

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Hafsa Muhd Gharyb Alves

**IMPLEMENTAÇÃO DE MICOTECA E BANCO DE DNA DE FUNGOS PATOGÊNICOS
ISOLADOS DE PACIENTES COM HIV/AIDS**

Campo Grande - MS
2024

HAFSA MUHD GHARYB ALVES

**IMPLEMENTAÇÃO DE MICOTECA E BANCO DE DNA DE FUNGOS PATOGÊNICOS
ISOLADOS DE PACIENTES COM HIV/AIDS**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof Dr James Venturini.

Campo Grande - MS
2024

AGRADECIMENTOS

A minha mãe que me deu apoio total e apesar de todas as dificuldades me fortaleceu, que para mim foi muito importante.

Ao meu orientador, Dr. James Venturini pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Ao meu amigo Arthur e a todos colegas de graduação, que me apoiaram e me ajudaram durante o curso.

RESUMO

Os pacientes vivendo com HIV têm um risco aumentado de desenvolver infecções fúngicas invasivas, representando uma ameaça significativa para indivíduos com determinados níveis de imunossupressão e levantando preocupações no âmbito da saúde pública. Fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Cryptococcus* e *Histoplasma*, são notáveis causadores dessas infecções nesta população, resultando em taxas de letalidade aumentadas entre pacientes com aids. Estudos de biologia molecular desempenham um papel crucial na compreensão da distribuição e patogênese desses fungos, elucidando suas interações tanto com o ambiente quanto com os hospedeiros. Um banco de dados abrangente, que incorpora análises morfofenotípicas clássicas juntamente com estudos genômicos, pode fornecer informações valiosas sobre essas espécies. O objetivo do presente estudo foi estabelecer uma coleção de fungos (micoteca) e um repositório de DNA. Além disso, para validar o banco de dados, um estudo observacional foi conduzido utilizando isolados fúngicos obtidos de pacientes com HIV/aids no HUMAP. Para otimizar a gestão de dados, foi implementado um banco de dados online utilizando a plataforma REDCap para armazenar informações clínicas e micológicas, e a plataforma eLabInventory para controle e administração. O banco de dados REDCap incluiu dados gerais da amostra, análise fenotípica, análise molecular de DNA e teste de sensibilidade antifúngica. A análise fenotípica revelou uma maior incidência de *Cryptococcus* spp. (70%), seguido por *Histoplasma* spp. (30%). Foram desenvolvidos protocolos eficientes para o isolamento e armazenamento desses fungos, garantindo a preservação de sua viabilidade. O estabelecimento de uma coleção de fungos e um repositório de DNA representa uma iniciativa estratégica para gerenciar isolados fúngicos, fornecendo dados centralizados e seguros para análises e vigilância epidemiológica. Essa iniciativa contribui globalmente para a compreensão de fungos patogênicos, aprimorando nossa capacidade de combater essas infecções.

Palavras-chave: infecções fúngicas invasivas, genômica, histoplasmose, criptococose, HIV/aids, coleção de cultura microbiológica.

ABSTRACT

Patients living with HIV have a heightened risk of developing invasive fungal infections, posing a significant threat to individuals with specific immunosuppression levels and raising concerns within the realm of public health. Fungi such as those belonging to the *Cryptococcus* and *Histoplasma* genera are notable culprits behind these infections in this population, resulting in increased fatality rates among AIDS patients. Molecular biology studies play a crucial role in unraveling the distribution and pathogenesis of these fungi, elucidating their interactions with both the environment and hosts. A comprehensive database, incorporating classical morphophenotypic analyses alongside genomic studies, can provide valuable insights into these species. The objective of this research was to establish a fungal collection and a DNA repository. An observational study was also conducted using fungal isolates obtained from HIV/AIDS patients at HUMAP in order to validate the fungal collection. To streamline data management, an online database was implemented using the REDCap platform for storing clinical and mycological information, and the eLabInventory platform for control and administration purposes. The REDCap database included sample general data, phenotypic analysis, molecular DNA analysis, and antifungal sensitivity testing. Phenotypic analysis revealed a higher incidence of *Cryptococcus* spp. (70%) followed by *Histoplasma* spp. (30%). Efficient protocols for the isolation and storage of these fungi were developed, ensuring the preservation of their viability. The establishment of a fungal collection and DNA repository represents a strategic initiative for managing fungal isolates, providing centralized and secure data for analyses and epidemiological surveillance. This initiative contributes globally to the understanding of pathogenic fungi, enhancing our ability to combat these infections.

Key-word: invasive fungal infections, genomics, histoplasmosis, cryptococcosis, HIV/AIDS, fungal collection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos através dos anos nos estados brasileiros

Figura 2: Sessão dados gerais do isolado

Figura 3: Sessão de análise fenotípica

Figura 4: Sessão de biologia molecular

Figura 5: Sessão de sequenciamento molecular

Figura 6: eLabInventory da micoteca do LabDIP

Figura 7: Amostras biológicas

Figura 8: Identificação fenotípica

LISTA DE ABREVIÇÕES

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

DNA - Ácido desoxirribonucleico

IFIs - Infecções fúngicas invasivas

PVHIV - Pessoas vivendo com HIV

SNC - Sistema nervoso central

PCR - Reação em cadeia da polimerase

UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

REDCap - *Research Electronic Data Capture*

LabDIP - Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias

BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool*

DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

TARV - Terapia antirretroviral potente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

- 1.1. O vírus da imunodeficiência humana e a aids
- 1.2. Infecções fúngicas invasivas em pacientes com HIV
 - 1.2.1 Criptococose
 - 1.2.2 Histoplasmore
- 1.3 Epidemiologia Molecular
- 1.4 Epidemiologia Molecular da Criptococose e Histoplasmore

2. JUSTIFICATIVA

3. OBJETIVO

4. MATERIAL E MÉTODOS

- 4.1. Desenho do estudo
 - 4.1.1. Implementação da Micoteca e do Banco de Dados
 - 4.1.2. Validação da Micoteca e do Banco de Dados
- 4.2. Manutenção dos isolados fúngicos
- 4.3. Armazenamento dos isolados fúngicos
- 4.4. Banco de Dados
- 4.5. Extração de DNA genômico dos isolados
- 4.6. Aspectos Éticos
- 4.7. Análises estatísticas

5. RESULTADOS

- 5.1 Criação do banco de dados no REDCap
 - 5.1.1 - Dados Gerais do Isolado
 - 5.1.2 - Análise Fenotípica
 - 5.1.3 - Análise Molecular do DNA
 - 5.1.4 - Teste de Sensibilidade a Antifúngicos
- 5.2 - Plataforma eLabInventory
- 5.3 Caracterização dos pacientes
- 5.4 Amostras biológicas
- 5.5 Identificação fenotípica
- 5.6 Análise molecular do banco de DNA

6. DISCUSSÃO

7. CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. O vírus da imunodeficiência humana e a aids

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi identificado como o causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids na década de 1980 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC), 1981, GALLO, SALAHUDDIN, *et al.*, 1984). Desde então, sua disseminação generalizada tornou-se uma preocupação pandêmica. Atualmente, 39 milhões de pessoas vivem com HIV (PVHIV) e, cerca de 630.000 indivíduos com doenças relacionadas à aids morreram em 2022 (OMS,2023).

