULWARE, 2011).

Sanfelice (1894) na Itália realizou o primeiro isolamento ambiental da levedura, a partir de suco de pêssago, à qual conferiu a denominação *Saccharomyces neoformans*. Benham (1935) mudou a nomenclatura para *Cryptococcus hominis*, com duas variedades distintas com base em atributos de virulência e tipos antigênicos. Emmons (1951) isolou o agente do solo, leite de gado com mastite bovina, sucos de fruta e fezes de pombo. Lodder e Kreger-Van (1952) utilizaram a denominação *Cryptococcus neoformans*.

Na década de 1940, o Dr. Carlos da Silva Lacaz, importante médico e pesquisador da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, participou do relato dos dois primeiros casos brasileiros da doença, o primeiro em 1941 na cidade de São José do Rio Preto - SP, e o segundo em 1944 obtendo, o primeiro isolamento a partir de amostra de paciente humano no Brasil (PAPPALARDO; MELHEM, 2023; LACAZ, 2002)

Até 1970, a criptococose era considerada uma doença rara pois se tratava de uma infecção oportunística. A incidência aumentou após o início de terapias imunossupressoras. A partir da década de 1980, houve um grande aumento do número de casos, devido à epidemia causada pelo HIV (KWON-CHUNG et al., 2014).

1.2 Epidemiologia da criptococose

Cryptococcus neoformans é o complexo de espécies mais comum, em condições clínicas, representando cerca de 95% dos isolados. A doença é de

distribuição cosmopolita e, predominantemente, urbana (BERTOUT et al., 2022). Este complexo afeta, principalmente, pacientes imunocomprometidos provocando meningoencefalite (KWON-CHUNG et al., 2014). Criptococose ocorre com mais frequência em adultos jovens e pessoas de meia idade, entre 30-60 anos. A partir da década de 1980, os principais relatos são relacionados a países com alta prevalência de aids, sendo a forma disseminada comumente associada a pacientes com forte imunodepressão (MUZAZU et al., 2022; WEMBABAZI et al., 2022).

A mortalidade é alta, mesmo com tratamento, seja por gravidade da doença de base, demora na administração de antifúngicos, ausência de diagnóstico ou por falta de diagnóstico correto (GUIMARÃES, 2000). As taxas de letalidade em pacientes com aids variam e dependem de diversos fatores, entre eles: doença de base, fase do diagnóstico da doença e estratégia terapêutica (SPERANDIO et al., 2024) ; porém os valores relatados na América Latina Brasil são preocupantes, em torno de 50% (VIDAL et al., 2012).

O nicho ecológico principal de *C. neoformans* é a excreta de pombos (BERTOUT et al., 2022). Além de pombos, outras aves também são importantes reservatórios, sobretudo aquelas relacionadas à criação em cativeiro. Microfocos foram relacionados à madeira em decomposição, poeira domiciliar, *habitat* de aves, morcegos e outros animais. Esses locais contêm concentração, relativamente, estável de matéria orgânica, o que pode representar fontes ambientais potenciais para a infecção (BRASIL, 2024).

A criptococose causada por *C. gattii* tem distribuição distinta, em regiões tropicais e subtropicais (KWON-CHUNG et al., 2014). Em 1999, na região do noroeste Pacífico da América do Norte, Ilha de Vancouver no Canadá, houve uma importante epidemia de criptococose, pelo complexo de espécies *C. gattii*, desconhecido na região e, teoricamente, restrito aos climas tropical e subtropical (DATTA et al., 2009). Mais de 200 casos de infecção por *C. gattii* foram documentados em humanos e mais de 400 em animais, dentre estes: gatos, cães, golfinhos, pássaros, furões, lhamas, cavalos, representando alta incidência anual na Colúmbia Britânica, CA (MACDOUGALL et al., 2007).

A doença por *C. gattii* compromete, também, indivíduos hígidos e provenientes da zona rural. No estado do Pará o aumento de casos de criptococose em crianças, tem sido atribuído à migração da zona rural para a zona urbana e ao

desmatamento da região amazônica, onde há predomínio ambiental de *C. gattii*, bem como, consequência de desnutrição e ocorrência de aids (CORRÊA et al., 1999).

Cryptococcus gattii foi isolado de flores e sementes de *Eucalyptus camaldulensis*, espécie vegetal muito comum na Austrália de onde a madeira foi exportada para outros países, como Brasil, podendo ter provocado a dispersão geográfica desse agente (NISHIKAWA et al., 2003). *C. gattii* foi obtida de ocos de diversas espécies de árvores no Rio de Janeiro (LAZERA; WANKE; NISHIKAWA, 1993).

1.3 Agentes etiológicos

A cápsula que circunda a célula da levedura de *Cryptococcus* é composta de polissacarídeos que determinam sorotipos A e D para *C. neoformans*, e sorotipos B e C para *C. gattii* (EVANS; SORENSEN; WALLS, 1953). A cápsula é um dos principais fatores de virulência, pois minimiza o reconhecimento por células do hospedeiro, impedindo sua ligação aos antígenos de parede e diminuindo, assim, a resposta imune. Foi demonstrado que *C. neoformans* libera polissacarídeo capsular nos tecidos do hospedeiro, sendo a base para diagnóstico imunológico da doença (MARTINEZ; MOUSSAI; CASADEVALL, 2004). A virulência dos agentes de criptococose está relacionada a diversos outros atributos, como produção de melanina, um agente antioxidante, formação de células gigantes ou células titãs, responsáveis pela cronificação da doença e células anãs que atravessam a barreira hematoencefálica, além da formação de urease (SILVA et al., 2020).

Dois complexos de espécies são, atualmente, considerados como agentes da criptococose: *C. neoformans* e *C. gattii*, que acomodam a proposta da existência de 8 espécies que apresentam diferenças bioquímicas, antigênicas e epidemiológicas. “Complexo de espécies” em biologia, geralmente, implica que duas ou mais espécies crípticas estão escondidas sob um nome de espécie. Ao contrário de uma “espécie”, um “complexo” não tem estatuto nomenclatural e não requer mudança de nome. No entanto, os complexos de espécies são claramente definidos por métodos diagnósticos convencionais que podem ser validados por dados moleculares (HAGEN et al., 2017).

Cada um dos dois complexos de espécies compreende, no mínimo, 4 tipos moleculares distintos quando analisados pelo método *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), técnica do polimorfismo de comprimento de fragmentos. Em *C. neoformans*, ocorrem os genótipos VNI a VNIV, além de VNB e, em *C. gattii*, ocorrem VGI a VGIV (MEYER et al., 2003), sendo que mais recentemente foram descritos VGV e VGVI (FARRER et al., 2019; HAGEN et al., 2015). Como o conceito de espécies filogenéticas se tornou amplamente aceito a partir do final da década de 1990, as árvores filogenéticas construídas com base em sequências, adquiridas através de *multilocus sequence typing* (MLST) e outras técnicas de tipagem molecular, como a *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), mostraram que tanto as cepas de *C. neoformans* como as de *C. gattii* eram compostas por múltiplos clados monofiléticos geneticamente diversos, num total de 9 (COGLIATI, 2013; MEYER et al., 2003; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2009). Os tipos moleculares determinados por AFLP são classificados em AFLP 1 a AFLP 7 (BOEKHOUT et al., 1997).

Os principais clados monofiléticos para os dois complexos de espécies podem ser designados por ambos os métodos, a saber: tipos moleculares VNI (AFLP1), VNII (AFLP1A/IB), VNIII (AFLP3) e VNIV (AFLP2) para *C. neoformans* e tipos moleculares VGI (AFLP4), VGII (AFLP6), VGIII (AFLP5) e VGIV (AFLP6) para *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2017).

Em respeito à sua distribuição, para *C. neoformans* os tipos moleculares VNI/AFLP1, VNIV/AFLP2 e seus híbridos, representam, respectivamente, 59,1%, 18,3% e 18,3% dos casos de criptococose, segundo um estudo global. O complexo *C. gattii* representa, apenas, 4,1% estando presente mais na Europa, VGI/AFLP4 e VGIV / AFLP7 (COGLIATI, 2013).

A proposta de Hagen et al. (2015) visou dividir os dois agentes de criptococose em 7 espécies haplóides e 4 espécies híbridas aneuplóides/diplóides designando sete clados por MLST identificados entre 115 estirpes de *C. neoformans* e *C. gattii* com novas espécies: *C. neoformans* em duas espécies e *C. gattii* em cinco espécies. A adoção universal de uma nova nomenclatura deve ser adiada até que estudos mais detalhados, empregando maior número de isolados, justifiquem a importância clínica e biológica das novas espécies (HAGEN et al., 2017). O Quadro 1 mostra os tipos moleculares híbridos e não híbridos, determinados por RFLP e AFLP, e sua correlação com as espécies propostas por (HAGEN et al., 2015), dentro de cada complexo.

Quadro 1 - Clados monofiléticos, denominados como tipos moleculares, por duas metodologias e proposta de novas espécies

COMPLEXO DE ESPÉCIES E VARIEDADE	TIPO MOLECULAR	ESPÉCIE PROPOSTA DE HAGEN et al., 2015
NÃO HÍBRIDO		
<i>C. neoformans</i> variedade <i>grubii</i>	VNI/VNII/VNB (AFLP1, AFLP1A, AFLP1B)	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i> variedade <i>neoformans</i>	VNIV (AFLP2)	<i>C. deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	VGI (AFLP4)	<i>C. gatti</i>
	VGII (AFLP6)	<i>C. deuterogattii</i>
	VGIII (AFLP5)	<i>C. bacillisporus</i>
	VGIV (AFLP7)	<i>C. tetragattii</i>
	VGIV/VGIIIc (AFLP10)	<i>C. decagattii</i>
HÍBRIDO		
<i>C. neoformans</i>	VNIII ou AD híbrido (AFLP3)	<i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i> hybrid
<i>C. gattii</i>	DB híbrido (AFLP8)	<i>C. deneoformans</i> + <i>C. gatti</i> híbrido
<i>C. gattii</i>	AD híbrido (AFLP9)	<i>C. neoformans</i> + <i>C. gatti</i> híbrido
<i>C. gattii</i>	AB híbrido (AFLP11)	<i>C. neoformans</i> + <i>C. deuterogattii</i> híbrido

Fonte: Adaptado Kwon-Chung et al. (2017)

Centenas de subtipos moleculares (*sequencing type* - ST) foram descobertos a partir do sequenciamento de diversos *loci*. Estes STs apresentam diferenças clínicas e eco epidemiológicas importantes, como variações na distribuição geográfica, prevalência, virulência, resistência aos antimicrobianos, taxas de mortalidade e prognóstico da infecção, justificando assim a sua significância (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021).

1.4 Aspectos clínicos

A forma mais frequente da criptococose é a meningite, ou meningoencefalite, aguda ou subaguda. Lesões focais únicas ou múltiplas podem aparecer no parênquima, cerebral ou pulmonar, como se fossem neoplasias, cistos ou nódulos, sendo frequentemente associadas a *C. gattii*. As condições de imunidade do paciente influenciam nas manifestações clínicas (BRASIL, 2024).

Em pacientes com aids, com cefaléia, febre, demência progressiva e confusão mental, recomenda-se investigação de meningite criptocócica. Nestes pacientes, e em outros sob condições imunossupressoras, a meningoencefalite é aguda e pode apresentar grande variedade de sinais, ou não apresentar sinais de irritação meníngea. Em indivíduos imunocompetentes podem aparecer sintomas graves, tais como: cefaléia, febre, vômitos, alterações visuais, rigidez de nuca, ataxia, alteração sensorial e afasia. Pode ocorrer diminuição da capacidade mental (30%), redução da acuidade visual (8%), paralisia permanente de nervos cranianos (5%), hidrocefalia, torpor e coma (BRASIL, 2024).

1.5 Diagnóstico laboratorial

O Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde recomenda que os principais exames a serem realizados no líquido céfalo raquidiano (LCR) para o esclarecimento diagnóstico de casos suspeitos de meningite criptocócica são: i) exame micológico direto com preparação da tinta da China, e ii) cultura para fungos como “padrão-ouro” (BRASIL, 2024).

Em amostras coradas com tinta da China é possível observar bem a cápsula, como um halo incolor que envolve a levedura, em contraste com um fundo preto dado

pela tinta. As colônias de levedura crescem bem sob temperaturas de 25 a 37 °C em vários tipos de meio de cultura, sendo o ágar Sabouraud o mais comum em laboratórios de micologia médica. O crescimento é inibido em meios de cultura que contêm cicloheximida. Após 48 h de incubação, as colônias de *Cryptococcus* iniciam crescimento com textura mucóide, brilhantes e de coloração creme, com aspecto de “leite condensado”, em regra, sem formação de pseudohifas (LACAZ, 2002).

O gênero *Cryptococcus* pode ser identificado, de modo presuntivo, em meios de cultura que possuam em sua fórmula, substâncias fenólicas que, devido à produção de fenoloxidase pela levedura, são transformadas em melanina, conferindo às colônias coloração castanho-amarronzada. *C. gattii* possui a habilidade de crescer em meios que contenham canavanina, glicina e azul de bromotimol, que indicam, fenotipicamente, este complexo de espécie (LACAZ, 2002).

Os testes bioquímicos, para definição do complexo de espécies, como assimilação de açúcares e fontes de nitrogênio (auxanograma), podem ser realizados de modo manual ou através de equipamentos automatizados, como Phoenix® (BD) e VITEK® (bioMérieux). A identificação proteômica por ionização e dessorção a laser utilizando *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) permite confirmação do complexo de espécie (ZVEZDANOVA et al., 2020). Os espectros adquiridos por MALDI-TOF MS podem ser analisados em bancos de dados distintos que podem permitir a identificação do tipo molecular, além do complexo de espécie (FIRACATIVE et al., 2012).

1.6 Tratamento

Sem vacinas disponíveis para prevenção, três antifúngicos têm eficácia *in vivo* para a maior população suscetível à doença, aqueles vivendo com HIV/aids: anfotericina B, fluconazol e 5-flucitosina. Para o tratamento há três fases, sendo indução, consolidação e manutenção. Anfotericina B e 5-flucitosina são recomendadas na fase de indução, enquanto o fluconazol é recomendado para consolidação e manutenção. Fluconazol também é utilizado para indução quando a anfotericina não está disponível (API, 2019).

