

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

SUELLEN RAQUEL DA SILVA FERREIRA

INVESTIGAÇÃO AMBIENTAL DE *ASPERGILLUS* SPP. EM ENFERMARIA DE
ONCO-HEMATOLOGIA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO MATO GROSSO
DO SUL

CAMPO GRANDE

2022

SUELLEN RAQUEL DA SILVA FERREIRA

INVESTIGAÇÃO AMBIENTAL DE *ASPERGILLUS* SPP. EM ENFERMARIA DE ONCO-HEMATOLOGIA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO MATO GROSSO DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Saúde e Sociedade.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilene Rodrigues Chang

CAMPO GRANDE

2022

SUELLEN RAQUEL DA SILVA FERREIRA

INVESTIGAÇÃO AMBIENTAL DE *ASPERGILLUS* SPP. EM ENFERMARIA DE ONCO-HEMATOLOGIA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO MATO GROSSO DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Saúde e Sociedade.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilene Rodrigues Chang

Banca examinadora:

Nota/Conceito

Marilene Rodrigues Chang – FACFAN – UFMS

Angelica Zaninelli Schreiber – FCM – UNICAMP

Marcia de Souza Carvalho Melhem – FAMED – UFMS

Adriano Menis Ferreira – CPTL – UFMS

James Venturini – FAMED – UFMS

AValiação FINAL: () Aprovada

() Reprovada

A Deus.

A minha família por tanto apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado em todas as fases que passei até aqui.

A Prof^a Dr^a Marilene Rodrigues Chang, por tanto esforço e dedicação para a realização deste projeto e pela oportunidade de participar de algo grandioso que é fazer uma pós-graduação e contribuir para a ciência.

Ao meu pai Rafael (*in memoriam*), minha mãe Denira, meu avô Damião, minha avó Valdice, minha irmã Anna, minha sobrinha Fabiana, meu sogro Carlos e vó Raquel por tanto carinho e por acreditarem em mim.

Ao meu esposo Roberto Paulo, que sempre esteve me acompanhando e incentivando em todas as etapas.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas, Nayara Moreno, Cláudia Liz, Daniele Venancio, Camila Espínola e Michele Scardine, pelo apoio no laboratório, convivência e aprendizado.

Aos amigos que estiveram ao meu lado e aos muitos momentos de alegria que passamos juntos.

A Prof^a Dr^a Maria Luiza Moretti por ter cedido espaço e recursos de seu laboratório para realização desta pesquisa.

A Prof^a Dr^o Marcia de Souza Carvalho Melhem pelo apoio e colaboração nesta pesquisa.

Aos colaboradores do LEMDI/UNICAMP Cibele Tararam, Letícia Levy, Vanessa Manfredini e Sarah Martins que me ensinaram tanto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), a Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA) e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Espécies de *Aspergillus* são patógenos oportunistas ubíquos, responsáveis por causar sérias doenças. *A. fumigatus* é o agente mais implicado em casos de aspergilose pulmonar invasiva (AI) e crônica. A inalação de esporos é a principal via de transmissão de AI em pacientes imunocomprometidos. A identificação do fungo ao nível de espécie é complexa. Existem poucos estudos de vigilância fúngica na região Centro-Oeste do Brasil e a contaminação ambiental é uma condição de risco para pacientes imunocomprometidos adquirirem aspergilose. O objetivo deste estudo foi investigar a presença, identificar e determinar a suscetibilidade aos antifúngicos de *Aspergillus* spp. isolados no ar ambiente da enfermaria de onco-hematologia de um hospital terciário de Mato Grosso do Sul. De agosto de 2019 a fevereiro de 2020 foram realizadas 896 amostragens do ar ambiente (quartos e banheiros). A coleta de ar foi realizada com um impactador de ar (100L/min por 1 minuto) contendo placas de ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol. As placas foram incubadas por 72 h a 30°C. Os fungos foram identificados por meio de testes fenotípicos (características macroscópicas e microscópicas) e genotípicos (PCR e sequenciamento). A concentração inibitória mínima (MIC) dos antifúngicos itraconazol, voriconazol, posaconazol e anfotericina B para *A. fumigatus* foi determinada pelo teste de microdiluição em caldo em conforme recomendação do EUCAST (doc. E.Def 9.3.2, EUCAST). Foram isolados 250 *Aspergillus* spp. do ar ambiente. A identificação por sequenciamento foi realizada em 132 dos 250 isolados. As espécies mais prevalentes foram *Aspergillus fumigatus* (66), *A. flavus* (14) e *A. niger* (11). Dois isolados de *A. fumigatus* foram resistentes ao voriconazol (MIC = 2 mg/L) e 2 ao posaconazol (MIC = 0,5-1 mg/L). Todos os *Aspergillus fumigatus* isolados foram sensíveis a anfotericina B e ao itraconazol. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da biodiversidade fúngica hospitalar no Brasil e fornece subsídios para a implementação de medidas de controle de contaminação fúngica pelo ar em enfermaria onde se encontram pacientes com elevado risco para aspergilose invasiva.