Desde sua identificação, o vírus se disseminou rapidamente devido à falta de conhecimento sobre sua transmissão e à inicial falta de comprometimento dos setores de saúde. Isso transformou o HIV em uma doença considerada negligenciada, devido à elevada mortalidade associada à doença, principalmente por afetar populações em vulnerabilidade social (LEMP, PAYNE, *et al.*, 1990, SMITH, XU, *et al.*, 2020).

A mortalidade é explicada de acordo com o ciclo de infecção que o HIV tem nos hospedeiros, onde se inicia intracelularmente, onde o capsídeo do vírus, que contém seu genoma e proteínas, é internalizado na célula hospedeira. Estas células são células cruciais para o funcionamento do sistema imunológico, tais como os linfócitos TCD4⁺, macrófagos e células dendríticas.

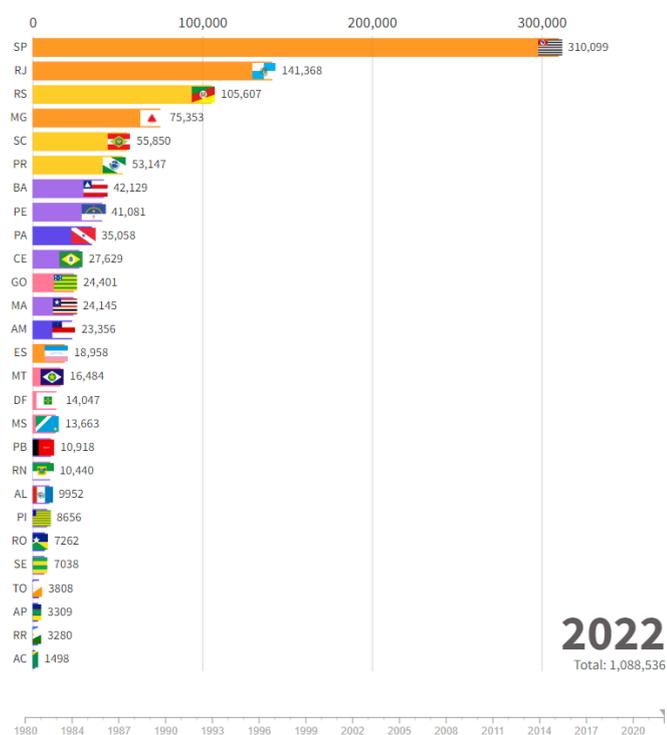
Uma vez dentro da célula, o vírus, por meio da enzima transcriptase reversa, desempenha um papel crucial ao transcrever o RNA viral em DNA (ácido desoxirribonucleico) viral. Este DNA viral é então integrado ao genoma da célula hospedeira e utiliza todo o maquinário intracelular celular para sua replicação. A infecção resulta na produção contínua de novas partículas virais, muitas das quais são liberadas para infectar células adjacentes.

Esse ciclo de replicação constante leva à destruição ou comprometimento funcional das células hospedeiras, especialmente das células TCD4⁺, que são fundamentais para a resposta imune adaptativa. Como resultado direto da perda dessas células essenciais, o sistema imunológico fica comprometido, tornando o organismo incapaz de combater eficazmente infecções oportunistas a patógenos intracelulares obrigatórios como vírus, micobactérias, e fungos com a forma leveduriforme. A progressiva destruição do sistema imunológico é o que contribui para a alta mortalidade associada ao HIV/aids, já que os indivíduos infectados se tornam suscetíveis a uma variedade de infecções e condições que um sistema imunológico saudável normalmente seria capaz de controlar.

De acordo com o TabNet, ferramenta de tabulação online desenvolvida pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), o estado de Mato

Grosso do Sul contou, em 2022, com cerca de 13.663 casos, se colocando então na 17ª posição entre os estados brasileiros como se observa na Figura 1 (Brasil, 2023).

Figura 1: Casos através dos anos nos estados brasileiros



Fonte: Imagem obtida do UNAIDS representando dados das notificações do SINAN

1.2. Infecções fúngicas invasivas em pacientes com HIV

Os fungos constituem uma das categorias preponderantes de organismos vivos amplamente distribuídos em todo o mundo, exibindo uma notável diversidade de espécies. Sua presença é onipresente, abrangendo o próprio organismo humano, como ambientes ricos em nutrientes, como o interior de árvores, e áreas notoriamente pobres em nutrientes (TEDERSON, BAHRAM, *et al.*, 2014). A ciência que se dedica ao estudo da relação dos fungos, especialmente sua interação patogênica com os seres humanos, é conhecida como micologia médica. Dentro dessa esfera, destacam-se as infecções fúngicas invasivas (IFIs) como uma das diversas formas de interação entre fungos e o organismo humano.

As IFIs são caracterizadas pela invasão fúngica do organismo humano através da inalação, representando uma via de entrada singular para o crescimento e disseminação desses fungos no corpo do hospedeiro (CHANG, LEVITZ, 2019, STRICKLAND, SHI, 2021). Esse tipo de infecção fúngica pode resultar em impactos significativos, afetando diversos órgãos vitais, incluindo os pulmões, o sistema nervoso central (SNC), o fígado e outros órgãos internos (STRICKLAND, SHI, 2021). Essas infecções são muitas vezes mais graves do que as micoses superficiais, que afetam a pele, cabelo ou unhas (CRIADO, OLIVEIRA,

et al., 2011). A micologia médica investiga não apenas a biologia e a classificação dos fungos causadores de doenças, mas também os mecanismos de patogenicidade, a resposta imune do hospedeiro, métodos de diagnóstico e estratégias terapêuticas (BONGOMIN, GAGO, *et al.*, 2017).

É crucial ressaltar que, como mencionado anteriormente, os fungos causadores destas infecções estão naturalmente presentes no ambiente ao nosso redor (RICHARDSON, BOWYER, *et al.*, 2019). No entanto, o risco de infecção sistêmica está intrinsecamente ligado à robustez do sistema imunológico do hospedeiro. Indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores de HIV/aids, indivíduos submetidos a transplantes ou aqueles submetidos a tratamentos com medicamentos imunossupressores, enfrentam uma suscetibilidade elevada ao desenvolvimento dessas infecções fúngicas de alcance sistêmico (GIACOMAZZI, BAETHGEN, *et al.*, 2016, LIMPER, ADENIS, *et al.*, 2017).

Apesar dos avanços significativos alcançados com a terapia antirretroviral potente (TARV) nos centros de tratamento para PVHIV, a presença de agentes fúngicos introduz uma complexidade adicional (KAPLAN, HANSON, *et al.*, 2000).

Dentre os fungos com maior predisposição para infectar PVHIV, temos os fungos dos gêneros *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* e *Candida*, que possuem elevada incidência de infecção destes pacientes e assim com uma mortalidade maior (LIMPER, ADENIS, *et al.*, 2017). No presente estudo, iremos focar em fungos de dois gêneros, *Cryptococcus* e *Histoplasma*.