A Associação Panamericana de Infectologia (API) publicou um Manual Prático ‘Infecções fúngicas sistêmicas’ com recomendações para o tratamento (API et al., 2019), inicialmente, recomendações para pacientes com infecção por HIV - Tratamento de indução, pelo menos duas semanas, como segue descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Recomendações para o tratamento antifúngico de meningite criptocócica em pacientes com infecção por HIV

ESQUEMAS DE 1º ESCOLHA AMBD 0,7-1,0 mg/kg/dia + fluocitosina 100 mg/kg/dia AMBL 3-4 mg /kg/dia + flucitosina 100 mg/kg/dia
ESQUEMAS ALTERNATIVOS AMBCL 5 mg/kg/dia + fluocitosina 100 mg/kg/dia AMBD 0,7-1,0 mg/kg/dia + fluconazol 800-1200 mg/dia AMBL 3-4 mg/kg/dia + fluconazol 800 mg/kg/dia Fluconazol 800 mg/dia + 5-fluocitosina 100 mg/kg/dia
PARA A FASE DE CONSOLIDAÇÃO (PELO MENOS 8 SEMANAS) Fluconazol 400 mg/dia, quando a indução foi com fluocitosina Fluconazol 800 mg/dia, quando a indução foi sem fluocitosina
DURANTE A FASE DE MANUTENÇÃO: Fluconazol 200 mg/dia (pelo menos 1 ano)

Adaptado de API, 2019

1.7 Resistência a antifúngicos nos agentes da criptococose

A resistência dos agentes da criptococose é verificada *in vitro* por métodos para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), do inglês *minimal inhibition concentration* (MIC) em meio líquido. A dificuldade, porém, de interpretação dos valores de MIC pela ausência de pontos de corte clínicos, ainda é um problema a ser resolvido. Os métodos de referência, norte americano - *Clinical laboratory standard institute* (CLSI) e europeu - *European committee of antimicrobial susceptibility testing* (EUCAST), estão disponíveis para orientar a execução de testes de sensibilidade a antifúngicos de isolados dos complexos de espécies de *Cryptococcus* e outras

espécies fúngicas (MELHEM et al., 2024). O EUCAST propôs dois pontos de corte, sendo um clínico (*breakpoint*) para anfotericina B (1 mg/L) e outro epidemiológico (ECOFF) e provisório para voriconazol (0,5 mg/L) frente a isolados de *C. neoformans* (EUCAST, 2023a). Para *C. gattii* existe apenas uma proposta de ponto de corte epidemiológico provisório para anfotericina B (0,5 mg/L) e definitivo para posaconazol (1 mg/L).

Os métodos de microdiluição são os mais adequados para determinar o MIC, pois permite estimar, quantitativamente, a atividade antimicrobiana “*in vitro*” contra microrganismos. MIC é a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível do microrganismo analisado. O resultado de MIC é expresso em mg/L e é uma importante ferramenta para vigilância de resistência, para estudos epidemiológicos e para comparação da atividade *in vitro* de novos medicamentos, bem como, dos já existentes (EUCAST, 2023b).

A resistência à anfotericina B é pouco encontrada e o primeiro caso de uma falha terapêutica foi relatado em um paciente com aids e infecção por *C. neoformans*. O MIC para a cepa era de 4 mg/L, obtido pela técnica de microdiluição por CLSI (POWDERLY, 1996). Raros dados laboratoriais se seguiram indicando isolados com baixa sensibilidade ao polieno, mas sem análise da correlação com a clínica (PFALLER et al., 2005).

Para fluconazol, alguns estudos já demonstraram que valores elevados de MIC contra cepas de *C. neoformans* foram preditivos de falha clínica, principalmente, valores de MIC igual ou acima de 16 mg/L, obtidos principalmente pela metodologia CLSI. Ainda que os pontos de corte, clínicos e epidemiológicos, para fluconazol frente a *Cryptococcus* ainda não estejam definidos, um valor de MIC ≥ 16 mg/L é considerado alto e preditivo de má evolução clínica (ALLER et al., 2000; WITT et al., 1996).

A maioria das causas genéticas de resistência aos antifúngicos azólicos descritas há duas décadas, envolvia mutações pontuais no gene *erg11*, importante na biossíntese do ergosterol. Tais mutações resultam em troca de aminoácidos e, em consequência, alteração na enzima codificada. No caso de *erg11*, há codificação da enzima 14-alfa demetilase que é o alvo dos fármacos azólicos. A expressão do gene *erg11* mutante leva à produção de enzima alterada em sua estrutura molecular o que causa menor afinidade com um antifúngico azólico (BIDAUD; CHOWDHARY; DANNAOUI, 2018).

Outro mecanismo de resistência está ligado às proteínas transportadoras de membrana, dependentes de *ATP*, denominadas *ATP binding cassette* - ABC, que tem sido implicado em muitos aspectos da fisiologia microbiana de *Cryptococcus* spp. (SANGUINETTI et al., 2006). Recentemente, foi descrito um novo transportador ABC AFR3 (CNAG_06909), que é superexpresso em células de *C. neoformans* mais velhas acumulativas durante a infecção crônica, este promovendo o efluxo dos fármacos e resistência aos macrófagos do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2022).

A partir de 2010, várias revisões discutiram as características e os mecanismos de formação da patogênese da célula hospedeira, da adaptação ao estresse e da resistência a antifúngicos, em células de *Cryptococcus*. Gerstein et al. (2015) demonstraram que subpopulações de células *in vivo* são mais resistentes do que suas progenitoras e têm capacidade de adaptação a vários estresses, incluindo a ação do fluconazol. Tais subpopulações podem produzir gerações de células filhas aneuploides que, também, são mais resistentes aos fármacos, apontando um papel destas células para a adaptação no hospedeiro, recidivas e cronicidade da infecção (GERSTEIN et al., 2015). Estas células adaptativas recebem o nome de titãs (gigantes > 10 µm), possuindo poder de sobrevivência e resistência à fagocitose do hospedeiro. A modificação em sua parede celular e na estrutura capsular promovem proteção à dessecação e estresse oxidativo. Tais atributos celulares interrompem as respostas imunes do hospedeiro e, conseqüentemente, aumentam sua sobrevivência no pulmão. Assim, o morfotipo da célula titã pode ser um mecanismo para a geração da plasticidade genômica, levando à resistência a antifúngicos em células *C. neoformans* (PROBERT et al., 2019; ZAFAR et al., 2019a). Células fúngicas anãs (3-5 µm), por sua vez, podem atravessar a barreira hematoencefálica e se disseminar no SNC (GERSTEIN et al., 2015).

Ainda, no tema de resistência, a heterorresistência ao fluconazol em que uma subpopulação células é capaz de se adaptar a concentrações acima do MIC, foi associada à falha terapêutica no tratamento de criptococose, em pacientes que fizeram uso de monoterapia com esse fármaco, mostrando um aumento de populações de *C. neoformans* aneuplóides (GERSTEIN et al., 2015).

Um dos fatores intrigantes, discutidos sobre as resistências aos antifúngicos, podem estar ligados à exposição aos fungicidas agrícolas azólicos que selecionaram cepas resistentes de *Cryptococcus*. Este fenômeno levaria à ocorrência de cepas

resistentes passíveis de serem inaladas e provocarem doença em indivíduos suscetíveis para criptococose. Sendo resistentes aos triazólicos agrícolas, as cepas poderiam apresentar resistência cruzada para triazólicos clínicos promovendo falha terapêutica (BASTOS et al., 2019; TAKAHASHI et al., 2020; ZARAGOZA, 2019).

1.8 Justificativa

Devido ao crescente aumento de criptococose após a pandemia de aids inúmeros dados na literatura regional foram publicados. No entanto, poucos estudos mostraram a diversidade dos tipos moleculares em Mato Grosso do Sul. Faz-se necessário conhecer a ocorrência de genótipos e fenótipos de resistência antifúngica nas cepas de *Cryptococcus* envolvidos em infecções para orientar tratamentos menos empíricos. No sentido de aprofundar estudos anteriores na região (CHANG et al., 2008; LINDENBERG et al., 2008; GOMES et al., 2011; Pasa et al., 2011; TSUJISAKE, 2013 e 2019; NUNES et al., 2018) pretende-se realizar a presente investigação, de modo a conhecer o perfil de resistência “in vitro” de *Cryptococcus* spp. isolados pelo setor de Micologia do Laboratório Central de Mato Grosso do Sul (LACEN/MS), em período de 21 anos (2002-2022) provenientes da capital e de outros municípios de Mato Grosso do Sul.

A esse interesse, somou-se o estímulo dado pelo governo federal, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, que desenvolveu, em cooperação com a Organização Panamericana da Saúde - OPAS e parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios do Ministério da Saúde - CGLAB, o Projeto de Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, que engloba bactérias e leveduras de interesse médico (ANVISA, 2023).

1.9 Relevância

Em alguns países pouco desenvolvidos, a taxa de mortalidade por meningite criptocócica é estimada em 55% e essa taxa é sempre alta na África Sub-Saariana (MUZAZU et al., 2022). No Brasil, os dados oficiais de prevalência e mortalidade da doença são desconhecidos, visto que, não há notificação compulsória da

criptococose, mas alguns estudos mostram taxas expressivas (GUIMARÃES, 2000). A letalidade no Brasil para a criptococose varia de 20,7% a 72,9% (AGUIAR et al., 2017; LOMES et al., 2016; MOREIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2013). Apesar da TARV estar disponível para tratamento gratuito (TSUJISAKE et al., 2019).

As causas necessitam ser pesquisadas e estudos dirigidos ao conhecimento das características dos agentes etiológicos podem indicar caminhos para melhor manejo da infecção. A sensibilidade dos agentes aos principais antifúngicos empregados na terapia da criptococose é um aspecto importante nessa caracterização. Além disso, diferenças na sensibilidade antifúngica entre os diferentes genótipos regionais não foram estudadas, extensivamente, tema relevante para conhecimento da epidemiologia da criptococose. Finalmente, a análise temporal da sensibilidade de isolados clínicos pode mostrar a influência do uso amplo de anfotericina B e fluconazol, como fator determinante de resistência antifúngica, ao longo dos anos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento dos agentes de criptococose, nos últimos 21 anos, no estado de Mato Grosso do Sul.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o complexo de espécies e
- Avaliar a variabilidade genética e sensibilidade antifúngica de cepas de *Cryptococcus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Este estudo foi transversal, quantitativo, do tipo descritivo, parte retrospectivo e parte prospectivo. Os isolados de *Cryptococcus* spp, obtidos de amostras clínicas entre janeiro de 2002 e dezembro de 2022, estavam armazenados congelados no Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Mato Grosso do Sul (Lacen-MS) e foram submetidos à identificação de gênero, complexo de espécie, tipo molecular e sensibilidade a antifúngicos.

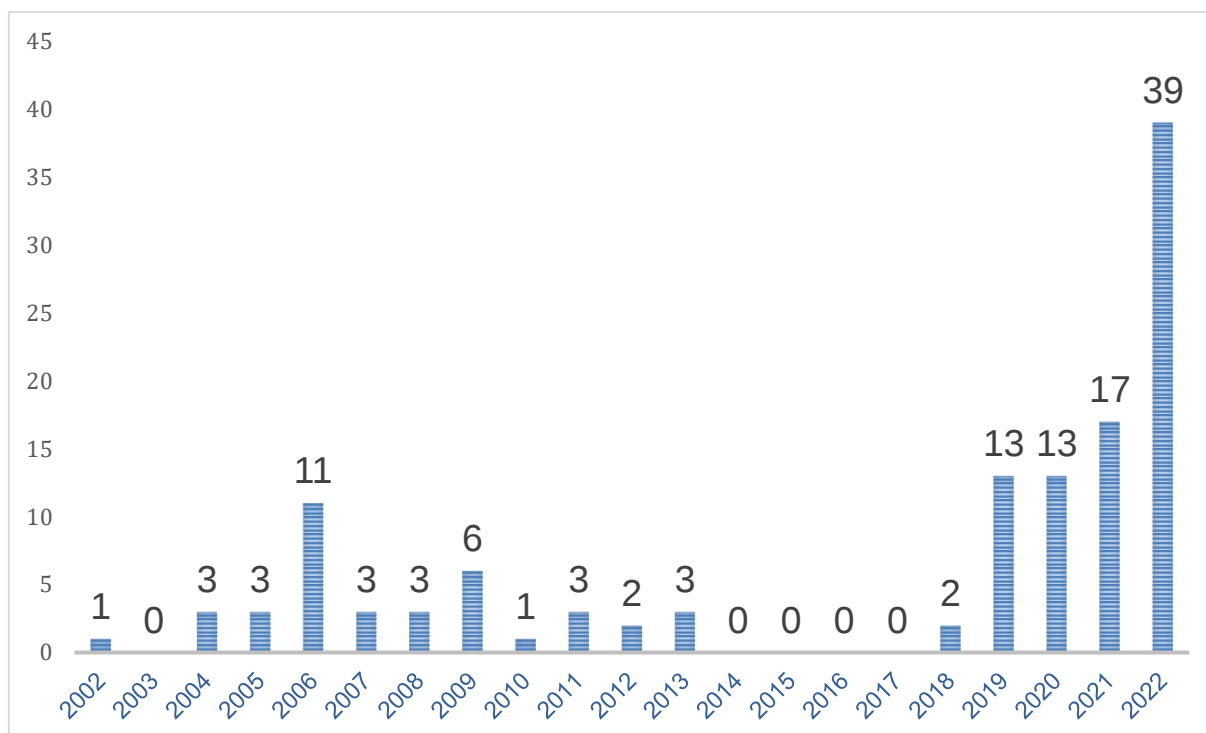
3.2 Isolados fúngicos

Cento e vinte e sete isolados de *Cryptococcus*, de 127 casos de criptococose foram armazenados sob -80°C, em meio líquido de infusão cérebro-coração com 50% de glicerol, no LACEN/MS. Os isolados foram identificados por métodos fenotípicos e eram provenientes de oito tipos de amostras biológicas (Quadro 3) de pacientes internados em hospitais de Campo Grande e de cidades do interior do estado de MS. Os locais de origem das amostras foram: HUMAP/UFMS (54; 42,5%) e outros hospitais de Campo Grande e outros municípios (73; 57,5%). Os isolados foram recuperados de amostras recebidas no LACEN/MS entre os anos de 2002 e 2022 (Quadro 3 e Figura 1).

Quadro 3 – Origem de amostras biológicas de 127 isolados de *Cryptococcus* spp. (2002-2022), MS, Brasil

AMOSTRA BIOLÓGICA	N	%
Líquido cefalorraquidiano	82	65%
Sangue	19	15%
Urina	9	7%
Aspirado de medula óssea	4	3%
Biópsia	4	3%
Escarro	4	3%
Aspirado traqueal	3	2%
Lavado broncoalveolar	1	1%
Sem informação	1	1%
TOTAL	127	100%

Figura 1 - Ano de entrada no LACEN/MS, de amostras biológicas que deram origem a 127 isolados de *Cryptococcus* (2002-2022), MS, Brasil



3.3 Variáveis e fonte da coleta

As variáveis foram: ano de entrada das amostras no setor de Micologia do LACEN/MS, tipo de amostra biológica que deram origem a *Cryptococcus* spp. e procedência, obtida a partir de dados em livros de registro, do Gerenciador de Ambiente Laboratorial do LACEN/MS - GAL e sistemas anteriores a ele.