Descritores: aspergilose; infecções oportunistas; monitoramento ambiental.

ABSTRACT

Aspergillus species are ubiquitous opportunistic pathogens responsible for causing serious diseases. *A. fumigatus* is the agent most implicated in cases of invasive and chronic pulmonary aspergillosis (IA). Inhalation of spores is the main route of transmission of IA in immunocompromised patients. The identification of the fungus at the species level is complex. There are few fungal surveillance studies in the Midwest region of Brazil and environmental contamination is a risk condition for immunocompromised patients to acquire aspergillosis. The aim of this study was to investigate the presence, identify and determine the antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. isolated in the ambient air of the oncology-hematology ward of a tertiary hospital in Mato Grosso do Sul. From August 2019 to February 2020, 896 ambient air samples were taken (bedrooms and bathrooms). Air collection was performed with an air impactor (100L/min for 1 minute) containing dichloran rose bengal chloramphenicol agar plates. The plates were incubated for 72 h at 30°C. The fungi were identified through phenotypic (macroscopic and microscopic characteristics) and genotypic (PCR and sequencing) tests. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the antifungals itraconazole, voriconazole, posaconazole and amphotericin B for *A. fumigatus* was determined by the broth microdilution test as recommended by EUCAST (doc. E.Def 9.3.2, EUCAST). 250 *Aspergillus* spp. of ambient air. Identification by sequencing was performed in 132 of the 250 isolates. The most prevalent species were *Aspergillus fumigatus* (66), *A. flavus* (14) and *A. niger* (11). Two *A. fumigatus* isolates were resistant to voriconazole (MIC = 2 mg/L) and 2 to posaconazole (MIC = 0.5-1 mg/L). All *A. fumigatus* isolates were sensitive to amphotericin B and itraconazole. The results obtained contribute to the knowledge of hospital fungal biodiversity in Brazil and provide subsidies for the implementation of measures to control fungal contamination through the air in wards where patients at high risk for invasive aspergillosis are found.