1.2.1 Criptococose

A criptococose é causada por espécies de fungos do gênero *Cryptococcus*, manifestando uma predileção notável pelo SNC. Esta infecção se caracteriza por uma elevada letalidade, especialmente em pacientes com aids, com manifestação clínica de meningite criptocócica, com uma taxa de letalidade de 36,1% (DERBIE, MEKONNEN, *et al.*, 2020). A prevalência da criptococose entre PVHIV varia consideravelmente, situando-se entre 8% e 21%, dependendo da região geográfica (BORGES *et al.*, 2019; JARVIS *et al.*, 2009; MICOL *et al.*, 2007). O diagnóstico laboratorial assume papel crucial, com o exame direto, a cultura do líquido cérebro-espinhal (LCR) e a detecção de antígeno criptocócico em amostras de soro e líquido, desempenhando um papel fundamental no diagnóstico da meningite criptocócica,

No Brasil, a meningoencefalite criptocócica foi identificada como uma das infecções fúngicas mais letais entre as PVHIV, sendo que a espécie mais prevalente é a *Cryptococcus neoformans*. Assim como em outros países, a criptococose é difícil de tratar devido a um

arsenal terapêutico limitado, tóxico e dispendioso (DO CARMO, DE CAMARGO FENLEY, *et al.*, 2022).

1.2.2 Histoplasmose

A histoplasmose, causada por fungos do gênero *Histoplasma*, é reconhecida como uma das principais doenças oportunistas e uma das principais causas de mortalidade em pacientes com aids. Nesses pacientes, a doença se manifesta como uma histoplasmose pulmonar disseminada aguda. Em Mato Grosso do Sul, a taxa de letalidade atinge 56,5%, evidenciando a gravidade dessa infecção. O intervalo médio de seis semanas entre o início dos sintomas e o diagnóstico reflete desafios no diagnóstico precoce, sendo associado a discrasias sanguíneas, atividade inflamatória, além de aumento do comprometimento renal e nutricional (BOIGUES, PANIAGO, *et al.*, 2018).

O diagnóstico micológico da histoplasmose fundamenta-se na visualização do fungo em exames diretos e na cultura de amostras de tecido, sendo este último um procedimento invasivo, e a cultura pode demandar semanas para evidenciar o *H. capsulatum* (ADENIS, AZNAR, *et al.*, 2014). Mais recentemente, a detecção de antígenos na urina por métodos enzimáticos (ELISA) ou imunocromatográfico (teste rápido) tem sido uma importante ferramenta na detecção precoce de doenças. No entanto, apesar dessas vantagens, esses métodos ainda não são amplamente utilizados no Brasil (SAMAYOA, AGUIRRE, *et al.*, 2019).

A falta de disponibilidade comercial de métodos moleculares também representa um grande desafio no diagnóstico da histoplasmose disseminada em pacientes com HIV.

Essa situação destaca a necessidade de estratégias mais acessíveis e eficazes para o diagnóstico precoce e manejo da histoplasmose, especialmente em contextos de alta prevalência como o observado em Mato Grosso do Sul.

1.3 Epidemiologia Molecular

A epidemiologia molecular teve seu início na década de 1970. Trata-se da aplicação de técnicas moleculares, como a análise de ácidos nucleicos e proteínas, para estudar a distribuição e os determinantes de doenças em populações (FOXMAN, RILEY, 2001).

Com o rápido desenvolvimento da tecnologia molecular e da ciência da computação desde a década de 1990, os estudos epidemiológicos moleculares de infecções fúngicas fizeram enormes progressos, representando um campo crucial para a compreensão abrangente de patógenos fúngicos que afetam plantas, animais e humanos (TARASEVICH, SHAGINYAN, *et al.*, 2003). Esses avanços têm contribuído significativamente para expandir

nosso conhecimento sobre surtos de doenças fúngicas, a dinâmica de transmissão, fatores de risco associados, patogênese subjacente, resistência a antifúngicos e os atributos genéticos e genômicos dos fungos patogênicos, especialmente aqueles que emergem como ameaças (CHEN et al., 2022).

1.4 Epidemiologia Molecular da Criptococose e Histoplasmose

Desde os anos 1980, uma variedade de métodos moleculares tem sido empregada para compreender a complexidade destas espécies causadoras de doenças. Inicialmente, esses métodos concentraram-se na análise das variações de DNA entre as diferentes linhagens por meio de técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), microssatélites e identificação de polimorfismos. Além disso, houve esforços para aprofundar o entendimento através do sequenciamento completo do genoma do patógeno (CUOMO, RHODES, et al., 2018).

Os métodos que visam procurar estas espécies de *Cryptococcus* diferente, proporcionando resultados que não são compatíveis. Os complexos de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são geneticamente semelhantes, mas apresentam algumas diferenças importantes em sua distribuição global e nos pacientes que infectam (MEYER; TRILLES, 2010).

Enquanto *C. neoformans* é a causa predominante da criptococose em todo o mundo, mas é mais comumente encontrado em indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos, como pessoas com HIV/aids ou que estão em tratamento de quimioterapia considerado assim então mais oportunístico, e possui quatro linhagens sendo elas da VNI A VNIVN (MUÑOZ; CAMARGO; RAMÍREZ, 2018).

A espécie *C. gattii*, por outro lado, tem uma distribuição global mais restrita, sendo mais comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais (BYRNES et al., 2011). Além disso, é mais comumente relatado em indivíduos sem imunossupressão reconhecida, o que sugere que pode ser um patógeno primário, capaz de infectar indivíduos saudáveis. É conhecido atualmente quatro linhagens que vão desde (VGI a VGIV), sendo a VGIII e VGIV sendo linhagens encontradas nas regiões subtropicais e sendo reconhecidas como causadoras da criptococose entre os PVHIV (BYRNES et al., 2011; HARRIS et al., 2009; LITVINTSEVA et al., 2005; NYAZIKA et al., 2016).

Ao analisar marcadores específicos de DNA e sequências genômicas completas, os pesquisadores podem discernir padrões filogenéticos, revelando as relações evolutivas entre diferentes linhagens e isolados dessas espécies. Isso não apenas ajuda na classificação taxonômica precisa, mas também fornece *insights* sobre a origem, evolução e disseminação desses patógenos fúngicos, especialmente nessa doença que possui características que se diferem de acordo com a espécie.

Os fungos do gênero *Histoplasma* crescem sob a forma micelial ou filamentosa em seu habitat natural (solo), mas passa por uma transição termo dimórfica para leveduras intracelulares durante o parasitismo em mamíferos (EDWARDS, RAPPLEYE, 2011). Até o momento, seis variedades biológicas são consideradas para esse fungo que são observadas possuindo diferenças estruturais, químicas, patogênicas e mais recentemente filogeneticamente entre os isolados de *Histoplasma capsulatum* provenientes de diversas regiões do mundo (TEIXEIRA, PATANÉ, *et al.*, 2016).

As técnicas moleculares têm desempenhado um papel crucial na identificação de diferenças genéticas entre os diversos isolados de *Histoplasma*. Essas variações genéticas identificadas por meio dessas abordagens moleculares têm sido diretamente associadas às disparidades observadas na morbidade e mortalidade associadas a esta micose sistêmica (DAMASCENO, LEITÃO, *et al.*, 2016).

Estudos recentes revelaram a existência de aproximadamente 14 espécies filogenéticas distribuídas em todo o mundo, com alguns genótipos ainda sob avaliação. A distribuição dessas espécies teve início na América do Sul a milhares de anos e se espalhou rapidamente por todos os continentes (TAYLOR *et al.*, 2022). Teixeira *et al.* (2016) relatam que o *Histoplasma capsulatum* é um complexo composto por pelo menos oito clados que estão distribuídos geograficamente em diferentes regiões. Essas regiões incluem países da Austrália, países do Sudeste Asiático, Europa e Ásia, América do Norte com algumas classes distintas, América Latina com outras classes específicas, e ainda na África. Essa diversidade genética e geográfica destaca a complexidade da distribuição do *Histoplasma capsulatum* ao redor do mundo (TEIXEIRA *et al.*, 2016).