3.4 Identificação do gênero *Cryptococcus*

Os isolados foram, assim que recuperados das amostras biológicas, classificados em gênero, pela presença de cápsula ao redor dos blastoconídios e melanização em ágar níger (LACAZ, 2002). Os testes foram realizados no LACEN/MS.

3.4.1 Identificação presuntiva do complexo de espécies

Foram realizados no LACEN/MS, testes fenotípicos para classificação de gênero e espécie dos isolados, por técnicas convencionais: cultivo em lâmina, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio por equipamento Phoenix®, produção de fenol-oxidase em ágar contendo compostos fenólicos (niger) e cultivo em meio de CGB (LACAZ, 2002).

3.4.2 Identificação confirmatória do complexo de espécies

A confirmação de gênero e complexo de espécies foi realizada, no LACEN/MS, por método proteômico com MALDI-TOF MS, inicialmente, com base no banco de dados do fabricante do equipamento (Bruker Daltonics). Os isolados após descongelamento, foram submetidos a dois repiques, antes de serem conduzidas ao processo de extração protéica, em meio ágar Sabouraud, com cloranfenicol, sob 35°C, até o crescimento de colônias para permitir obtenção de extrato protéico. Colônias de cada isolado foram transferidas para a placa do equipamento (método direto) e

cobertas com ácido fórmico, antes de serem cobertas com solução de matriz. A matriz *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid* (CHCA) foi utilizada para aquisição dos espectros em MALDI-TOF MS (Bruker, Da) foi adquirida, diretamente, do fabricante, assim como o calibrador *Bacterial Test Standard* (BTS). Para cada cepa foram feitas duas aquisições de espectro proteico analisados por *Flex Analysis* (Bruker Daltonics, EUA). As condições de aquisição foram: modo linear, frequência de laser de 20 Hz e análise da massa em intervalo de 3000 a 8000 m/z, iniciando a medida com 2,000 a 20,000 m/z, íons 1 a 20 kV, 2 a 16,7 kV e lentes 8,5 kV.

Os espectros assim adquiridos foram comparados aos existentes na biblioteca do fabricante Bruker Daltonics, para identificação do complexo de espécies. Ao final de cada relatório, o equipamento exibiu legendas, conforme Quadro 4, para que fosse possível interpretação dos valores de escore obtidos. Para resultados com escores abaixo de 2 (cor amarela) ou na falta de obtenção de picos proteicos, nova análise foi realizada com processo de extração em microtubo, com adição de etanol absoluto, ácido fórmico e acetonitrila, de acordo com instruções do Manual do fabricante (Bruker Da). Para cada isolado foram realizados experimentos em 4 replicatas, sendo considerado o melhor resultado o maior score.

Quadro 4 - Legenda de escores da biblioteca da Bruker Daltonics®, para identificação de espécies e complexos de *Cryptococcus* e outros gêneros fúngicos

ESCORE (INTERVALO VALORES)	INTERPRETAÇÃO	SÍMBOLO	COR
A (2.00 - 3.00)	Alta confiança na identificação de espécie	(+++)	Verde
B (1.70 - 1.99)	Baixa confiança na identificação de gênero	(+)	Amarelo
C (0.00 - 1.69)	Identificação inconsistente	(-)	Vermelho

3.5 Determinação do tipo molecular

A determinação do tipo molecular (genótipo) foi realizada com base nos espectros adquiridos no MALDI-TOF MS (Bruker Da), os quais foram submetidos, primeiramente, à análise na biblioteca da Bruker Da e, em seguida, àquela denominada *Mass Spectrometry Identification* – MSI, que é aberto ao público (NORMAND et al., 2017). Cada espectro adquirido foi analisado na biblioteca MSI, no máximo em 4 tentativas, até a obtenção do melhor resultado (índice A). Para os demais (índices B e C), os resultados foram considerados insatisfatórios e, também, classificados como "não identificados" (NI) (Quadro 5). Para obtenção de melhores espectros, foi realizada extração proteica das suspensões fúngicas, quando o método direto das colônias não gerou bons resultados.

Quadro 5 - Legenda de índices da biblioteca do MSI, para identificação proteômica de espécies e complexos de *Cryptococcus* e outros gêneros fúngicos

ÍNDICE	NÍVEL DE IDENTIFICAÇÃO	CRITÉRIO
A	Até espécie	(1ª pontuação > 22 e 1ª-2ª>8) ou (1ª>20, mas<=22 e 1ª-2ª>2)
B	Até complexo	(1ª pontuação > 22 e 2ª pontuação > 20 e 1ª-2ª < 8) ou (1ª > 20, mas <= 22 e 1ª - 2ª < 2)
C	Irrelevante	(1ª e 2ª pontuação <20)

Adaptado de MSI V2.0 Disponíveis em: <<https://msi.happy-dv.fr.>>

3.6 Sensibilidade a antifúngicos

Os fenótipos de resistência foram investigados no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – LABDIP/FAMED/FUFMS. O método de referência europeu por microdiluição, líquido descrito no documento E. Def.7.4 foi utilizado para os antifúngicos: anfotericina B, fluconazol e voriconazol (EUCAST, 2023b).

Como controle de qualidade dos testes microbiológicos foram utilizadas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, cujos resultados de sensibilidade, quando dentro do esperado, validaram os testes, de acordo com EUCAST (Tabela 1).

Os resultados de MIC foram interpretados, segundo o documento do EUCAST (2023a) frente a *C. neoformans*, em sensível ou resistente para anfotericina B (*breakpoint* clínico) (Tabela 2) e frente a *C. gattii* como selvagem (WT) ou não selvagem (não WT) anfotericina B e para voriconazol (Tabela 3). Para as demais combinações, antifúngico e complexo de espécies, não há pontos de corte disponíveis, não sendo possível a interpretação.

Tabela 1 - Valores de concentração inibitória mínima (MIC, em mg/L) de três antifúngicos para duas cepas padrões, no método de microdiluição em caldo, por EUCAST.

CEPA PADRÃO	ANTIFÚNGICO	INTERVALO (mg/L)
<i>C. krusei</i>	anfotericina B	0,125-1
ATCC 6258	voriconazol	0,03-0,25
	fluconazol	16-64
	anfotericina B	0,125-1
<i>C. parapsilosis</i>	voriconazol	0,016-0,06
ATCC 22019	fluconazol	0,5-2

Adaptado de EUCAST, 2023b

Tabela 2 - Pontos de corte clínicos (*breakpoints* clínicos) de três antifúngicos, no método de microdiluição em caldo por EUCAST, para isolados de *Cryptococcus*

COMPLEXO DE ESPÉCIES	ANTIFÚNGICOS	Breakpoints Clínicos	
		SENSÍVEL ≤	RESISTENTE ≥
<i>C. neoformans</i>	Anfotericina B	1	1
	Voriconazol	-	-
	Fluconazol	-	-
<i>C. gattii</i>	Anfotericina B	-	-
	Voriconazol	-	-
	Fluconazol	-	-

Adaptado de EUCAST, 2023^a

Tabela 3 - Pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) para três antifúngicos, no método de microdiluição em caldo por EUCAST, para isolados de *Cryptococcus* spp

COMPLEXO DE ESPÉCIES	ANTIFÚNGICOS	Breakpoints Clínicos	
		Selvagem (WT) ≤	Não Selvagem (NWT) >
<i>C. neoformans</i>	Anfotericina B	(1)	(1)
	Voriconazol	0,5	0,5
	Fluconazol	-	-
<i>C. gattii</i>	Anfotericina B	(0,5)	(0,5)
	Voriconazol	-	-
	Fluconazol	-	-

() ECOFF tentativo. Adaptado de EUCAST, 2023a

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com programa IBM-SPSS (versão 21.0). Elementos estatísticos descritivos (médias, mediana, intervalo, interquartil) foram usados para descrever a distribuição de valores de MIC (variável contínua). Os três antifúngicos foram analisados frente a cada genótipo identificado pelo MSI, utilizando o teste de Kruskal- Wallis. Somente os genótipos com cinco ou mais amostras foram analisados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.8 Manutenção dos isolados

Os isolados, durante e após os experimentos, foram mantidos em *freezer* a -80°C , no Biorrepositório do LABDIP - Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMED-UFMS).

3.9 Considerações éticas

O projeto foi submetido e aprovado no Sistema CEP-CONEP sob número CAAE: 60882722.0.0000.0021, segundo Plataforma Brasil e ao Comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFMS, com dispensa do Termo de Consentimento Livre e esclarecido – TCLE.

4. RESULTADOS

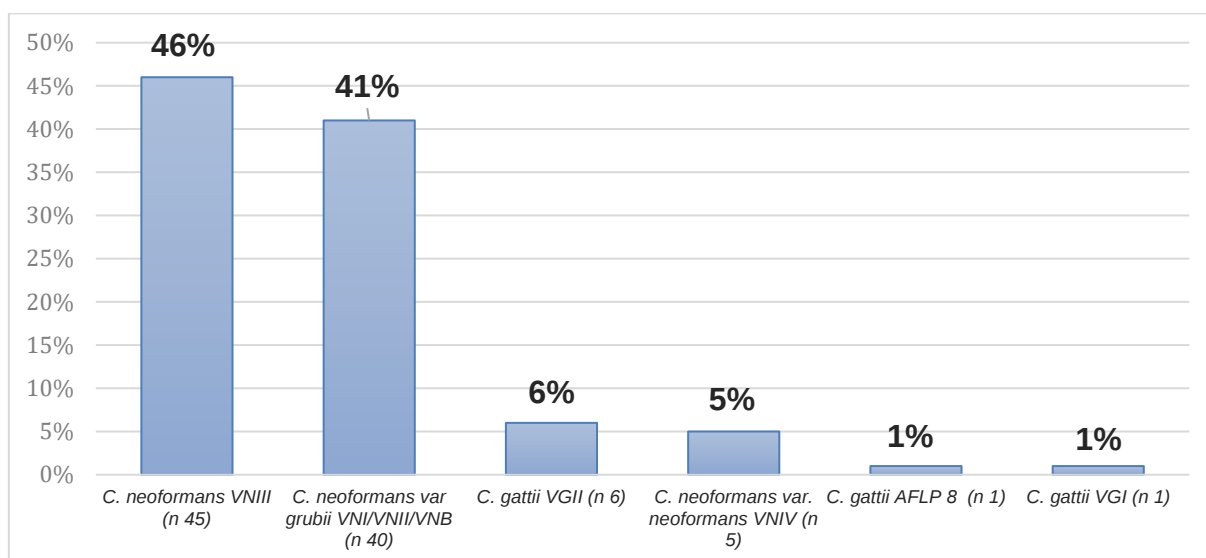
Todos os resultados dos testes realizados para cada um dos 127 isolados de *Cryptococcus* constam do Apêndice 1.

O método proteômico por MALDI TOF MS, com base na biblioteca da Bruker Da, permitiu a identificação de complexo de espécies para todos os 127 isolados, sendo 114 (89,8%) do complexo *C. neoformans* e 13 (10,2%) do complexo *C. gattii*. Cento e seis (83,5%) isolados geraram espectros proteicos que obtiveram bons escores, > 2 na cor verde, suficientes para identificar o complexo de espécies em 11 (10,4%) *C. gattii* e 95 (89,6%) *C. neoformans*.

Para determinação dos genótipos, os espectros proteicos de 98 (77,2%) isolados foram comparados aos armazenados na biblioteca do MSI. Para o restante (n = 29; 22,8%) dos isolados, problemas técnicos impediram seu processamento para genotipagem. Dos 98 isolados processados, o tipo molecular foi identificado em 58 (59,02 %), com obtenção de índice A (biblioteca MSI) em 5 (8,6%) isolados de *C. gattii* e 53 (91,4%) de *C. neoformans*. Os isolados para os quais os escores foram B ou C e, portanto, o tipo molecular não pode ser determinado segundo biblioteca do MSI, deverão ser genotipados através de *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP, extrapolando a metodologia prevista neste estudo.

Foram identificados por MALDI-TOF MS, segundo a biblioteca do MSI: *C. neoformans* VNIII - 45 (46%), *C. neoformans* variedade *grubii* VNI/ VNII/VNB - 40 (41%), *C. gattii* VGI - 1 (1%), *C. gattii* VGII - 6 (6%), *C. neoformans* VNIV - 5 (5%) e *C. gatti* AFLP 8 híbridos – 1 (1%). Os resultados de complexo de espécies e genótipos constam da Figura 2.

Figura 2 - Genótipos de 98 isolados clínicos de *Cryptococcus* (MS, Br) identificados por MALDI-TOF MS, segundo a biblioteca do MSI



Quanto à sensibilidade aos três antifúngicos analisados de acordo com o comitê EUCAST, as tabelas 4 e 5 apresentam os valores de MIC para os 127 *Cryptococcus*, bem como os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀. De acordo com os pontos de corte, os isolados foram classificados como: sensíveis ou resistentes (CBP) ou, selvagens ou não selvagens (ECOFF).

Tabela 4 - Sensibilidade de 127 isolados clínicos de *Cryptococcus*, 2002-2022, MS, Brasil

COMPLEXO DE ESPÉCIES	ANTIFÚNGICO	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC, mg/L)			RESISTENTES OU NÃO SELVAGENS (%)
		Intervalo	MIC ₅₀ mediana	MIC ₉₀	
<i>C. neoformans</i> n = 113	anfotericina B	0,03 - 1	0,12	0,12	0
	fluconazol	0,12 - 8	1	2	0
	voriconazol	0,03 - 0,5	0,015	0,06	0
<i>C. gattii</i> n = 14	anfotericina B	0,008 - 0,5	0,12	0,5	0
	fluconazol	0,12 - 8	1	4	0
	voriconazol	0,015 - 0,5	0,015	0,06	0

Tabela 5 - Distribuição de valores de MIC de três antifúngicos frente a 127 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. (2002-2022), MS, Brasil.

COMPLEXO DE ESPÉCIES	ANTIFÚNGICO	Número de isolados no MIC (mg/L):													TOTAL
		>32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,008	
<i>C. neoformans</i> (n=113)	AMB	NR	NR	NR	0	0	0	30	25	37	6	6	6	3	113
	FCZ	0	0	3	21	23	20	13	10	23	NR	NR	NR	NR	113
	VCZ	NR	NR	0	0	0	0	2	3	10	14	15	69	NR	113
<i>C. gattii</i> (n=14)	AMB	NR	NR	NR	0	0	0	5	2	5	1	0	1	0	14
	FCZ	0	0	1	5	0	3	1	0	4	NR	NR	NR	NR	14
	VCZ	NR	NR	0	0	0	0	0	2	0	2	1	9	NR	14

AMB, anfotericina B; FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; NR, não realizado; rosa: resistente; amarelo, selvagem; Verde, sensível; azul, não selvagem; Branco, sem postos de corte para o fármaco frente a *Cryptococcus* spp.