Essa compreensão aprimorada das características genéticas dos isolados de *Histoplasma* contribui não apenas para a classificação mais refinada desses patógenos, mas também tem implicações significativas na compreensão dos diferentes padrões de virulência e resposta do hospedeiro. Essa informação molecular é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico mais precisas, terapias direcionadas e medidas preventivas eficazes contra a histoplasbose.

2. JUSTIFICATIVA

Em Mato Grosso do Sul, poucos estudos foram realizados para determinar aspectos da epidemiologia molecular em fungos patogênicos humanos. Recentemente, o grupo de pesquisadores do Grupo de Micoses da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) avaliou, por meio de técnicas de epidemiologia molecular, a distribuição de espécies de *Paracoccidioides spp.* Observou-se maior prevalência da espécie *P. brasiliensis* e, seguido da espécie *P. lutzii*, e um isolado de *P. restripiensis*, descrito anteriormente apenas na Colômbia (MATTOS et al., 2021). De acordo com dados da literatura, era de se esperar que a espécie *P. lutzii* fosse mais prevalente na região Centro-Oeste do Brasil, a partir dos isolados de Mato Grosso e Goiás (MENDES et al., 2017). Cabe considerar que a distribuição das diferentes espécies de *Paracoccidioides* interfere diretamente no diagnóstico sorológico (GEGEMBAUER, ARAUJO, et al., 2014) e no acompanhamento terapêutico dos pacientes com paracoccidioidomicose (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Com isso, evidencia-se a necessidade de mais estudos de epidemiologia molecular de outros fungos patogênicos em Mato Grosso do Sul.

De fato, a principal limitação das identificações de laboratório de rotina é a determinação do gênero. É necessária a realização de sequenciamentos para determinação das espécies e variedades. Para tanto, é crítico que uma micoteca de fungos patogênicos associadas a dados clínicos seja implementada, bem como a criação de um banco de DNA para caracterização genômica desses isolados de modo a contribuir com a epidemiologia molecular dessas doenças.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo implementar uma micoteca e um banco de DNA de isolados fúngicos de pacientes com HIV/aids de Mato Grosso do Sul.

Objetivos Específicos

- Preparar protocolos de isolamento e armazenamento de fungos patógenos humanos;
- Preparar e validar protocolos de isolamento de DNA fúngico;
- Elaborar um banco de dados intuitivo e seguro para as informações clínicas dos pacientes e para os dados micológicos dos isolados;
- Validar a micoteca e o banco de DNA a partir de uma coleção de isolados das espécies de *Cryptococcus* e *Histoplasma*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo

4.1.1. Implementação da Micoteca e do Banco de Dados

Para essa etapa do estudo, foram selecionados protocolos de manutenção e armazenamento de fungos patogênicos humanos. Além disso, foi estabelecido um protocolo de gerenciamento de amostras e a elaboração de um banco de dados online.

4.1.2. Validação da Micoteca e do Banco de Dados

Para essa etapa do estudo, realizou-se um estudo observacional, analítico, com coleta de dados prospectivos primários, em pacientes com aids e imunossupressão grave que foram investigados para detecção de criptococose e histoplasrose. O estudo foi realizado no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), sediado na UFMS. Todos os pacientes com critérios de elegibilidade atendidos nos locais e período de alocação foram convidados a participar do estudo. Foram incluídos no estudo, pacientes com idade superior a 18 anos, com infecção confirmada pelo HIV e contagem de linfócitos TCD4⁺ igual ou menor que 200 células/mm³ e que possuíam fungo isolado em cultura para as espécies de *Cryptococcus* e *Histoplasma*. Foram excluídos do estudo, as gestantes, devido ao risco inerente à realização de tomografia computadorizada.

4.2. Manutenção dos isolados fúngicos

Os meios de cultura utilizados para o isolamento fúngico foram o Ágar Sabouraud Dextrose e o Ágar Batata Dextrose. Todos os materiais utilizados, como placas, alças e vidrarias estavam estéreis. As placas foram mantidas em estufas de 25-37°C, onde as colônias de *Cryptococcus spp.* podem ser vistas após 24 horas, as de *Histoplasma spp.* a partir de 15 dias.

4.3. Armazenamento dos isolados fúngicos

Os fungos do gênero *Cryptococcus* foram armazenados em freezer -80°C, os demais do gênero *Histoplasma*, por ser um fungo dimórfico, ficam em manutenção na estufa a 25°C.

4.4. Banco de Dados

O armazenamento das informações clínicas e micológicas dos isolados foi elaborado na Plataforma REDCap® (*Research Electronic Data Capture*) (HARRIS et al., 2009, 2019). O controle do armazenamento das amostras foi implementado utilizando a plataforma eLabInventory (Eppendorf INC).

4.5. Extração de DNA genômico dos isolados

Os DNAs genômicos isolados do fungo (cepas de referência e clínicas) foram obtidos com o kit de extração de fungos/bactérias ZR (Zymo Research, Irvine, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fabricante, e quantificados com o NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc®, Massachusetts, Estados Unidos). As amostras obtidas foram armazenadas a -20°C e cadastradas no banco de amostras eLabInventory.

4.6. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas vigentes e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (CAEE 07625018.4.0000.0021).

4.7. Análises estatísticas

Todas as análises foram conduzidas utilizando o software Jamovi (versão 1.6) para Windows, abrangendo medidas como proporções das amostras e porcentagens.

5. RESULTADOS

5.1 Criação do banco de dados na plataforma REDCap

A elaboração do banco de dados envolveu as seguintes informações: dados gerais da amostra, análise fenotípica, análise molecular do DNA, teste de sensibilidade antifúngica. O banco visa a incorporação de diversos projetos de pesquisas e de diferentes origens de amostras (clínicas, ambientais e de isolados de referência oriundo de coleção de cultura).

5.1.1 Dados Gerais do Isolado

Na seção de "Dados Gerais do Isolado", são consolidadas informações essenciais sobre a amostra fúngica, proporcionando uma compreensão abrangente do isolado em análise. Esses dados incluem a distinção fundamental entre isolados de origem humana ou ambiental, delineando as diferentes fontes e contextos associados.

Detalhes sobre a proveniência da amostra são registrados, indicando se ela se originou do ambiente natural, de pacientes humanos ou animais. Adicionalmente, informações sobre o percurso da amostra até o laboratório são meticulosamente registradas, incluindo os métodos de coleta (Figura 2).

Figura 2: Sessão dados gerais do isolado

Data do cadastro na micoteca LabDIP <small>* must provide value</small>	<input type="text" value="25-01-2023"/> <input type="button" value="Today"/> D-M-Y
Responsável pelo cadastro <small>* must provide value</small>	<input type="text" value="Hafsa Gharyb"/>
Tipo de isolado <small>* must provide value</small>	<input type="radio"/> Ambiental <input checked="" type="radio"/> Clínica Humana <input type="radio"/> Clínica Veterinária reset
Isolado proveniente de coleção biológica? <small>* must provide value</small>	<input type="radio"/> Sim <input checked="" type="radio"/> Não reset
Faz parte de algum projeto de pesquisa? <small>* must provide value</small>	<input type="text" value="Sim"/>
Indicar o projeto de pesquisa	<input type="text" value="Aspergillus em cepas clínicas e ambientais dc"/>

Fonte: Micoteca do Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LabDIP)

5.1.2 Análise Fenotípica

Na seção de "Análise Fenotípica", são apresentadas informações cruciais sobre o isolado fúngico, enfocando sua morfologia distintiva. Os isolados são categorizados com base em sua morfologia, sendo classificados como leveduras, filamentosos ou dimórficos, permitindo uma caracterização precisa dessas formas. Os resultados obtidos a partir do método de crescimento em colônia gigante são detalhadamente registrados. Para complementar essas informações, a seção inclui imagens representativas das colônias, proporcionando uma visualização concreta das características observadas (Figura 3).

Figura 3: Sessão de análise fenotípica

Fonte: Micoteca LabDIP

5.1.3 Análise Molecular do DNA

Na seção de "Análise Molecular do DNA", são apresentadas informações detalhadas sobre o processo de análise genética do isolado fúngico. O kit de extração utilizado para a obtenção do DNA é minuciosamente registrado, assim como o método de armazenamento da amostra extraída, fornecendo uma base sólida para a replicabilidade do estudo.

A quantificação do DNA é expressa em unidades de concentração (ng/μl), evidenciando a qualidade e quantidade do material genético disponível para análise. Os alvos específicos do estudo, juntamente com os *primers* empregados, são detalhadamente descritos, destacando as regiões genômicas de interesse (Figura 4).

O método de sequenciamento adotado é documentado, incluindo os parâmetros utilizados na geração de dados genômicos.

Figura 4: Sessão de biologia molecular

Kit de extração de DNA	<input type="checkbox"/> Método in house (fenol-clorofórmio) <input type="checkbox"/> QIAmp DNA Mini Kit (Marca: Qiagen, código 51306) <input type="checkbox"/> Wizard SV Genomic DNA Purification System (Marca: Promega, código A2361) <input type="checkbox"/> Bioclin-Quibasa (Marca: Bio Gene, código K204)
Armazenamento da amostra extraída [freezer / prateleira / caixa / posição]	<input type="text" value="UNICAMP"/> <small>Exemplo: U-02 / P2 / Cx 04 / A5</small>
DNA - quantificação (ng/uL)	<input type="text"/>
DNA - relação A260/A280	<input type="text"/>
Alvo	
Região alvo	<input type="radio"/> ITS1 - 5.8 - ITS2 <input type="radio"/> Região D1-D2 <input type="radio"/> Fator de alongamento (TEF) <input type="radio"/> Calmodulina <input checked="" type="radio"/> Beta-tubulina <input type="radio"/> Região MCM7 <input type="radio"/> Região RPB1 <input type="radio"/> Cyp51-A
Primers - Beta-Tubulina (5' - 3')	<input checked="" type="checkbox"/> Bt2A (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) <input checked="" type="checkbox"/> Bt2B (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC)
Método do sequenciamento	<input checked="" type="radio"/> Método de Sanger - 1ª geração <input type="radio"/> Sequenciamento de nanoporos (MinION) - 3ª geração

Fonte: Micoteca LabDIP

Os resultados são identificados como a sequência de DNA obtida, os resultados do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) utilizado para comparação com bancos de dados, e a identificação da espécie encontrada. A cobertura percentual de identidade em relação às sequências disponíveis nos bancos de dados é especificada, proporcionando uma medida quantitativa da similaridade genética.

Para fins de rastreabilidade e referência, a identidade taxonômica do isolado é conclusivamente estabelecida, indicando a espécie específica. Além disso, é fornecido o número de acesso no GenBank, permitindo o acesso direto às informações genômicas detalhadas associadas ao isolado (Figura 5).

Figura 5: Sessão de sequenciamento molecular

Resultados	
Sequencia obtida (5' - 3')	>40 AACCAAATCGGTGCTGCTTCTGGTATGTCTTGACC TCAAAGCTTGGAT GACGGGTGATTGGGATCTCTCATCTTAGCAGGCTAC CTCCATGGGTTTCAG
BLAST	<input checked="" type="checkbox"/> Standard databases (nucleotide collection) <input type="checkbox"/> rRNA/ITS databases <input type="checkbox"/> Genomic + transcript databases
Espécie	Aspergillus fumigatus
Query Cover (cobertura)	
Percent Identity	100
Accession	
Conclusão	
Identidade do isolado	Aspergillus fumigatus
Número de acesso no GenBank	
Data	20-07-2021 Today D-M-Y
Executor	Francine Dorneles
Form Status	
Complete?	Complete

Fonte: Micoteca LabDIP

5.1.4 - Teste de Sensibilidade a Antifúngicos

Na seção de "Teste de Sensibilidade a Antifúngicos", são apresentadas informações cruciais sobre a resposta do isolado fúngico a diferentes agentes antifúngicos. Cada antifúngico, incluindo Micafungina, Caspofungina, Anfotericina B, 5 Fluorocitosina, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Miconazol, Posaconazol, Isavuconazole, Difeconazol e Tebuconazol, é avaliado individualmente para determinar a sensibilidade do isolado.

Os resultados indicam a resposta do fungo à presença de cada antifúngico, sendo registrados como "sensível", "intermediário" ou "resistente". Essa análise é essencial para direcionar estratégias terapêuticas, fornecendo *insights* valiosos sobre a eficácia potencial de diferentes tratamentos antifúngicos contra o isolado em questão.

5.2 - Plataforma eLabInventory

A plataforma eLabInventory desempenhou um papel fundamental na otimização da organização das amostras, proporcionando facilidade de acesso e oferecendo recursos

essenciais para a catalogação eficiente. A utilização desta plataforma permitiu a criação de caixas virtuais, oferecendo uma abordagem sistemática e intuitiva para a identificação e rastreamento das amostras fúngicas (Figura 6).

Figura 6: eLabInventory da micoteca do LabDIP

The screenshot displays the eLabInventory interface for a fungal culture collection. On the left, a sidebar lists storage units including incubators (Estufa E1, E2) and freezers (Freezer -20° F-01 to F-03, Ultra-freezer -70° U-02, Ultra-freezer -80° U-01). The main area shows a grid for 'MICOTECA CX 02' with columns 1-10 and rows A-J. A table below the grid lists 20 samples, each with a checkbox, name, owner, type, position, and creation date.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		Name	Owner	Type	Pos...	Created
											<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	10.J	02-06-2023
											<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	9.J	02-06-2023
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	8.J	02-06-2023
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	7.J	02-06-2023
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	6.J	02-06-2023
D	1.D	2.D	3.D	4.D	5.D	6.D	7.D	8.D	●	●	<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	5.J	02-06-2023
E	1.E	2.E	3.E	4.E	5.E	6.E	7.E	8.E	●	●	<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	4.J	02-06-2023
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	VG I	James Vent...	Isolado fúngico	3.J	02-06-2023
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	C. gattii (VG-I)	James Vent...	Isolado fúngico	2.J	02-06-2023
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	10.I	02-06-2023
I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	9.I	02-06-2023
J	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	8.I	02-06-2023
											<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	7.I	02-06-2023
											<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	6.I	02-06-2023
											<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	5.I	02-06-2023
											<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	4.I	02-06-2023
											<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	3.I	02-06-2023
											<input type="checkbox"/>	ATCC 24433	James Vent...	Isolado fúngico	2.I	02-06-2023

Fonte: eLabInventory

A capacidade de categorizar as amostras em caixas específicas proporcionou uma organização precisa, facilitando a localização e recuperação rápida quando necessário. Além disso, a flexibilidade oferecida pela plataforma permitiu a personalização de campos e informações associadas a cada amostra, atendendo às necessidades específicas do laboratório. Essa abordagem inovadora contribuiu significativamente para a excelência na pesquisa, proporcionando uma base sólida para a condução de estudos mais precisos e integrados.