A comparação dos valores de MIC, como variáveis quantitativas, com distribuição não normal (teste de Kolmogorov-Smirnov), foi realizada pelas medianas e não como média, tratando-se de dois grupos independentes (complexos de espécies), ou seja, um grupo de 14 isolados de *C. gattii* comparado a outro grupo de 113 isolados de *C. neoformans*. Como demonstrado na tabela 6, não houve diferenças de MICs dos antifúngicos entre os dois complexos de espécies: *C. gattii* e *C. neoformans*.

Os 98 isolados foram analisados correlacionando-se os três antifúngicos frente a cada genótipo identificado pelo MSI, utilizando o teste de Kruskal - Wallis (Tabela 7). Os valores de MIC de cada um dos antifúngicos não diferiram em relação aos genótipos.

A figura 3 mostra os resultados do coeficiente de correlação de Spearman (Rho). Para AMB e FCZ a correlação foi significativa e inversa ($p = 0,017$). Para VCZ e FCZ a correlação foi positiva ($p < 0,001$). Não houve correlação entre valores de MIC de AMB e VCZ ($p = 0,155$).

Tabela 6 - Comparação das medianas de concentração inibitória mínima (MIC) de três antifúngicos, segundo a espécie, frente a 127 isolados de *Cryptococcus* spp (2002-2022, MS – Brasil) - Teste U de Mann-Whitney

ANTIFÚNGICO	<i>Cryptococcus gattii</i> (n=14) MIC mediana [mínimo-máximo]	<i>Cryptococcus neoformans</i> (n=113) MIC mediana [mínimo-máximo]	p
Anfotericina B	0,185 [0,015-0,500]	0,120 [0,08-0,500]	0,621
Fluconazol	1 [0,12- 8]	1 [0,12-8]	0,667
Voriconazol	0,015 [0,015-0,030]	0,015 [0,015-0,060]	0,489

Figura 3 - Correlação entre as concentrações inibitórias mínimas (MIC, mg/L) de tres antifúngicos, frente a 127 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. Coeficiente de correlação de Spearman (Rho) e a significância estatística (p) para cada par de antifúngicos.

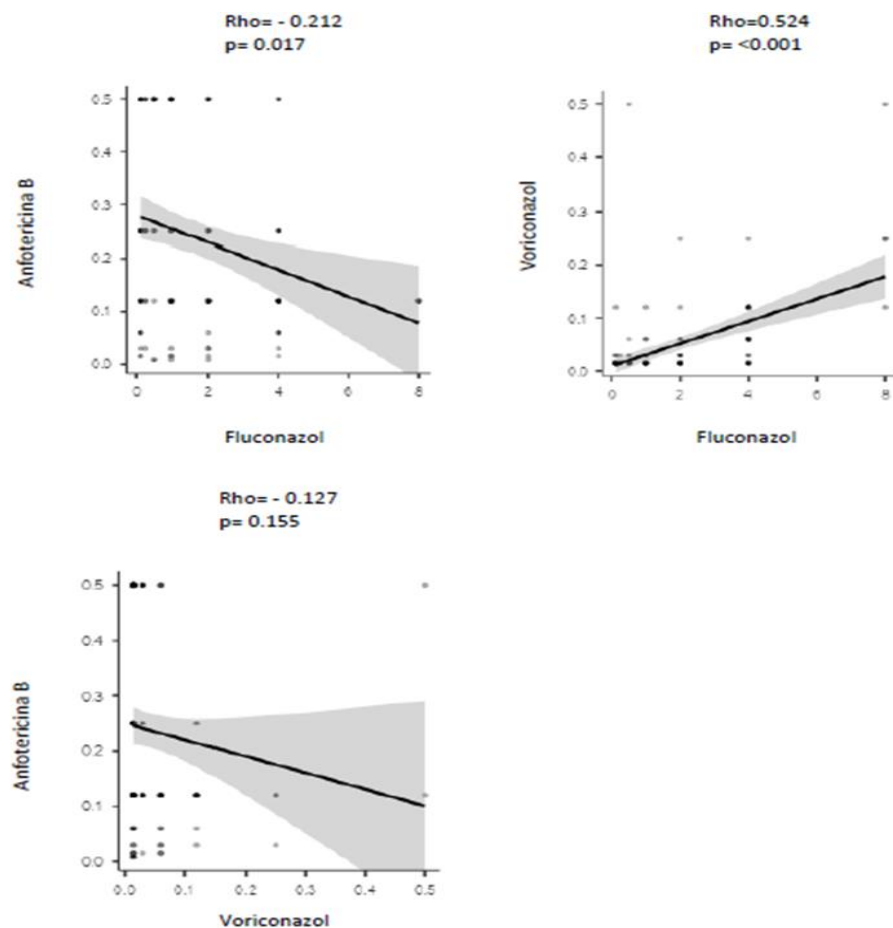


Tabela 7 - Relação de concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de três antifúngicos, frente a 58 isolados de *Cryptococcus*, segundo genótipo (2002-2022), MS, Brasil

GENÓTIPOS	ANFOTERICINA B	FLUCONAZOL	VORICONAZOL
	MIC mediana [mínimo-máximo]	MIC mediana [mínimo-máximo]	MIC mediana [mínimo-máximo]
AFLP8 Híbrido DB n=1	0.120 [0.120-0.120]	2.00 [2.00-2.00]	0.015 [0.015-0.015]
VGI n=1	0.015 [0.015-0.015]	0.120 [0.120-0.120]	0.015 [0.015-0.015]
VGII n=6	0.375 [0.120-0.500]	0.750 [0.120-4.00]	0.015 [0.015-0.015]
VNI n= 1	0.500 [0.500-0.500]	0.500 [0.500-0.500]	0.030 [0.030-0.030]
VNI/VNII/VNB n=40	0.250 [0.008-0.500]	1.00 [0.120-8.00]	0.015 [0.015-0.500]
VNIII n=44	0.120 [0.008-0.500]	2.00 [0.120-4.00]	0.015 [0.015-0.120]
VNIV n=5	0.250 [0.120-0.500]	1.00 [1.00-4.00]	0.015 [0.015-0.030]
valor de p*	0.550	0.337	0.439

*Teste de Kruskal- Wallis, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

5. DISCUSSÃO

Em 127 isolados de casos de criptococose de MS, obtidos no período de 2002 a 2022, os dois complexos de espécies foram encontrados, sendo predominante *C. neoformans* em relação a *C. gattii*, como era esperado. No complexo *C. neoformans*, encontrou-se majoritariamente a variedade *grubii*. Nenhum dos isolados apresentou resistência, ou foi não selvagem, aos antifúngicos AMB, VCZ e FCZ. A maior parte dos agentes etiológicos deste estudo foi oriundo de amostras de LCR, representando a forma meníngea da criptococose que é sempre grave, em pacientes com ou sem infecção pelo HIV (LOMES et al., 2016; VIDAL, J. E. et al, 2013; DE OLIVEIRA, R. B. et al 2014).

Para identificação dos agentes da criptococose, foi empregado o método proteômico para aquisição de espectros de massa, gerados por MALDI -TOF MS. O método com emprego do banco de dados do fabricante do equipamento, Bruker Daltonics, apresentou bom desempenho, permitindo a identificação de todos os isolados em seus complexos de espécie.

No estado de Mato Grosso do Sul, alguns estudos contribuíram para o conhecimento da epidemiologia regional da doença em relação aos complexos de espécies. Tais estudos permitiram observar aumento dos casos de *C. gattii*, entre 1995 e 2014, como segue. Lindenberg et al. (2008) analisaram 123 prontuários de casos confirmados de criptococose por meio de exames micológicos (exame direto e ou cultura) entre 1995-2005, atendidos no HUMAP-UFMS encontrando 4,1% (n=5) casos de criptococose causada por *C. gattii*, em pessoas vivendo com HIV. No período de maio de 1997 a dezembro de 2008, Gomes (2011) verificou 7,8% de *C. gattii* em 116 amostras clínicas, atendidos no mesmo hospital. Estudo posterior de Nunes et al. (2018) identificou 12,5% de *C. gattii*, em 129 pacientes vivendo com HIV, atendidos nesse mesmo hospital entre 1997 e 2014. Estudo de Tsujisake e colaboradores (2019), com 73 casos de criptococose diagnosticados entre 2013 a 2016, no HUMAP, identificou 9 (12,3%) isolados de *C. gattii*.

O estudo dos agentes da criptococose é importante pois se trata de uma das infecções oportunistas definidoras de aids e, até o advento da terapia antirretroviral de alta potência (HAART), era uma das principais causas de óbito em pacientes com meningoencefalite e infecção pulmonar. Ainda que a incidência global da criptococose

tenha diminuído após HAART, sua ocorrência e mortalidade ainda são altos, em algumas áreas do mundo, incluindo o Brasil justificando pesquisas em busca de nexos causais (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). No Brasil 4,5% das infecções oportunistas em pacientes recentemente diagnosticados com AIDS, eram causadas por *Cryptococcus*, segundo dados do boletim epidemiológico do Ministério da saúde (BRASIL, 1999) hoje indisponíveis. A criptococose, especificamente, no Brasil não é notificada como agravo de notificação, por isso os dados são indiretos, entram em “outras meningites” na lista de notificação compulsória, mas apontam a necessidade de melhoria na coleta de dados, investigação sobre quadro clínico e características dos agentes etiológicos, recentemente, classificados como agentes críticos de alta (*C. neoformans*) e média (*C. gattii*) prioridades (WHO, 2024).

No estado de MS, o impacto da doença pode ser avaliado pela alta letalidade geral de 51,8% e entre os HIV positivos de 53,1%, observada em 116 pacientes atendidos no HUMAP-UFMS, MS, entre 1997 e 2008, (Gomes, 2011). A letalidade aumenta com a gravidade da doença como mostrado no estudo de Tsujisake et al (25013) que relatou uma taxa de mortalidade de 72,9% em pacientes com criptococemia.

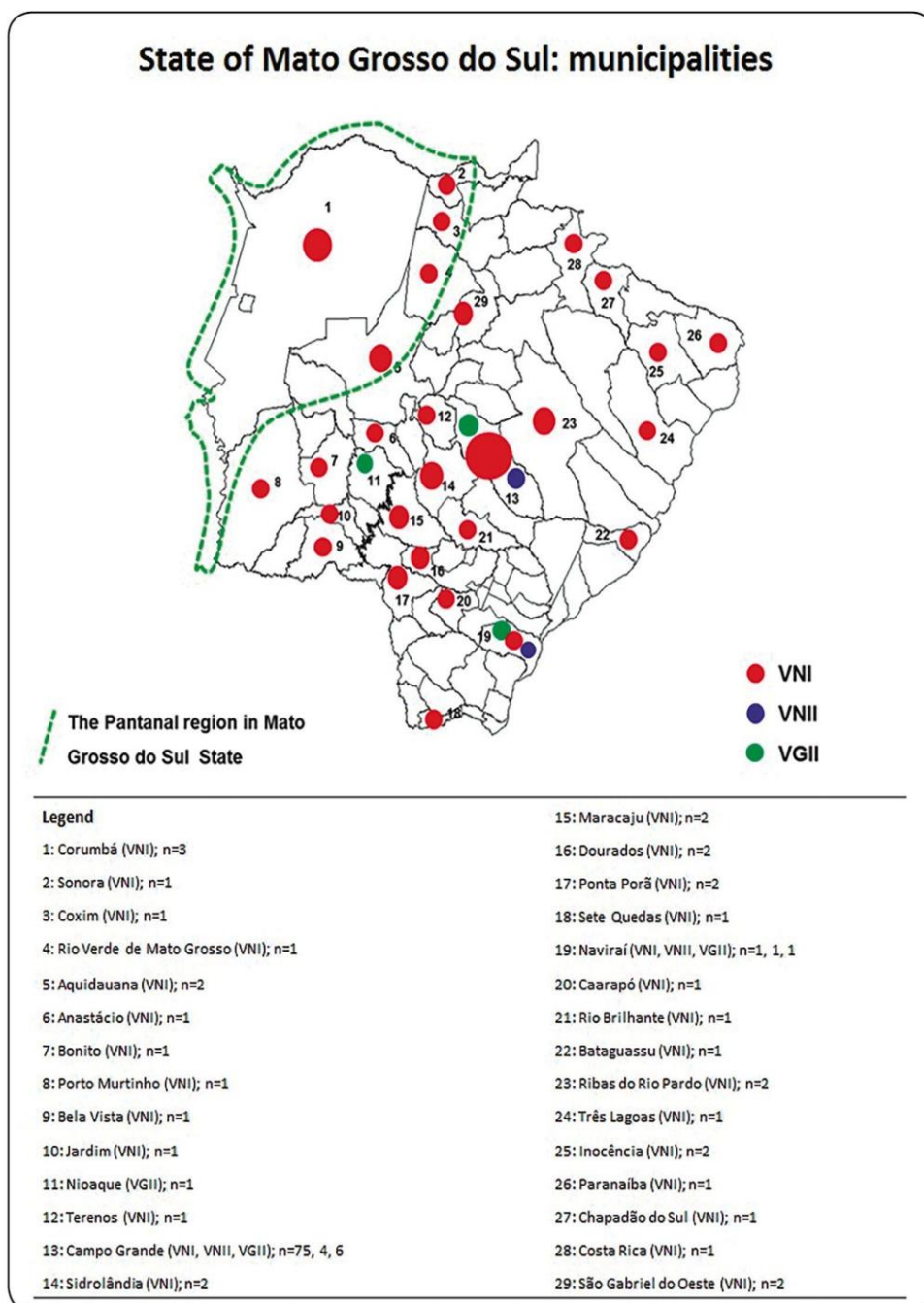
Conforme estudos no Brasil, a mortalidade geral associada à criptococose varia de 0,45 a 0,48 / 1.000.000 habitantes (PRADO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009).

Como a criptococose não é de notificação compulsória, a dimensão nacional da prevalência geográfica de cada complexo de espécie, bem como, dos seus genótipos e fenótipos de resistência, pode ser avaliada, apenas, pelos achados contidos em publicações. A relevância de monitorar as taxas de infecções por *C. gattii* deve-se ao fato delas necessitarem de tratamentos mais agressivos, conforme explicitado anteriormente. Além do interesse em desvendar a epidemiologia da criptococose no Brasil, a determinação do tipo molecular infectante tem interesse na terapia, pois, o genótipo pode influenciar a sensibilidade a antifúngicos.