5.3 Caracterização dos pacientes

A validação da micoteca envolveu a inclusão de 10 pacientes, cujas idades variaram entre 28 e 64 anos, com uma média de idade de 48,7 anos com pessoas do sexo masculino representando 80% e do feminino 20%. Todos os participantes possuíam diagnóstico prévio confirmado de infecção pelo HIV, nenhum paciente apresentou comorbidades.

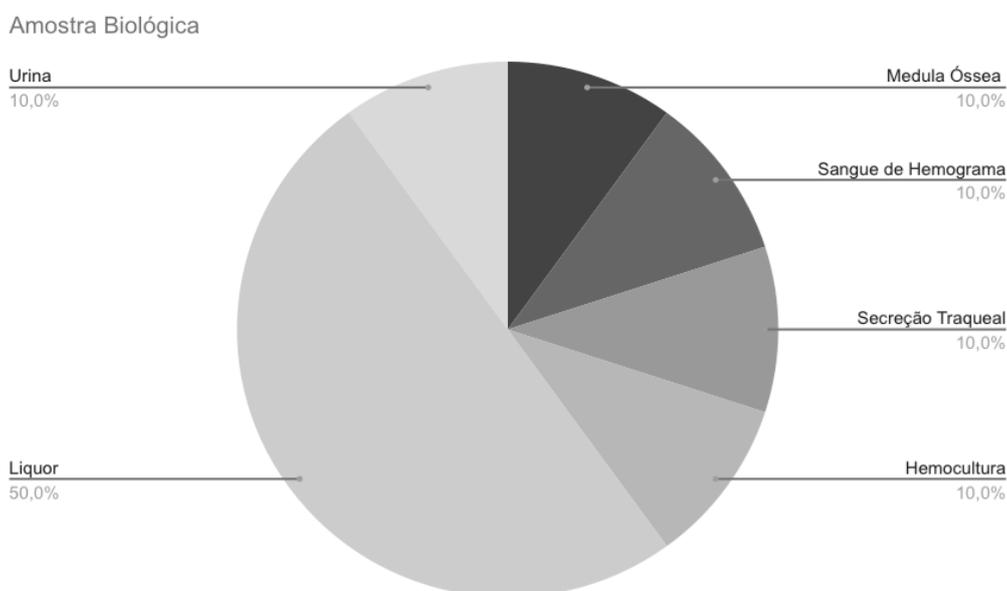
Em relação aos níveis de contagem de linfócitos TCD4⁺ na entrada do paciente no centro hospitalar, observou-se uma média de 173. Em paralelo, a carga viral apresentou uma média de 17,9. Na saída subsequentemente, após o período de intervenção ou

tratamento, a média dos níveis de linfócitos TCD4⁺ diminuiu para 121,2, enquanto a carga viral ainda está em processo de ser fornecida.

5.4 Amostras biológicas

Na pesquisa e prática clínica, a coleta de diversas amostras biológicas desempenha um papel fundamental na investigação e diagnóstico de uma ampla gama de condições de saúde. No contexto deste estudo, uma variedade de amostras foi meticulosamente coletada, abrangendo desde secreção traqueal até fluidos biológicos como sangue, urina, e líquido (Figura 7).

Figura 7: Amostra biológica

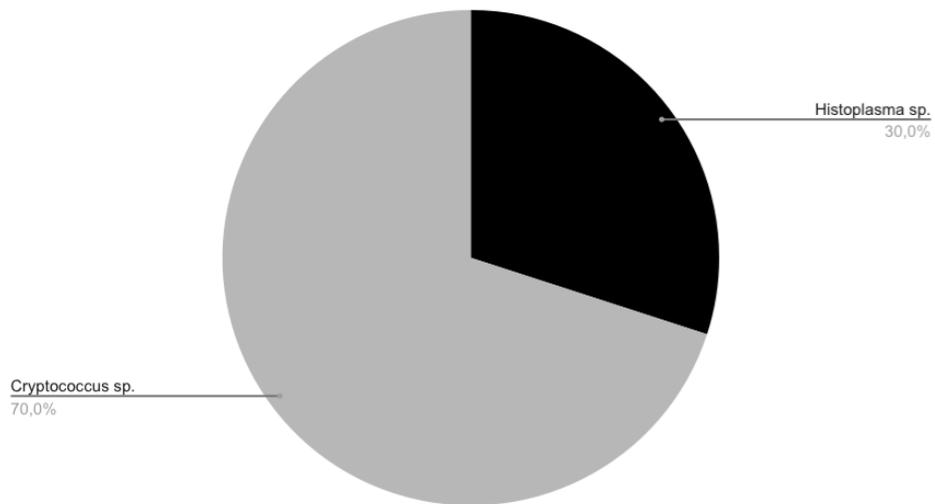


5.5 Identificação fenotípica

Pela análise fenotípica podemos observar uma maior ocorrência de *Cryptococcus* spp. (70%), seguido de *Histoplasma* spp. (30%) (Figura 8).

Figura 8: Identificação fenotípica

Identificação Fenotípica



5.6 Análise molecular do banco de DNA

Foi realizada a extração dos DNAs genômicos de todos os isolados fúngicos, para futuro sequenciamento genético. Foram também quantificados com o NanoDrop 2000, com uma média de 18,925 (ng/uL). As amostras obtidas foram armazenadas a -20 °C e cadastradas no banco de amostras eLabInventory.

6. DISCUSSÃO

A construção sistema de banco de dados REDCap foi meticulosamente projetado para atender às demandas específicas relacionadas à criação de um repositório abrangente de isolados fúngicos, provenientes tanto de amostras ambientais quanto clínicas, abrangendo contextos humanos e animais, já que esta mesma base é utilizada em pesquisas como análise de cobertura de vacinas, pesquisas de saúde mental provando ter uma gama de possibilidades (GADSDEN, BATEMAN-STEEL, *et al.*, 2021, MARROQUIN RIVERA, ROSAS-ROMERO, *et al.*, 2021).

Desenvolvido com a visão de fornecer uma estrutura adaptada às peculiaridades dessas amostras, nosso sistema oferece uma plataforma eficiente para a coleta, armazenamento e análise de dados relacionados a fungos isolados. Criado com a segurança dos dados em mente, o REDCap proporciona uma experiência tátil e intuitiva, garantindo fácil acesso aos resultados para análises futuras (HARRIS, TAYLOR, *et al.*, 2009, 2019).

A integração entre plataformas como o eLabInventory e o REDCap representa um avanço significativo na organização de amostras biológicas, otimizando substancialmente a gestão desses recursos essenciais para pesquisas científicas. Ao utilizar essas ferramentas de forma conjunta, é possível implementar uma sistemática eficiente de categorização, armazenamento e localização das amostras, proporcionando uma base sólida para análises posteriores.

Além disso, oferece uma visão abrangente do histórico e do status de cada amostra. Isso não apenas facilita a monitorização do ciclo de vida das amostras, mas também simplifica a rastreabilidade e a documentação, aspectos cruciais para a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos nas análises.

Esta base de dados conecta grupos parceiros no laboratório de doenças infecciosas e parasitárias, promovendo um nível superior de organização. Além disso, serve como uma sólida fundação para futuros projetos, proporcionando um repositório valioso de dados sobre fungos encontrados em amostras ambientais e clínicas.

A preocupação com as seções de Análise Fenotípica desempenha um papel vital no fornecimento de informações detalhadas sobre a morfologia dos isolados fúngicos, contribuindo para uma compreensão abrangente da diversidade dos fungos encontrados e suas características distintivas. As categorias, registros detalhados e imagens fornecem uma base sólida para futuras análises e interpretações, além de que podem servir para um treinamento mais efetivo futuramente (BOUNDY-MILLS, GLANTSCHNIG, *et al.*, 2016).

A sessão de suscetibilidade a antifúngicos, nos ajuda a observar e compilar um conjunto de dados sobre a sensibilidade dos fungos, especialmente aqueles presentes em ambientes hospitalares, é de extrema importância. Essa abordagem é crucial para conduzir uma vigilância epidemiológica eficaz da resistência das cepas, proporcionando *insights* ao longo do tempo sobre a evolução dessa resistência (SANGUINETTI, POSTERARO, 2017).

A coleta e análise de dados sobre a sensibilidade dos fungos em ambientes hospitalares representam uma ferramenta poderosa para a vigilância epidemiológica, aprimorando a resposta a infecções fúngicas e fornecendo informações cruciais para a adaptação contínua das estratégias terapêuticas, facilitando a seleção de tratamentos mais eficazes. Uma compreensão aprofundada das sensibilidades dos fungos em ambientes hospitalares é fundamental para orientar e aprimorando a gestão de infecções fúngicas. Essa abordagem proativa é fundamental para enfrentar desafios em constante evolução na área da resistência antimicrobiana (TSAY, KALLEN, *et al.*, 2018, YEE, SIMNER, 2022).

A incorporação da análise molecular em conjunto com a análise morfológica representa um avanço substancial na identificação precisa de isolados fúngicos em pacientes. A combinação dessas abordagens oferece uma visão mais abrangente e confiável, proporcionando uma compreensão mais profunda da diversidade genética e fenotípica dos fungos em questão.

A análise molecular, utilizando técnicas como a PCR e sequenciamento de DNA, permite uma avaliação direta do material genético dos fungos. Essa informação molecular é altamente valiosa para a análise filogenética, fornecendo *insights* sobre as relações evolutivas entre diferentes isolados fúngicos. Isso é particularmente útil na identificação de cepas específicas e na compreensão da variabilidade genética dentro de uma população de fungos (TOLEDO, SIMURRO, *et al.*, 2013).

No decorrer deste estudo, foram analisadas amostras de ácidos nucleicos de 14 pacientes por meio da quantificação realizada com o Nanodrop. A interpretação dos dados de sequenciamento foi realizada por meio da ferramenta BLAST, uma ferramenta de bioinformática especializada em comparar sequências biológicas, como as dos DNAs fúngicos (SAMAL, SAHOO, *et al.*, 2021).

A análise com o BLAST permitiu a comparação das sequências obtidas com bancos de dados conhecidos, identificando regiões de similaridade que são indicativas da natureza específica dos isolados a nível de espécie. A abordagem integrada dessas técnicas, combinando quantificação precisa, sequenciamento de ácidos nucleicos e análise bioinformática com o BLAST, é fundamental para obter uma compreensão abrangente da diversidade genética dos isolados fúngicos presentes nas amostras enriquecendo então a implementação da micoteca e seu respectivo banco de dados.

Embora o sequenciamento de amostras seja altamente valioso na construção de um banco de dados abrangente, reconhece-se que esta abordagem demanda recursos econômicos substanciais. Apesar de representar um ideal para a pesquisa, é importante destacar a complexidade financeira associada a esse processo.

7. CONCLUSÃO

- Foi desenvolvido protocolos eficientes para o isolamento e armazenamento desses fungos, garantindo a preservação da viabilidade e integridade desses agentes infecciosos.
- A implementação da micoteca e de um banco de DNA da Faculdade de Medicina representa uma iniciativa estratégica e abrangente para o entendimento e a gestão eficiente dos isolados fúngicos.
- O banco de dados elaborado não apenas centraliza informações críticas sobre dados clínicos e a incidência de fungos, de forma segura e intuitiva, mas também proporciona uma base robusta para análises futuras e pesquisas mais aprofundadas.
- A coleção de isolados dessas espécies se torna uma ferramenta valiosa para a vigilância epidemiológica, que permite uma resposta mais ágil a surtos potenciais e contribui para estratégias de controle de infecções mais eficazes.
- A validação da micoteca e do bando de DNA não apenas beneficia a comunidade científica e clínica local, mas também contribui para a compreensão global das dinâmicas desses fungos patogênicos.

REFERÊNCIAS

- ADENIS, A. A., AZNAR, C., COUPPIÉ, P. "Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps", **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 2, p. 119–128, 2014. DOI: 10.1007/s40475-014-0017-8.
- BYRNES, E. J. et al. Cryptococcus gattii: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 11, p. 895–907, out. 2011.
- BOIGUES, B. C. S., PANIAGO, A. M. M., LIMA, G. M. E., et al. "Clinical outcomes and risk factors for death from disseminated histoplasmosis in patients with AIDS who visited a high-complexity hospital in Campo Grande, MS, Brazil", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 155–161, abr. 2018. DOI: 10.1590/0037-8682-0369-2017. .
- BONGOMIN, F., GAGO, S., OLADELE, R. O., et al. "Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision", **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017. DOI: 10.3390/jof3040057. .
- BOUNDY-MILLS, K. L., GLANTSCHNIG, E., ROBERTS, I. N., et al. "Yeast culture collections in the twenty-first century: new opportunities and challenges", **Yeast**, v. 33, n. 7, p. 243–260, 2016. DOI: 10.1002/yea.3171. .
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). "Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California", **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 30, n. 25, p. 305–308, 3 jul. 1981. .
- CHANG, C. C., LEVITZ, S. M. "Fungal immunology in clinical practice: Magical realism or practical reality?", **Medical Mycology**, v. 57, n. Supplement_3, p. S294–S306, 1 jun. 2019. DOI: 10.1093/mmy/myy165. .
- CRIADO, P. R., OLIVEIRA, C. B. de, DANTAS, K. C., et al. "Micoses superficiais e os elementos da resposta imune", **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 726–731, ago. 2011. DOI: 10.1590/S0365-05962011000400015. .
- CUOMO, C. A., RHODES, J., DESJARDINS, C. A. "Advances in Cryptococcus genomics: insights into the evolution of pathogenesis", **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e170473, 2018. DOI: 10.1590/0074-02760170473. .
- DAMASCENO, L. S., LEITÃO, T. M. J. S., TAYLOR, M. L., et al. "The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review", **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 19–27, jan. 2016. DOI: 10.1007/s10096-015-2508-5. .
- DERBIE, A., MEKONNEN, D., WOLDEAMANUEL, Y., et al. "Cryptococcal antigenemia and its predictors among HIV infected patients in resource limited settings: a systematic review", **BMC**

Infectious Diseases, v. 20, n. 1, p. 407, 11 jun. 2020. DOI: 10.1186/s12879-020-05129-w. .