Quanto à identificação de genótipos por proteômica - MALDI-TOF, em relação aos 98 isolados que foram identificados, a plataforma *on-line* MSI produziu resultados satisfatórios, porém, não definitivos para *C. neoformans* variedade *grubii* que representou boa parte dos isolados estudados (40; 41%). O baixo poder discriminatório do método para essa variedade, deve-se ao fato, desta englobar 3 genótipos distintos: VNI, VNII, VNB. Outros resultados foram: *C. neoformans* VNIII

(45; 46%), *C. gattii* VGI (1; 1%), *C. gattii* VGII (6; 6%), *C. neoformans* VNIV (5; 5%) e híbrido DB (AFLP 8 (1; 1%). Foram encontrados os genótipos mais frequentemente, descritos no Brasil: VNI e VGII, confirmando dados da literatura regional. Os tipos moleculares encontrados, no estado de MS, em estudos anteriores foram VNI (87,9%), VNII (4,3%) e VGII (7,8%) (GOMES, 2011), confirmados por Nunes et al. (2018), em 129 isolados, posteriormente, com taxas de VNI (89,1%), VNII (3,9%) e VGII (7%) semelhantes (Figura 4). Nesse estudo, Nunes e colaboradores relatam que, três dos quatro pacientes com VNII eram originários de outros estados (São Paulo n=1 e Paraná n=2). O complexo de espécies foi identificado junto com o genótipo, pois os autores utilizaram RFLP do fragmento URA5, não revelando ocorrência de espécies híbridas. A técnica de RFLP foi a primeira a permitir a tipagem molecular dos agentes da criptococose (MEYER et al., 2003). Esta técnica pode ser substituída por outras mais rápidas, tais como MALDI-TOF MS, com relato de bom desempenho (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2012; ZVEZDANOVA et al., 2020).

Figura 4. Distribuição de genótipos em 129 isolados clínicos de *Cryptococcus* (1997-2014) no estado de Mato Grosso do Sul, BR



Fonte: Nunes, 2018

O encontro de alta taxa de genótipos AD híbrido VNIII em nosso estudo foi inédita no estado e é, ainda, notável, pois é raramente descrito em outros estudos de países latino-americanos, englobando isolados ambientais e clínicos, como demonstrado na Tabela 8. Os híbridos AD (VNIII) decorrem da hibridização entre o sorotipo A (VNI, VNII, VNB) e o sorotipo D (VNIV) e foram os primeiros híbridos a serem identificados em isolados de *Cryptococcus*. Os híbridos AD são os mais

comuns dentre os híbridos criptocócicos (DB, AD, AB). Os híbridos de AD, clínicos e ambientais, globalmente, apresentam a maior prevalência na Europa com 18%, seguida pelos Estados Unidos com 6% (COGLIATI, 2013).

Tsujiwake 2019 encontrou dados que permitem afirmar que no estado de MS a criptococose é causada, principalmente, por espécies do complexo *C. neoformans*, tipo molecular VNI (dados não publicados). Ainda, os autores identificaram por técnica de RFLP, os tipos moleculares VNI (57; 78,1%), VNII (7; 9,6%) e VGII (9; 12,3%). Todos os isolados foram sensíveis aos antifúngicos testados, com apenas dois isolados VNI e dois VGII sensíveis dose-dependente ao itraconazol. O genótipo VGII apresentou menor sensibilidade *in vitro* do que VNI e VNII, frente aos azóis, assim como, VNI foi menos sensível em relação ao VNII (TSUJISAKE, 2019).

A descrição da ocorrência de híbridos no estado de MS, além de inédita, poderá trazer grande contribuição para a compreensão da epidemiologia molecular da criptococose e mostrar contrapontos a dados regionais e nacionais já publicados. A estrutura populacional de cepas brasileiras de *C. neoformans* foi considerada, anteriormente, altamente clonal, ou seja, produz indivíduos geneticamente idênticos e sem recombinação genética (SILVA et al., 2020).

Tabela 8 - Distribuição de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* em países da América Latina (2018 e 2021)

PAÍS	<i>C. neoformans</i>		<i>C. gattii</i>	
	2018	2021	2018	2021
Brasil	VNI, VNII, VNIII (1*- 0,1%), VNIV	VNI, VNII, VNIII , VNIV e VNB (5*)	VGI, VGII, VGIII	VGI, VGII, VGIII
Colômbia	VNI, VNII, VNIV	VNI, VNII, VNIV	VGI, VGII, VGIII, VGIV	VGI, VGII, VGIII, VGIV
Argentina	VNI, VNII, VNIII (3,2%), VNIV	VNI, VNII, VNIII , VNIV	VGI, VGII, VGIII	VGI, VGII, VGIII
México	VNI, VNII, VNIII (3,7%), VNIV	VNI, VNII, VNIII , VNIV	VGI, VGII, VGIII, VGIV	VGI, VGII, VGIII, VGIV
Cuba	VNI	VNI e VNIV	VGI e VGIII	VGI e VGIII
Venezuela	VNI, VNII, VNIII (1,0%)	VNI, VNII, VNIII	VGI, VGII, VGIII	VGI, VGII, VGIII
Peru	VNI, VNII, VNIV	VNI, VNII, VNIII , VNIV	VGI	VGI
Costa Rica	NR	VNI e VNII	NR	VGI e VGIV
Equador	VNI	NR	VNI	VGI
Chile	VNI, VNII, VNIII (15,8%), VNIV	NR	VNI, VNII, VNIII , VNIV	VGIII
Guatemala	VNI	VNI	VGIII	VGIII
Bolívia	NR	NR	NR	VGIII
Honduras	NR	NR	VGI	VGI
Paraguai	NR	NR	VGIII	VGIII
Uruguai	NR	NR	VGII	VGII

*Isolado ambiental; NR – Não relatado; amarelo, destaque para VNIII
 Fonte: Adaptado de Firacative et al. (2018) e Firacative et al. (2021)

Em inquérito epidemiológico realizado nos Estados Unidos em 1977, 4,0 % de 272 isolados reagiram consistentemente com antissoros A e D e foram, portanto,

tipificados como híbridos de AD (BENNETT; KWON-CHUNG; HOWARD, 1977). Desde então, os híbridos AD, aos quais foi atribuído o tipo molecular VNIII, foram isolados de fontes ambientais e clínicas em muitos países. Em uma reviravolta interessante, o isolado original de *C. neoformans* descoberto por Sanfelice em suco de pêssogo da Itália em 1894, que se pensava ser do sorotipo D, foi depois determinado como sendo um híbrido AD (HAGEN et al., 2015).

A identificação de fenótipos híbridos foi devido à boa resolatividade da plataforma MSI. Em relação às espécies híbridas, a espectrometria de massa por MALDI-TOF MS foi, anteriormente, imprecisa. Diante desse alerta, o encontro dos genótipos híbridos, no presente estudo, deverá ser confirmado por RFLP e/ou citometria de fluxo (AMINNEJAD et al., 2016).

Os dados do MSI são disponibilizados, gratuitamente, para uso em laboratórios assistenciais ou de pesquisa. A última versão MSI-2 é uma aplicação desenvolvida pela Universidade Sorbonne (Paris, França) e pela coleção belga de microrganismos (BCCM-IHEM, Bruxelas, Bélgica) dedicada à identificação de espectros MALDI-TOF, utilizando algoritmos de identificação originais e bases de dados de referência originais para diversos patógenos (fungos, *Leishmania*, Dipters, *Amanita*, *Phlebotomus* e *Enterobacter cloacae*). A plataforma MSI contém 16.442 espectros proteicos correspondendo a 1581 espécies fúngicas. A plataforma francesa MSI foi lançada, inicialmente, em 2017 e forneceu o primeiro aplicativo baseado na internet, para identificação de fungos, com uso de banco de dados com curadoria própria (Normand et al., 2017). A avaliação da plataforma MSI em ambientes clínicos demonstrou ótimos resultados em diferentes estudos (BARKER et al., 2022; BECKER et al., 2019; DUPONT et al., 2019; NORMAND et al., 2022; STEIN et al., 2018)

Outros estudos utilizaram MALDI-TOF MS com êxito para identificação do tipo molecular dos agentes de criptococose (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2012). A espectrometria de massa por MALDI-TOF foi utilizada em 423 isolados que foram classificados em espécies, de acordo com a proposta de Hagen et al. (2015) (ZVEZDANOVA et al., 2020). A aplicação da base de dados comercial da Bruker permitiu a correta identificação de 8 (81,8 %) de 22 isolados de *C. neoformans* e 1 (33,4%) de 3 de *C. deneoformans*, porém, não permitiu a correta identificação de 19 isolados e pertencentes às espécies híbridas (ZVEZDANOVA et al., 2020).

Firacative et al. (2012) inovaram quando personalizaram uma biblioteca de espectros proteicos de *Cryptococcus* para a determinação do tipo molecular,

mostrando uma abordagem diferente na tentativa de melhorar a precisão da identificação. Zvezdanova et al. (2020) utilizaram, também, uma biblioteca *in-house*, preparada com genótipos por AFLP (amplified fragment length polymorphism) e sequenciamento da região intergênica ITS (internal transcribed spacer) ITS1–5.8S-ITS2. No estudo de Zvezdanova et al. (2020), foi utilizado um ponto de corte de 1,7 para a identificação de isolados. Este ponto de corte, inferior ao habitual, permitiu que quase todos os isolados fossem identificados como a espécie correta em, pelo menos, um dos dois ensaios em duplicata. No entanto, é importante salientar que, tradicionalmente, este ponto de corte é aceito para a identificação de gênero e não de espécie. Quando se utilizou o ponto de corte mais comum de 2,0, apenas 76,1% dos isolados foram corretamente identificados por ambos os ensaios. Este resultado levanta questões sobre a praticabilidade deste método para a correta identificação de espécies, indicando que o ponto de corte de 2,0 pode não ser sempre adequado para tal finalidade (Zvezdanova et al. (2020).

Tais estudos sublinham a importância de ajustamentos nos métodos e nos pontos de corte utilizados para a identificação correta de espécies. A personalização de bibliotecas proteicas e a utilização de métodos de genotipagem avançados podem aumentar a precisão da identificação, mas também requerem uma avaliação cuidadosa dos pontos de corte aplicados para garantir a sua efetividade. As descobertas indicam que, para obter uma identificação correta e consistente, pode ser necessário explorar e validar diferentes abordagens e parâmetros de corte.

Um método molecular, comumente utilizado para a identificação de espécies fúngicas, é a determinação da sequência ITS do ribossomo nuclear (SCHOCH et al., 2012). No entanto, esta opção não está disponível para a identificação das espécies devido à variação insuficiente da sequência ITS entre clados/espécies dentro de *C. neoformans* ou *C. gattii*, conforme citado em (MELHEM et al., 2024).

O complexo de espécies pode ser um fator decisivo no valor de MIC. Embora todos os isolados tenham sido considerados sensíveis à anfotericina B e fluconazol, os valores de MIC₉₀ frente a isolados de *C. gattii* (respectivamente, 0,5 mg/L e 4 mg/L) foram maiores do que os referentes a isolados de *C. neoformans* (respectivamente, 0,12 mg/L e 2 mg/L) e estes achados foram relatados anteriormente (KHELL DA SILVA et al., 2012). Nos 127 isolados, não foi verificada diferença significativa na sensibilidade aos antifúngicos, entre os dois complexos de espécies.

Semelhante aos resultados deste estudo, a quase totalidade de isolados clínicos (>99%) foram sensíveis anfotericina B em estudos na África, Europa, América do Norte, América do Sul e região do Pacífico (PFALLER et al., 2005), Cuba (IILNAIT-ZARAGOZA et al., 2008), França (DANNAOUI et al., 2006), Espanha (LÓPEZ-JODRA et al., 2000), EUA (BRANDT et al., 2001) e Brasil (Almeida et al., 2007; Souza et al., 2007; Souza et al., 2005) demonstraram serem sensíveis *in vitro* a esse potente fármaco polieno (MIC ≤ 1 mg/L). No entanto, a detecção de resistência *in vitro* à anfotericina B (MIC ≥ 2 mg/L) foi relatada em 5,3% dos isolados clínicos de *C. neoformans* de uma coleção espanhola contrasta os dados do presente estudo, bem como dos outros estudos já mencionados (PERKINS et al., 2005).

Poucos estudos mostram correlação *in vitro-in vivo* para anfotericina B. Em dois estudos de mesmos autores (LARSEN et al., 2007, 2011), propuseram um método alternativo para melhor determinação da sensibilidade dos agentes da criptococose. O primeiro estudo avaliou 85 casos e o segundo 15 pacientes. O método de MIC por microdiluição com inóculo individualizado de acordo com a carga fúngica do paciente, extremamente trabalhoso, indicou forte associação entre valores de MIC e o desfecho clínico de pacientes com baixa carga fúngica (<15 células/ mL de LCR). O desfecho foi medido em sobrevivência no 14º dia (LARSEN et al., 2007, 2011). Assim sendo, há necessidade de melhores métodos de avaliação *in vitro* para predizer a terapia antifúngica.

Devido à falta de pontos de corte de fluconazol para ambos os complexos de espécies e de voriconazol para *C. neoformans*, os isolados podem ser classificados, por meio de ECOFF, como não selvagens, os quais podem ter mecanismos de resistência por mutação gênica (EUCAST, 2024). Os pontos de corte determinados por EUCAST para voriconazol indicaram que todas as cepas de *Cryptococcus* spp. eram selvagens, permitindo inferir inexistência de mecanismos de resistência subjacente, a esse fármaco, nos 127 isolados de MS. De fato, todos os testes com voriconazol, bem como, com fluconazol resultaram em baixos valores de MIC, confirmando achados mundiais (BRANDT et al., 2001; GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; TAY et al., 2006). Na ausência de pontos de corte, valores de MIC acima de 8 mg/L de fluconazol foram associados à falha terapêutica e são vistos na literatura para definir resistência ao fluconazol (ALLER et al., 2000). A resistência a fluconazol em cepas virgens de exposição à terapia azólica não parece ser considerada um problema clínico importante (NASCIMENTO et al., 2017). Em extensa vigilância

populacional de *C. neoformans* na África do Sul (2002-2003 e 2007- 2008), os valores de MIC de fluconazol e voriconazol, mesmo antes do advento do fluconazol, eram altos (≥ 16 mg/L) (GOVENDER et al., 2011).

A correlação entre valores de MIC de fluconazol e desfecho clínico é pouco conhecida. Poucos estudos concluíram pela correlação clínico-laboratorial em contraste a diversas publicações que relataram ausência dessa relação (NASRI et al., 2016; O'CONNOR et al., 2021; VENA et al., 2019). No cenário clínico, a preocupação deve ser qual método e parâmetros de classificação estão disponíveis para avaliar o isolado infectante de *Cryptococcus*. Interpretação de MICs e combinações de antifúngicos *versus* organismos na ausência de pontos de interrupção é um desafio e deve ser feito com muito cuidado, tomando todos os dados disponíveis, incluindo dados clínicos, experiência, exposição ao medicamento durante a terapia. No entanto, pesquisas para determinação de MIC são necessárias pois, dados de MICs são fundamentais para consenso de novos ECOFFs e constituem um pré-requisito para futura seleção de pontos de corte clínicos.

O genótipo, por sua vez, também pode determinar a sensibilidade a antifúngicos e, deste modo, há grande interesse clínico em sua determinação. Nos 127 isolados analisados, o perfil de sensibilidade aos três antifúngicos não diferiu para os diferentes genótipos encontrados. De outro modo, valores de MIC elevados, frente a determinados genótipos clínicos de *Cryptococcus*, foram relatados em vários países. A taxa de mortalidade entre pacientes com infecção por *C. neoformans* variedade *neoformans* é, geralmente, alta. Por outro lado, as MICs do fluconazol para o genótipo VNII podem ser inferiores às dos outros genótipos; consequentemente, a caracterização molecular também é importante. Lozano-Chiu et al. (1998) destacam diferenças de sensibilidade entre os complexos de espécies, que podem ter impacto na terapêutica de infecções por *C. neoformans* e *C. gattii*. A relação entre genótipo e sensibilidade antifúngica foi, também, alvo de alguns estudos no Brasil (ANDRADE-SILVA et al., 2023; GRIZANTE BARIÃO et al., 2020; PFALLER et al., 2005).

Ainda que não se tenha encontrado resistência ou isolados não selvagens a todos os três antifúngicos analisados, um dos valores dos testes de sensibilidade é manter a vigilância e monitorar tendências epidemiológicas ao longo do tempo, com emergência de fenótipos ou genótipos resistentes (FIRACATIVE; MEYER; CASTAÑEDA, 2021). A determinação de resistência em *Cryptococcus* é relevante pois vários mecanismos foram já descritos em isolados clínicos do mundo todo. A

resistência aos fármacos antifúngicos se deve a evolução e mutações que *Cryptococcus* apresentam, como mutações no gene *erg11* que codifica a enzima-alvo (14-alfa demetilase) do fluconazol, assim como os demais fármacos azólicos. O gene apresenta um alto polimorfismo o que gera mutações que incorrem em alterações de aminoácidos na enzima-alvo, impedindo acoplamento do fármaco, resultando em resistência da célula fúngica. Outros mecanismos de resistência envolvem superexpressão de proteínas de membrana que são transportadoras de íons e compostos, incluindo antifúngicos, além de superexpressão de *erg11* e duplicação desse gene (aneuploidias) aumentando a produção da enzima-alvo (SANGUINETTI et al., 2006).

Além de mutações, a resistência antifúngica da cepa infectante pode ocorrer devido à alteração da estrutura morfológica da parede celular, onde a cápsula do exopolissacarídeo torna-se mais espessa e contribui para a resistência antifúngica e a formação de células titânicas (ZAFAR et al., 2019b). A virulência da cepa infectante, também, contribui para a resistência clínica e, embora a incidência de infecções por *C. gattii* seja menos frequente que por *C. neoformans*, *C. gattii* é geralmente menos sensível aos antifúngicos e algumas cepas VGII são menos sensíveis aos azóis, como visto naquelas do surto de Vancouver e noroeste dos Estados Unidos, que também são reconhecidas como hiper virulentas (MACDOUGALL et al., 2007). Pacientes com *C. gattii* frequentemente apresentam sequelas neurológicas que requerem cirurgia e terapia prolongada. Assim, *C. gattii* pode apresentar resposta mais lenta ou incompleta à terapia antifúngica (MELHEM et al., 2024).

A alta mortalidade, entre pacientes com meningite criptocócica e vivendo com HIV/aids sob terapia de anfotericina B e fluconazol não se deve, unicamente, a altos valores de MIC, evidenciando a grande problemática da utilidade do teste de sensibilidade, visto que há ausência de correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (NASCIMENTO et al., 2017). Apesar da raridade global de cepas com altos valores de MIC para anfotericina B e fluconazol, a recidiva e/ou doença refratária, bem como a elevada mortalidade, são características comuns das infecções criptocócicas; portanto, um desfecho clínico favorável depende de vários fatores, além da sensibilidade *in vitro* do agente causal, conforme revisado em estudo recente (MELHEM et al., 2024). Dentre estes fatores, a concentração antifúngica no tecido cerebral ou no líquido cefalorraquidiano difere entre os medicamentos e afeta a resposta terapêutica. Foram relatados resultados clínicos ruins em associação com

hipertensão intracraniana, alta carga fúngica, taxas lentas de esterilização do LCR e estado mental alterado na admissão (BROUWER et al., 2004).

Outras complicações comuns, que podem levar à descontinuação do medicamento e falha do tratamento, são efeitos adversos, incluindo disfunção renal, anemia, distúrbios eletrolíticos e reações no local da infusão, especialmente com terapia com anfotericina B; intolerância gastrointestinal apresentando-se como dor abdominal, aminotransferases elevadas e supressão da medula óssea pela citosina da gripe; ou mesmo erupção cutânea e anormalidades nas enzimas hepáticas, especialmente com altas doses de fluconazol (NGAN; FLOWER; DAY, 2022).

O amplo uso de antifúngicos, especialmente, profiláticos e fungistáticos azólicos, resultou na evolução de vários mecanismos de resistência entre isolados clínicos de *C. neoformans* nos países em desenvolvimento, o que motivou a idealização deste estudo. A sensibilidade dos isolados de *C. neoformans* frente à anfotericina B foi completa nesta pesquisa. Nos demais antifúngicos, devido à falta de valores de pontos de corte clínicos, os isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* só puderam ser classificados por meio de ECOFF como selvagens, que não devem possuir mecanismos de resistência subjacentes, o que não significa não ser resistente no âmbito clínico. No ambiente clínico, a preocupação deve ser no desenvolvimento de pontos de corte que necessitam estar disponíveis para avaliar o isolado infectante de *Cryptococcus* e estudos que contribuam para um consenso desse valor devem ser implementados ao redor do mundo (ESPINEL-INGROFF; CANTÓN, 2023). Estudos como este, fornecem dados importantes para monitorar emergência de resistência e os valores de MIC baixos, encontrados para três importantes antifúngicos usados no manejo da criptococose; apontam para a ausência de pressão seletiva de antifúngicos sobre isolados sensíveis de *Cryptococcus* na região Centro Oeste, estado do Mato Grosso do Sul ao longo de duas décadas. Nesse cenário, estudos de correlação clínica regionais poderão apontar outros fatores mais determinantes que o MIC no desfecho desfavorável da infecção criptocócica. Os tipos moleculares encontrados no estudo mostram grande diversidade e genótipos híbridos que, se confirmados, mostram a complexidade dos agentes de criptococose em MS, Brasil. Faz parte das medidas de prevenção e controle do Ministério da Saúde, reduzir a morbimortalidade por meningite criptocócica e estudos descrevendo a sensibilidade dos seus agentes podem contribuir nesse importante objetivo (BRASIL, 2024).

6. CONCLUSÕES

O estudo microbiológico de 127 isolados clínicos dos agentes da criptococose, no estado de Mato Grosso do Sul, entre 2002 e 2022, permitiu concluir:

- Em consonância a dados nacionais e regionais, o complexo de espécies prevalente foi *C. neoformans*; porém, reafirmou-se a ocorrência de aumento da frequência relativa de *C. gattii* nas últimas décadas, em especial, genótipo VGII já descrito na região;
- Notável frequência de genótipos híbridos VNIII, infrequentes na América Latina, bem como, dois achados de genótipos raros (VNIV e VGI) na região estudada, foi verificada
- Grande diversidade genotípica, com 6 tipos moleculares, foram encontrados, motivando futuros estudos para seguimento dessa ocorrência e eventuais mudanças;
- Não foram evidenciados fenótipos de resistência no grupo amostrado, confirmando a escassez dessa ocorrência, conforme registrado em outros estudos no Brasil;
- Correlação positiva entre valores de MIC de voriconazol e fluconazol foi verificada, permitindo inferir que os isolados tendem a ter perfis de sensibilidade semelhantes a ambos os fármacos e tem potencial para apresentarem resistência cruzada entre eles; por outro lado, cepas menos sensíveis à anfotericina B, tendem a ser mais sensíveis ao fluconazol e vice-versa. Ambas as considerações podem ter implicação no tratamento dos casos de criptococose na região estudada, e
- A análise de sensibilidade a anfotericina B, voriconazol e fluconazol não indicou diferença entre os complexos de espécies, ou entre os distintos genótipos, dos agentes da criptococose na região de MS, em contraste a estudos anteriores, estimulando monitoramento da epidemiologia molecular desses patógenos.

REFERÊNCIAS

- ALLER, A. I. et al. **Correlation of Fluconazole MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal Infection**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 6, p. 1544–1548, jun. 2000. DOI: 10.1128/aac.44.6.1544-1548.2000.
- AMINNEJAD, M. et al. **Identification and Characterization of VNI/VNII and Novel VNII/VNIV Hybrids and Impact of Hybridization on Virulence and Antifungal Susceptibility Within the *C. neoformans*/*C. gattii* Species Complex**. *PLOS ONE*, v. 11, n. 10, p. e0163955, 20 out. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163955.
- ANDRADE-SILVA, L. E. et al. **Genotyping Analysis of *Cryptococcus deuterogattii* and Correlation with Virulence Factors and Antifungal Susceptibility by the Clinical and Laboratory Standards Institute and the European Committee on Antifungal Susceptibility Testing Methods**. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 9, p. 889, set. 2023. DOI: 10.3390/jof9090889.
- ANVISA. **Plano nacional para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos em serviços de saúde**. Brasília: ANVISA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/pnpciras-e-pan-servicos-de-saude/pan-servicos-de-saude-2023-2027-final-15-12-2023.pdf>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- API. **Infecciones Fúngicas Sistémicas: manual práctico**. Asociación Panamericana de Infectología, 2019. Disponível em: https://circulomedicocba.org/wp-content/uploads/2020/02/Manual-de-Micologia-3ra-edicion_final.pdf. Acesso em: 1 dez 2024.
- BARKER, K. R. et al. **A Practical Workflow for the Identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucorales* by MALDI-TOF MS: Database, Medium, and Incubation Optimization**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 60, n. 12, p. e01032-22, 3 nov. 2022. DOI: 10.1128/jcm.01032-22.
- BASTOS, R. W. et al. **From the environment to the host: How non-azole agrochemical exposure affects the antifungal susceptibility and virulence of *Cryptococcus gattii***. *Science of The Total Environment*, v. 681, p. 516–523, set. 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.094.
- BECKER, P. et al. **Identification of fungal isolates by MALDI-TOF mass spectrometry in veterinary practice: validation of a web application**. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 31, n. 3, p. 471–474, 1 maio 2019. DOI: 10.1177/1040638719835577.
- BENHAM, R. W. **Cryptococci: Their Identification by Morphology and by Serology**. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 57, n. 3, p. 255–274, 1935. DOI: doi.org/10.1093/infdis/57.3.255.
- BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; HOWARD, D. H. **Epidemiologic**

differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*.

American Journal of Epidemiology, v. 105, n. 6, p. 582–586, 1 jun. 1977. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112423.

BERTOOUT, S. et al. **Search for *Cryptococcus neoformans/gattii* Complexes and Related Genera (*Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Naganishia*, *Papiliotrema*, *Solicoccozyma*, *Vishniacozyma*) spp. Biotope: Two Years Surveillance of Wild Avian Fauna in Southern France.** Journal of Fungi, v. 8, n. 3, p. 227, 24 fev. 2022. DOI: 10.3390/jof8030227.

BIDAUD, A. L.; CHOWDHARY, A.; DANNAOUI, E. ***Candida auris*: An emerging drug resistant yeast – A mini-review.** Journal de Mycologie Médicale, v. 28, n. 3, p. 568–573, 1 set. 2018. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.06.007.

BOEKHOUT, T. et al. **Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*: Taxonomic and Epidemiological Aspects.** v. 47, p. 432–422, abr. 1997. DOI: 10.1099/00207713-47-2-432.

BOULWARE, D. R. ***Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast.** The Lancet Infectious Diseases, v. 11, n. 6, p. 434, 1 jun. 2011. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70140-2.

BRANDT, M. E. et al. **Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 11, p. 3065–3069, nov. 2001. DOI: 10.1128/AAC.45.11.3065-3069.2001.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Brasília. Brasil Bol Epidemiol AIDS.** Ministério da Saúde, 1999.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tetano-acidental/publicacoes/guia-de-vigilancia-em-saude-6a-edicao.pdf/view>. Acesso em: 1 dez 2024.

BROUWER, A. E. et al. **Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial.** The Lancet, v. 363, n. 9423, p. 1764–1767, 29 maio 2004. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16301-0.

CHANG, M. R. et al. **Prostatic cryptococcosis: a case report.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 14, p. 378–385, 2008. DOI: 10.1590/S1678-91992008000200015.

COGLIATI, M. **Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types.** Scientifica, v. 2013, p. 1–23, 2013. DOI: 10.1155/2013/675213.

CORRÊA, M. DO P. S. C. et al. **Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, p. 505–508, out. 1999. DOI: 10.1590/S0037-86821999000500006 .

DANNAOUI, E. et al. **Results Obtained with Various Antifungal Susceptibility Testing Methods Do Not Predict Early Clinical Outcome in Patients with Cryptococcosis.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, n. 7, p. 2464–2470, jul. 2006. DOI: 10.1128/AAC.01520-05.

DATTA, K. et al. **Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States.** Emerging Infectious Diseases, v. 15, n. 8, p. 1185–1191, ago. 2009. DOI: 10.3201/eid1508.081384.

DUPONT, D. et al. **Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine microbiology laboratory.** Clinical Microbiology and Infection, v. 25, n. 7, p. 892–897, 1 jul. 2019. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.10.013.

EMMONS, C. W. **Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil.** Journal of Bacteriology, v. 62, n. 6, p. 685–690, dez. 1951. DOI: 10.1128/jb.62.6.685-690.1951.

ESPINEL-INGROFF, A.; CANTÓN, E. **Methods for Antifungal Susceptibility Testing of the *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* Complex: Strengths and Limitations.** Journal of Fungi, v. 9, n. 5, p. 542, maio 2023. DOI: 10.3390/jof9050542.

EUCAST. **Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures.** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2023a. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/EUCAST_BP_ECOFF_v_4.0.pdf. Acesso em: 1 dez 2024.

EUCAST. **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2023b. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E.Def_7.4_Yeast_definitive_revised_2023.pdf. Acesso em: 1 dez 2024.

EVANS, E. E.; SORENSEN, L. J.; WALLS, K. W. **The antigenic composition of *cryptococcus neoformans*.** Journal of Bacteriology, v. 66, n. 3, p. 287–293, set. 1953. DOI: 10.1128/jb.66.3.287-293.1953.

FARRER, R. A. et al. **A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezian Miombo Woodlands.** mBio, v. 10, n. 6, p. e02306-19, 12 nov. 2019. DOI: 10.1128/mBio.02306-19.

FIRACATIVE, C. et al. **The status of cryptococcosis in Latin America.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 113, p. e170554, 5 abr. 2018. DOI: 10.1590/0074-02760170554.

FIRACATIVE, C.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. ***Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes in Latin America: A Map of Molecular Types, Genotypic Diversity, and Antifungal Susceptibility as Reported by the Latin American Cryptococcal Study Group.** Journal of Fungi, v. 7, n. 4, p. 282, abr. 2021. DOI: 10.3390/jof7040282.