DO CARMO, F. N., DE CAMARGO FENLEY, J., GARCIA, M. T., *et al.* "Cryptococcus spp. and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil", **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 53, n. 3, p. 1321–1337, set. 2022. DOI: 10.1007/s42770-022-00744-y. .

EDWARDS, J. A., RAPPLEYE, C. A. "Histoplasma mechanisms of pathogenesis – one portfolio doesn't fit all", **FEMS microbiology letters**, v. 324, n. 1, p. 1, nov. 2011. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02363.x. .

FOXMAN, B., RILEY, L. "Molecular epidemiology: focus on infection", **American Journal of Epidemiology**, v. 153, n. 12, p. 1135–1141, 15 jun. 2001. DOI: 10.1093/aje/153.12.1135. .

GADSDEN, T., BATEMAN-STEEL, C. R., CHAVEROT, S., *et al.* "Using a computerised database (REDCap) to monitor influenza vaccination coverage of healthcare workers and staff in South Eastern Sydney Local Health District", **Australian Health Review: A Publication of the Australian Hospital Association**, v. 45, n. 1, p. 97–103, fev. 2021. DOI: 10.1071/AH20006. .

GALLO, R. C., SALAHUDDIN, S. Z., POPOVIC, M., *et al.* "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS", **Science (New York, N.Y.)**, v. 224, n. 4648, p. 500–503, 4 maio 1984. DOI: 10.1126/science.6200936. .

GIACOMAZZI, J., BAETHGEN, L., CARNEIRO, L. C., *et al.* "The burden of serious human fungal infections in Brazil", **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, mar. 2016. DOI: 10.1111/myc.12427. .

GEGEMBAUER, G. *et al.* Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2986, jul. 2014.

HARRIS, P. A. *et al.* Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 42, n. 2, p. 377–381, abr. 2009.

HARRIS, P. A., TAYLOR, R., MINOR, B. L., *et al.* "The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners", **Journal of Biomedical Informatics**, v. 95, p. 103208, jul. 2019. DOI: 10.1016/j.jbi.2019.103208. .

KAPLAN, J. E., HANSON, D., DWORKIN, M. S., *et al.* "Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy", **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 30 Suppl 1, p. S5-14, abr. 2000. DOI: 10.1086/313843. .

LEMP, G. F., PAYNE, S. F., NEAL, D., *et al.* "Survival trends for patients with AIDS", **JAMA**, v. 263, n. 3, p. 402–406, 19 jan. 1990. .

LIMPER, A. H., ADENIS, A., LE, T., *et al.* "Fungal infections in HIV/AIDS", **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e334–e343, 1 nov. 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30303-1. .

LITVINTSEVA, A. P. *et al.* Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 5, p. 888–892, 1 set. 2005.

MARROQUIN RIVERA, A., ROSAS-ROMERO, J. C., CASTRO, S. M., *et al.* "Implementing a Redcap-based research data collection system for mental health", **Revista Colombiana De Psiquiatria (English Ed.)**, v. 50 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 110–115, jul. 2021. DOI: 10.1016/j.rcpeng.2021.06.004. .

MENDES, R. P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224–282, 31 out. 2017.

MUÑOZ, M.; CAMARGO, M.; RAMÍREZ, J. D. Estimating the Intra-taxa Diversity, Population Genetic Structure, and Evolutionary Pathways of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Genetics**, v. 9, 2018.

MEYER, W.; TRILLES, W. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans/C. Gattii* species complex. 2010.

NYAZIKA, T. K. *et al.* *Cryptococcus tetragattii* as a major cause of cryptococcal meningitis among HIV-infected individuals in Harare, Zimbabwe. **The Journal of Infection**, v. 72, n. 6, p. 745–752, jun. 2016.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 27, 2018.

RICHARDSON, M., BOWYER, P., SABINO, R. "The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in?", **Medical Mycology**, v. 57, n. Suppl 2, p. S145–S154, abr. 2019. DOI: 10.1093/mmy/myy149. .

SAMAL, K., SAHOO, J., BEHERA, L., *et al.* "Understanding the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Program and a Step-by-step Guide for its use in Life Science Research", **Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika**, v. 36, p. 55–61, 26 jun. 2021. DOI: 10.18805/BKAP283. .

SAMAYOA, B., AGUIRRE, L., BONILLA, O., *et al.* "The Diagnostic Laboratory Hub: A New Health Care System Reveals the Incidence and Mortality of Tuberculosis, Histoplasmosis, and Cryptococcosis of PWH in Guatemala", **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. ofz534, 15 dez. 2019. DOI: 10.1093/ofid/ofz534. .

SANGUINETTI, M., POSTERARO, B. "New approaches for antifungal susceptibility testing", **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 12, p. 931–934, dez. 2017. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.03.025. .

SMITH, M. K., XU, R. H., HUNT, S. L., *et al.* "Combating HIV stigma in low- and middle-income healthcare settings: a scoping review", **Journal of the International AIDS Society**, v. 23, n. 8, p. e25553, ago. 2020. DOI: 10.1002/jia2.25553. .

STRICKLAND, A. B., SHI, M. "Mechanisms of fungal dissemination", **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 7, p. 3219–3238, 1 abr. 2021. DOI: 10.1007/s00018-020-03736-z. .

TARASEVICH, I. V., SHAGINYAN, I. A., MEDIANNIKOV, O. Y. "Problems and perspectives of molecular epidemiology of infectious diseases", **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 751–756, jun. 2003. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07455.x. .

TAYLOR, M. L. et al. Considerations about the Geographic Distribution of Histoplasma Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 7, p. e02010-21, 9 mar. 2022.

TEDERSOO, L., BAHRAM, M., PÖLME, S., et al. "Global diversity and geography of soil fungi", **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1256688, 28 nov. 2014. DOI: 10.1126/science.1256688. .

TEIXEIRA, M. de M., PATANÉ, J. S. L., TAYLOR, M. L., et al. "Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus Histoplasma", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004732, jun. 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004732. .

TOLEDO, A. V., SIMURRO, M. E., BALATTI, P. A. "Morphological and Molecular Characterization of a Fungus, *Hirsutella* sp., Isolated from Planthoppers and Psocids in Argentina", **Journal of Insect Science**, v. 13, p. 18, 15 mar. 2013. DOI: 10.1673/031.013.1801. .

TSAY, S., KALLEN, A., JACKSON, B. R., et al. "Approach to the Investigation and Management of Patients With *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast", **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 66, n. 2, p. 306–311, 6 jan. 2018. DOI: 10.1093/cid/cix744. .

YEE, R., SIMNER, P. J. "Next-Generation Sequencing Approaches to Predicting Antimicrobial Susceptibility Testing Results", **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 42, n. 4, p. 557–572, dez. 2022. DOI: 10.1016/j.cll.2022.09.011. .