FIRACATIVE, C.; TRILLES, L.; MEYER, W. **MALDI-TOF MS Enables the Rapid Identification of the Major Molecular Types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex.** PLOS ONE, v. 7, n. 5, p. e37566, 29 maio 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0037566.

GERSTEIN, A. C. et al. **Polyploid Titan Cells Produce Haploid and Aneuploid Progeny To Promote Stress Adaptation.** mBio, v. 6, n. 5, p. 10.1128/mbio.01340-15, 13 out. 2015. DOI: 10.1128/mBio.01340-15.

GOMES, M. **Criptococose em hospital de referência em Mato Grosso Sul: caracterização epidemiológica, fenotípica e genética.** Mato Grosso do Sul: Repositório da UFMS, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/1870>>. Acesso em: 1 dez 2024.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. **In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates.** Clinical Microbiology and Infection, v. 14, n. 7, p. 727–730, 1 jul. 2008. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02021.x.

GOVENDER, N. P. et al. **Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates Obtained through Population-Based Surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55, n. 6, p. 2606–2611, 18 maio 2011. DOI: 10.1128/AAC.00048-11.

GRIZANTE BARIÃO, P. H. et al. **Molecular typing in vitro susceptibility and virulence of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex clinical isolates from south-eastern Brazil.** Mycoses, v. 63, n. 12, p. 1341–1351, 2020. DOI: 10.1111/myc.13174.

GUIMARÃES, M. D. C. **Estudo temporal das doenças associadas à AIDS no Brasil, 1980-1999.** Cadernos de Saúde Pública, v. 16, n. suppl 1, p. S21–S36, 2000. DOI: 10.1590/S0102-311X2000000700003.

HAGEN, F. et al. **Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex.** Fungal Genetics and Biology, v. 78, p. 16–48, maio 2015. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.02.009.

HAGEN, F. et al. **Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus.** mSphere, v. 2, n. 4, p. e00238-17, 30 ago. 2017. DOI: 10.1128/mSphere.00238-17.

KHELL DA SILVA, B. et al. **Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil.** Revista Iberoamericana de Micología, v. 29, n. 1, p. 40–43, 1 jan. 2012. DOI: 10.1016/j.riam.2011.05.003.

KWON-CHUNG, K. J. et al. ***Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 4, n. 7, p. a019760–a019760, 1 jul. 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a019760.

KWON-CHUNG, K. J. et al. **The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis.** mSphere, v. 2, n. 1, p. mSphere.00357-16, e00357-16, 22 fev. 2017. DOI: 10.1128/mSphere.00357-16.

LACAZ, S. S. **Tratado de micologia médica.** 9.ed ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LARSEN, R. A. et al. **In Vitro-Clinical Correlations for Amphotericin B Susceptibility in AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, n. 1, p. 343–345, jan. 2007. DOI: 10.1128/AAC.00742-06.

LARSEN, R. A. et al. **Correlation of Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B with Clinical Outcome.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55, n. 12, p. 5624–5630, 11 nov. 2011. DOI: 10.1128/AAC.00034-11.

LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. **Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil.** Medical Mycology, v. 31, n. 6, p. 449–454, jan. 1993. DOI: 10.1080/02681219380000581.

LINDENBERG, A. D. S. C. et al. **Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 50, p. 75–78, abr. 2008. DOI: 10.1590/S0036-46652008000200002.

LODDER, J.; KREGER-VAN RIJ, J. **The yeasts-a taxonomic study.** [s.l.] Taylor & Francis, Ltd, 1952.

LÓPEZ-JODRA, O. et al. **In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 45, n. 5, p. 645–649, 1 maio 2000. DOI: 10.1093/jac/45.5.645.

LOZANO-CHIU, M. et al. **Detection of Resistance to Amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolates: Performances of Three Different Media Assessed by Using E-Test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies.** Journal of Clinical Microbiology, v. 36, n. 10, p. 2817–2822, out. 1998. DOI: 10.1128/JCM.36.10.2817-2822.1998.

MACDOUGALL, L. et al. **Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and Detection in the Pacific Northwest, USA.** Emerging Infectious Diseases, v. 13, n. 1, p. 42–50, jan. 2007. DOI: 10.3201/eid1301.060827.

MARTINEZ, L. R.; MOUSSAI, D.; CASADEVALL, A. **Antibody to *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Inhibits the Release of Capsular Antigen.** Infection and Immunity, v. 72, n. 6, p. 3674–3679, jun. 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3674-3679.2004.

MELHEM, M. S. C. et al. **Antifungal Resistance in Cryptococcal Infections.** Pathogens, v. 13, n. 2, p. 128, 29 jan. 2024. DOI: 10.3390/pathogens13020128.

MEYER, W. et al. **Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates.** Emerging Infectious Diseases, v. 9, n. 2, p. 189–195, fev. 2003. DOI: 10.3201/eid0902.020246.

MONTOYA, M. C.; MAGWENE, P. M.; PERFECT, J. R. **Associations between *Cryptococcus* Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review.** Journal of Fungi, v. 7, n. 4, p. 260, 30 mar. 2021. DOI: 10.3390/jof7040260.

MUZAZU, S. G. Y. et al. **Prevalence of cryptococcal meningitis among people living with human immuno-deficiency virus and predictors of mortality in adults on induction therapy in Africa: A systematic review and meta-analysis.** Frontiers in Medicine, v. 9, p. 989265, 8 set. 2022. DOI: 10.3389/fmed.2022.989265.

NASCIMENTO, E. et al. ***Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 59, p. e49, 3 ago. 2017. DOI: 10.1590/S1678-9946201759049.

NASRI, H. et al. **Retrospective Study of Cryptococcal Meningitis With Elevated Minimum Inhibitory Concentration to Fluconazole in Immunocompromised Patients.** Open Forum Infectious Diseases, v. 3, n. 2, p. ofw076, 1 abr. 2016. DOI: 10.1093/ofid/ofw076.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. **Genetic Diversity of the *Cryptococcus* Species Complex Suggests that *Cryptococcus gattii* Deserves to Have Varieties.** PLoS ONE, v. 4, n. 6, p. e5862, 10 jun. 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0005862.

NGAN, N. T. T.; FLOWER, B.; DAY, J. N. **Treatment of Cryptococcal Meningitis: How Have We Got Here and Where are We Going?** Drugs, v. 82, n. 12, p. 1237–1249, 1 ago. 2022. DOI: 10.1007/s40265-022-01757-5.

NGAN, N. T. T.; FLOWER, B.; DAY, J. N. **Treatment of Cryptococcal Meningitis: How Have We Got Here and Where are We Going?** Drugs, v. 82, n. 12, p. 1237–1249, 1 ago. 2022. DOI: 10.1007/s40265-022-01757-5. DOI: 10.1007/s40265-022-01757-5.

NISHIKAWA, M. M. et al. **Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns.** Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n. 1, p. 73–77, jan. 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.1.73-77.2003.

NORMAND, A.-C. et al. **Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases.** BMC Microbiology, v. 17, n. 1, p. 25, 31 jan. 2017. DOI: 10.1186/s12866-017-0937-2.

NORMAND, A.-C. et al. **MALDI-TOF Mass Spectrometry Online Identification of Trichophyton indotineae Using the MSI-2 Application.** Journal of Fungi, v. 8, n. 10, p. 1103, out. 2022. DOI: 10.3390/jof8101103.

NUNES, J. DE O. et al. **Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 51, p. 485–492, ago. 2018. DOI: 10.1590/0037-8682-0050-2018.

O'CONNOR, L. et al. **Antifungal Susceptibility Does Not Correlate With Fungal Clearance or Survival in AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis.** Clinical Infectious Diseases, v. 73, n. 7, p. e2338–e2341, 1 out. 2021. DOI: 10.1093/cid/ciaa1544.

OLIVEIRA, N. K. et al. **Novel ABC Transporter Associated with Fluconazole Resistance in Aging of *Cryptococcus neoformans*.** Journal of Fungi, v. 8, n. 7, p. 677, jul. 2022. DOI: 10.3390/jof8070677.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. **Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 45, n. 6, p. 299–305, dez. 2003. DOI: 10.1590/s0036-46652003000600001.

PERKINS, A. et al. **Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 56, n. 6, p. 1144–1147, 1 dez. 2005. DOI: 10.1093/jac/dki393.

PFALLER, M. A. et al. **Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004).** Journal of Clinical Microbiology, v. 43, n. 5, p. 2163–2167, maio 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2163-2167.2005.

POWDERLY, W. G. **Editorial Response: Management of Cryptococcal Meningitis-Have We Answered All the Questions?** Clinical Infectious Diseases, v. 22, n. 2, p. 329–330, 1 fev. 1996. DOI: 10.1093/clinids/22.2.329.

PRADO, M. et al. **Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 3, p. 513–521, maio 2009. DOI: 10.1590/s0074-02762009000300019.

PROBERT, M. et al. **A Glucuronoxylomannan Epitope Exhibits Serotype-Specific Accessibility and Redistributes towards the Capsule Surface during Titanization of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*.** Infection and Immunity, v. 87, n. 4, p. 10.1128/iai.00731-18, 25 mar. 2019. DOI: 10.1128/IAI.00731-18.

RAJASINGHAM, R. et al. **Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis.** The Lancet Infectious Diseases, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30243-8.

RAJASINGHAM, R. et al. **The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis.** The Lancet Infectious Diseases, v. 22, n. 12, p. 1748–1755, 1 dez. 2022. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00499-6.

RIBEIRO, L. C. et al. **Micoses sistêmicas: fatores associados ao óbito em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2005-2008.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 6, p. 698–705, dez. 2009. DOI: 10.1590/s0037-86822009000600017.

SANFELICE, F. **Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti.** Ann Igien, v. 4, p. 463-495, 1894.

SANGUINETTI, M. et al. **Role of AFR1, an ABC Transporter-Encoding Gene, in the In Vivo Response to Fluconazole and Virulence of *Cryptococcus neoformans*.** Infection and Immunity, v. 74, n. 2, p. 1352–1359, fev. 2006. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1352-1359.2006.

SCHOCH, C. L. et al. **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 17 abr. 2012. DOI: 10.1073/pnas.1117018109.

SILVA, E. G. D. et al. ***Cryptococcus* and Cryptococcosis in Human and Animal Model: An Overview.** Advances in Microbiology, v. 10, n. 04, p. 180–193, 2020. DOI: 10.1016/j.alit.2023.07.002.

SPERANDIO, P. L. et al. **Pneumonia Fúngica e Criptococose: Revisão Abrangente dos Desafios Diagnósticos, Abordagens Terapêuticas e Impactos Clínicos em Populações Imunocomprometidas.** A.R International Health Beacon Journal (ISSN 2966-2168), v. 1, n. 4, p. 330–340, 27 ago. 2024. DOI: 10.5281/zenodo.13380035.

STEIN, M. et al. **Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada.** Mycoses, v. 61, n. 10, p. 743–753, 2018. DOI: 10.1111/myc.12800.

TAKAHASHI, J. P. F. et al. **Could Fungicides Lead to Azole Drug Resistance in a Cross-Resistance Manner among Environmental *Cryptococcus* Strains?** Current Fungal Infection Reports, v. 14, n. 1, p. 9–14, 1 mar. 2020. DOI: 10.1007/s12281-020-00373-8.

TAY, S. T. et al. **In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs.** Mycoses, v. 49, n. 4, p. 324–330, 2006. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2006.01242.x.

TSUJISAKI, R A S. **Estudo clínico-epidemiológico e molecular da criptococose Em Mato Grosso Do Sul.** Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela FAMED/UFMS, 2019

VENA, A. et al. **Fluconazole resistance is not a predictor of poor outcome in patients with cryptococcosis.** *Mycoses*, v. 62, n. 5, p. 441–449, 2019. DOI: 10.1111/myc.12847.

VIDAL, J. E. et al. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 353–362, maio 2013

VIDAL, J. E. et al. **Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, n. 1, p. 68–73, maio 2012. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.014.

WEMBABAZI, A. et al. **Prevalence of *Cryptococcus gattii* in Ugandan HIV-infected patients presenting with cryptococcal meningitis.** *PLOS ONE*, v. 17, n. 7, p. e0270597, 15 jul. 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0270597. eCollection 2022.

WHO. Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **World Health Organization**, oct 2022. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>>. Acesso em: 1 dez 2024

WITT, M. D. et al. **Identification of Patients with Acute AIDS-Associated Cryptococcal Meningitis Who Can Be Effectively Treated with Fluconazole: The Role of Antifungal Susceptibility Testing.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, n. 2, p. 322–328, 1 fev. 1996. DOI: 10.1093/clinids/22.2.322.

ZAFAR, H. et al. **A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*.** *Current opinion in microbiology*, v. 52, p. 158-164, 2019. DOI: doi.org/10.1016/j.mib.2019.11.001.

ZARAGOZA, O. **Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*.** *Virulence*, v. 10, n. 1, p. 490–501, 1 jan. 2019. DOI: 10.1080/21505594.2019.1614383.

ZVEZDANOVA, M. E. et al. **Implementation of MALDI-TOF Mass Spectrometry and Peak Analysis: Application to the Discrimination of *Cryptococcus neoformans* Species Complex and Their Interspecies Hybrids.** *Journal of Fungi*, v. 6, n. 4, p. 330, 2 dez. 2020. DOI: 10.3390/jof6040330.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Características de 127 isolados causadores de criptococose no estado de Mato Grosso do Sul, 2002 a 2022

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)			Amostra biológica		
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L01	Cn	2,180	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	29,9	VNI/VNII/VNB	0,12	0,5	0,015	HSJ	LCR	2020
L02	Cn	2,000	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	20,02	VNIII	0,12	0,5	0,015	HRMS	LCR	2007
L06	Cn	2,400	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	25,91	VNI/VNII/VNB	4	0,03	0,06	TLA	LCR	2006
L07	Cn	2,320	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	24,5	VNI/VNII/VNB	2	0,12	0,12	HRMS	ESC	2006
L08	Cn	2,100	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	21,27	VNI/VNII/VNB	2	0,03	0,25	HRMS	LCR	2005
L09	Cn	2,310	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	29,69	VNI/VNII/VNB	8	0,12	0,5	HSJ	LCR	2006
L10	Cn	2,050	C	<i>C. deneoformans</i> (<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>)	15,65	VNIV	1	0,5	0,015	CGR	UR	2006
L11	Cn	2,080	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	24,96	VNI/VNII/VNB	1	0,12	0,015	HU	BIO	2009
L12	Cn	2,180	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	30,6	VNI/VNII/VNB	1	0,5	0,06	CCG	LCR	2011

Continuação Apêndice 1

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)	Amostra biológica				
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L14	Cn	2,120	A	<i>C. deneoformans</i> (<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>)	20,22	VNIV	4	0,12	0,015	SC	LCR	2019
L15	Cn	2.14	A	<i>C. deneoformans</i> (<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>)	24,86	VNIV	1	0,5	0,015	HSJ	LCR	2011
L17	Cg	2.15	A	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	27,94	VGII	0,5	0,5	0,015	HU	BIO	2009
L18	Cn	2,360	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	39,57	VNI/VNII/VNB	1	0,12	0,015	HSJ	LCR	2020
L19	Cn	1,720		NI	0	NI	0,12	0,12	0,015	HRMS	LCR	2007
L21	Cn	2,050		NI	0	NI	0,25	0,12	0,03	SC	LCR	2006
L22	Cn	2,250	C	NI	0	NI	0,12	0,015	0,015	HRMS	LCR	2007
L24	Cn	2.32		NI	0	NI	0,12	0,12	0,015	HSJ	LCR	2008

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)			Amostra biológica		
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L25	Cn	2.24		NI	0	NI	0,25	0,25	0,015	LACEN	LCR	2004
L30	Cn	2.17	A	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	33,58	VNI/VNII/VNB	0,12	0,12	0,015	HSJ	SG	2020
L31	Cn	2.22	C	NI	15,05	NI	0,12	0,5	0,03	HU	SG	2020
L32	Cg	2,040	C	NI	18,55	NI	0,12	0,12	0,015	LACEN	BIO	2009
L33	Cn	2,130	C	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	18,55	VNIII	0,25	0,25	0,015	TLA	LCR	2005
L34	Cn	2.00		NI	0	NI	0,5	0,25	0,015	LACEN	LCR	2020
L35	Cn	2,080	A	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	12,03	VNI/VNII/VNB	0,5	0,25	0,015	LACEN	LCR	2002
L36	Cn	2.32	C	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	18,33	VNI/VNII/VNB	1	0,5	0,03	HRMS	LCR	2009
L37	Cn	2,190	B	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	17,23	VNI/VNII/VNB	1	0,5	0,015	HSJ	LCR	2006
L39	Cn	2,050	C	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	14,13	VNI/VNII/VNB	0,12	0,5	0,015	HSJ	LCR	2012
L40	Cn	2.23	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	25,2	VNIII	0,12	0,5	0,015	RVE	LCR	2020
L41	Cn	2.24	C	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	17,07	VNI/VNII/VNB	0,25	0,5	0,015	HRMS	LCR	2009

Continuação Apêndice 1

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)	Amostra biológica				
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L42	Cn	2.39	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	23,38	VNI/VNII/VNB	0,12	0,25	0,12	HU	UR	2009
L43	Cn	2.18		NI	0	NI	0,12	0,25	0,015	HSJ	LCR	2011
L45	Cn	1,920	C	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	13,65	VNI/VNII/VNB	2	0,008	0,015	HU	LCR	2006
L46	Cn	2,17		<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	12,86	VNI/VNII/VNB	0,5	0,008	0,015	HU	LCR	2010
L47	Cn	2.00	B	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	28,25	VNIII	0,5	0,008	0,015	CGR	LCR	2008
L48	Cn	2,050		<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	28,08	VNI/VNII/VNB	1	0,5	0,015	HSJ	LCR	2006
L50	Cn	1,780	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	25,79	VNI/VNII/VNB	0,12	0,5	0,03	CGR	LCR	2004
L51	Cn	2,040	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	21,33	VNIII	0,12	0,5	0,015	HDIA	LCR	2019

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)			Amostra biológica		
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L52	Cn	1,970	B	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	27,4	VNI/VNII/VNB	0,25	0,5	0,015	HU	LCR	2006
L53	Cn	1,900	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	26,82	VNIII	0,25	0,5	0,015	CGR	AMO	2008
L54	Cg	2,120	B	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	22,18	VGII	4	0,12	0,015	HRMS	LCR	2012
L56	Cn	2,350	C	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	18,12	VNI/VNII/VNB	4	0,12	0,25	HSJ	LCR	2004
L57	Cn	2,190	C	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	16,35	VNI/VNII/VNB	0,12	0,06	0,015	HRMS	LCR	2005
L58	Cn	2,030	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	23	VNIII	1	0,015	0,03	PPO	LCR	2020
L59	Cn	2,060	C	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	14,61	VNI/VNII/VNB	1	0,008	0,015	HSJ	LCR	2020
L60	Cn	2,020	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	24,68	VNIII	1	0,015	0,06	COR	LCR	2021
L61	Cn	1,940	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	22,41	VNIII	4	0,015	0,06	COR	LCR	2020
L64	Cn	1,900		NI	0	NI	0,120	0,120	0,030	CGR	SI	2009
L68	Cg	2,170	A	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	36,52	VGII	0,5	0,5	0,015	CGR	BIO	2020
L69	Cn	2,340	C	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	12,88	VNI	0,5	0,5	0,03	HRMS	LCR	2021
L70	Cg	2,190	A	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	32,04	VGII	1	0,25	0,015	CGR	LBA	2021
L71	Cn	2,170	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	26,83	VNIII	0,5	0,12	0,015	HU	LCR	2021

Continuação Apêndice 1

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)	Amostra biológica				
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L72	Cn	2,180	C	<i>C. deneoformans</i> (<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>)	17,94	VNIV	1	0,12	0,03	HU	LCR	2022
L73	Cn	2,260	C	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (<i>híbrido</i>)	13,82	VNIII	0,12	0,12	0,015	HU	LCR	2021
L74	Cn	2,060	C	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (<i>híbrido</i>)	13,13	VNIII	2	0,12	0,06	HU	UR	2022
L75	Cn	2,150	C	<i>C. deneoformans</i> (<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>)	18,26	VNIV	1	0,25	0,015	HU	AT	2022
L76	Cn	1,89	C	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	16,85	VNI/VNII/VNB	2	0,06	0,03	HU	SG	2022
L77	Cn	2,110	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (<i>híbrido</i>)	21,89	VNIII	1	0,12	0,015	HU	SG	2022
L78	Cn	2,250	B	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (<i>híbrido</i>)	26,19	VNIII	2	0,12	0,015	HU	UR	2022
L79	Cn	2,100	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (<i>híbrido</i>)	30,21	VNIII	1	0,12	0,015	HU	LCR	2022
L80	Cn	2,410	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	39,73	VNI/VNII/VNB	1	0,12	0,015	HU	SG	2018
L81	Cn	2,100	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (<i>híbrido</i>)	22,37	VNIII	4	0,25	0,015	CCG	LCR	2021

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)			Amostra biológica		
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L84	Cn	2,090	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	23,87	VNIII	4	0,12	0,03	HU	SG	2019
L85	Cn	2,140	B	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	26,51	VNIII	2	0,12	0,015	CGR	LCR	2019
L88	Cn	2,050	B	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	30,55	VNI/VNII/VNB	0,25	0,25	0,015	HU	LCR	2019
L89	Cn	2,180	B	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	28,72	VNI/VNII/VNB	0,25	0,12	0,015	HU	SG	2019
L90	Cn	2,080	B	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	23,28	VNIII	0,12	0,25	0,015	AQU	SG	2019
L91	Cn	2,060	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	29,28	VNIII	2	0,5	0,015	HU	LCR	2019
L97	Cn	2,110	A	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	20,77	VNI/VNII/VNB	2	0,5	0,015	HU	LCR	2020
L98	Cn	2,210	B	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	24,36	VNIII	2	0,25	0,015	HU	SG	2020
L99	Cn	2,080	B	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	27,44	VNI/VNII/VNB	0,12	0,25	0,015	HU	LCR	2020
L107	Cn	2,170	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	20,66	VNIII	4	0,25	0,015	HU	SG	2021
L108	Cn	2,120	B	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	23,96	VNIII	2	0,12	0,03	HU	SG	2021
L110	Cn	1,930	C	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	16,88	VNI/VNII/VNB	2	0,25	0,015	HU	LCR	2019
L111	Cn	2,050	A	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	25,75	VNI/VNII/VNB	0,5	0,25	0,015	HU	LCR	2021

Continuação Apêndice 1

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)	Amostra biológica				
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L123	Cn	2.18	C	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	16,07	VNI/VNII/VNB	4	0,5	0,06	HU	LCR	2022
L125	Cn	2,200	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	22,75	VNI/VNII/VNB	4	0,12	0,12	CGR	LCR	2021
L127	Cn	1,950	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	21,34	VNIII	2	0,06	0,015	DOU	LCR	2022
L129	Cg	2,230	A	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	42,74	VGII	0,12	0,12	0,015	SC	LCR	2013
L130	Cn	2,100	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	30,21	VNIII	4	0,25	0,015	CGR	LCR	2021
L131	Cg	1,740		NI	0	NI	4	0,5	0,03	SC	LCR	2013
L132	Cg	1,950		NI	0	NI	4	0,06	0,06	SC	LCR	2013
L133	Cn	2,250	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	27,67	VNIII	2	0,015	0,015	CGR	LCR	2021
L134	Cn	2,140	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	24,29	VNIII	2	0,03	0,06	CGR	LCR	2021
L135	Cn	2,160	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	22,42	VNIII	2	0,5	0,015	HRMS	LCR	2022

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)			Amostra biológica		
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L136	Cn	2,180	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	25,56	VNIII	4	0,12	0,015	CGR	AMO	2021
L138	Cn	2,080	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	22,79	VNIII	0,12	0,06	0,015	CGR	LCR	2021
L139	Cn	2,070	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	27,77	VNIII	2	0,5	0,015	HRMS	UR	2022
L140	Cn	2,130	A	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	30,52	VNI/VNII/VNB	0,5	0,5	0,5	SI	LCR	SI
L141	Cn	1,870	B	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	23,82	VNIII	4	0,12	0,06	CGR	SG	SI
L142	Cg	2,360	A	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	31,23	VGII	4	0,5	0,015	COR	LCR	2022
L143	Cg	2,100		NI	0	NI	1	0,25	0,015	LACEN	LCR	2022
L144	Cn	2,100		NI	0	NI	0,12	0,25	0,015	HRMS	LCR	2022
L145	Cn	2,080	B	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	26,47	VNIII	0,12	0,5	0,015	HRMS	UR	2022
L146	Cg	2,000	B	<i>Cryptococcus gattii</i>	21,37	VGI	0,12	0,015	0,015	HU	LCR	2022
L148	Cn	2,070		NI	0	NI	0,12	0,25	0,015	CGR	SG	2019
L149	Cn	2,320	A	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	33,79	VNI/VNII/VNB	4	0,06	0,06	HU	LCR	2022
L150	Cn	2,120		NI	0	NI	8	0,12	0,12	HU	SG	2022
L153	Cn	2,130	B	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	25,88	VNIII	0,12	0,25	0,015	HU	LCR	2022
L154	Cn	2,320	C	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	18,76	VNIII	4	0,06	0,12	HU	UR	2022
L155	Cg	2,100		NI	0	NI	4	0,12	0,06	HU	ESC	2022

Continuação Apêndice 1

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)	Amostra biológica				
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L156	Cn	2,140	C	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	17,83	VNIII	1	0,12	0,03	HU	SG	2022
L159	Cn	2,100	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	28,61	VNI/VNII/VNB	1	0,03	0,12	HU	LCR	2021
L163	Cn	2,130		NI	0	NI	2	0,25	0,03	HU	SG	2022
L164	Cn	2,070	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	23,45	VNIII	4	0,12	0,12	HU	SG	2022
L165	Cn	2,180	A	<i>C. neoformans</i> x <i>deneoformans</i> (híbrido)	29,68	VNIII	4	0,25	0,12	HU	LCR	2022
L167	Cn	2,070		NI	0	NI	2	0,25	0,03	HU	LCR	2022
L168	Cg	1,950		NI	0	NI	8	0,12	0,25	HU	AT	2022
L169	Cn	2,080	C	NI	0	NI	4	0,12	0,06	HU	LCR	2019
L170	Cn	2,130	A	<i>C. neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>)	30,55	VNI/VNII/VNB	0,12	0,03	0,015	HU	LCR	2019

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)			Amostra biológica		
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L171	Cn	1,850		NI	0	NI	4	0,12	0,12	CGR	ESC	2022
L172	Cn	2,090	C	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	14,46	VNI/VNII/VNB	0,5	0,5	0,015	HU	SG	2022
L174	Cn	2,210	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	30,53	VNIII	0,5	0,5	0,06	HU	SG	2019
L175	Cn	2,140	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	28,73	VNIII	2	0,12	0,06	HU	LCR	2018
L176	Cn	2,130	C	<i>C. deneoformans x C. gattii hybrid</i>	13,02	AFLP8 Híbrido DB	2	0,12	0,015	HU	SG	2022
L177	Cn	2,030	C	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	15,77	VNI/VNII/VNB	0,5	0,5	0,015	CGR	LCR	2022
L178	Cn	2,130	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	25,4	VNIII	1	0,5	0,015	CGR	LCR	2022
L179	Cn	2,180	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	32,08	VNIII	0,5	0,5	0,015	HU	UR	2022
L180	Cn	2,080		NI	0	NI	2	0,25	0,015	HU	LCR	2022
L181	Cn	2,430	A	<i>C. neoformans (Cryptococcus neoformans var. grubii)</i>	34,5	VNI/VNII/VNB	0,25	0,25	0,015	HU	LCR	2022
L184	Cn	2,130		NI	0	NI	8	0,12	0,25	HU	AMO	2006
L189	Cn	2,040	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	28,06	VNIII	4	0,12	0,06	HU	UR	2022
L196	Cn	1,890		NI	0	NI	4	0,12	0,06	HU	LCR	2022
L197	Cn	2,310	A	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	29,48	VNIII	2	0,5	0,015	HSJ	ESC	2006

Continuação Apêndice 1

Isolado	Bruker	Bruker	MSI	MSI	MSI	MIC (mg/L)	Amostra biológica					
N	Resultado	Escore	Índice	Resultado	Escore	GENÓTIPO	FCZ	AmB	VCZ	Hospital	Tipo	Ano
L198	Cn	2,430		NI	0	NI	0,12	0,06	0,015	LACEN	AMO	2022
L199	Cn	2,020	C	<i>C. neoformans x deneoformans (híbrido)</i>	19,72	VNIII	4	0,12	0,12	HU	LCR	2021
L202	Cn	2,140	C	NI	0	NI	2	0,12	0,03	HSJ	LCR	2022
L203	Cn	2,310	C	NI	0	NI	0,25	0,03	0,015	CGR	LCR	2022
L204	Cn	2,050		NI	0	NI	1	0,25	0,03	SC	AT	2022

AmB, Anfotericina B; FCZ, Fluconazol; VCZ, Voriconazol; HU, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian/ HUMAP/EBSERH; HRMS, Hospital Regional Rosa Pedrossian; HSJ, Hospital São Julião; HDIA, Hospital Dia/HU; AQU, Aquidauana; COR, Corumbá; TLA, Três Lagoas; LACEN, Laboratório Central de Saúde Pública; CCG, Clínica Campo Grande; SC, Santa Casa; SI, sem informação; CGR, Campo Grande; PPO, Ponta Porã; RVE, Rio Verde de Mato Grosso.