Descriptors: aspergillosis; opportunistic infections; environmental monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Micromorfologia de <i>Aspergillus</i> sp. em microcultivo em ágar batata, corado com lactofenol azul de algodão	13
Figura 2	<i>Aspergillus fumigatus</i> resistentes aos azoles isolados de diversos ambientes	21
Figura 3	Fluxograma de atividades realizadas: coleta, isolamento, identificação de <i>Aspergillus</i> e teste de suscetibilidade	26
Figura 4	Colônias de diferentes espécies de fungos em agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol isoladas do ar ambiente no setor de onco-hematologia	28
Figura 5	Ponto de coleta no quarto da unidade de onco-hematologia	28
Figura 6	Colônias de <i>A. fumigatus</i> e sua micromorfologia em lactofenol-azul algodão. 400 X	30
Figura 7	Descrição da frequência de <i>Aspergillus</i> isolados do ar ambiente de acordo com o local de isolamento e as estações do ano (28 semanas)	38
Figura 8	Distribuição de número de amostras positivas para <i>Aspergillus</i> por semana de coleta	38
Figura 9	Frequência de <i>Aspergillus</i> segundo precipitação, umidade e temperatura nos dias de amostragem do ar. Agosto de 2019 a fevereiro de 2020. Campo Grande – Mato Grosso do Sul, Centro-Oeste, Brasil	39
Figura 10	Seções de <i>Aspergillus</i> isolados do ar ambiente de uma unidade de onco-hematologia identificadas por meio de testes fenotípicos em Campo-Grande - MS, Brasil. Agosto de 2019 a fevereiro de 2020	40
Figura 11	<i>Aspergillus</i> do microbioma hospitalar (enfermaria de onco-hematologia) identificados por biologia molecular. Campo Grande-MS, agosto de 2019 a fevereiro de 2020	41
Figura 12	<i>Aspergillus fumigatus</i> resistentes e distribuição da diversidade do gênero <i>Aspergillus</i> provenientes do microbioma hospitalar no Brasil	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Características do gênero <i>Aspergillus</i>	12
2.2	Aspergilose	15
2.2.1	Apresentações clínicas da aspergilose e grupos de risco	15
2.2.2	Epidemiologia	17
2.3	Impacto dos <i>Aspergillus</i> no ambiente hospitalar	18
2.4	Tratamento e resistência aos antifúngicos	20
2.5	Diagnóstico	22
2.6	Identificação e determinação da suscetibilidade antifúngica	22
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	Tipo, local e período da pesquisa	26
4.2	Procedimentos de coleta	27
4.2.1	Locais de coleta	28
4.3	Procedimentos para identificação fúngica	29
4.3.1	Características morfológicas utilizadas na identificação de <i>Aspergillus</i>	29
4.4	Identificação molecular	30
4.4.1	Extração de DNA	30
4.4.2	Amplificação do DNA alvo pela PCR (reação em cadeia da polimerase)	31
4.4.3	Purificação dos produtos de PCR	33
4.4.4	Reação de sequenciamento	33
4.4.5	Reação de precipitação com etanol EDTA	33
4.4.6	Análise das sequências de DNA	34
4.5	Teste de suscetibilidade	34
4.5.1	Preparo da solução estoque	35
4.5.2	Preparo do inóculo	35
4.5.3	Preparo das placas de microtitulação	36
4.5.4	Leitura das concentrações inibitórias mínimas (MIC)	36

4.6	Considerações éticas	37
5	RESULTADOS	38
5.1	<i>Aspergillus</i> isolados do ar da enfermaria de onco-hematologia	38
5.2	Identificação fenotípica (ao nível de seção)	40
5.3	Identificação molecular	41
5.4	Suscetibilidade antifúngica de <i>A. fumigatus</i> isolados do microbioma	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A – aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital	63
	APÊNDICE A – Dados dos testes de suscetibilidade dos antifúngicos (Itraconazol, Posaconazol, Voriconazol e Anfotericina B para os 66 isolados de <i>A. fumigatus</i>	64
	APÊNDICE B – Dados do sequenciamento de DNA de 132 isolados	66

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Aspergillus* estão comumente presentes no ambiente (solos, detritos orgânicos, poeira, alimentos e plantas em decomposição) e seus esporos são facilmente propagados pelo ar. A inalação desses esporos pode levar desde uma infecção pulmonar primária e até evoluir para uma infecção disseminada, comumente fatal em pacientes imunocomprometidos (CHO, *et al.*, 2017; LOEFFERT, *et al.*, 2017; MERAD, *et al.*, 2021; O’GORMAN, 2011; RESENDIZ-SHARPE, *et al.*, 2021).

Sob este aspecto, a contaminação do ambiente hospitalar é importante condição de risco para aspergilose invasiva ou disseminada principalmente em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva – UTI e centros oncológicos (HADRICH, *et al.*, 2010).

Sabe-se que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são cruciais para reduzir as altas taxas de mortalidade associadas à aspergilose invasiva (DASBACH; DAVIES; TEUTSCH, 2000; WHITE, *et al.*, 2010). Entretanto, o início do tratamento frequentemente é baseado apenas na suspeita clínica tendo em vista que nem todos os laboratórios dispõem de técnicas apropriadas para identificar fungos (SCHMIEDEL & ZIMERLLI, 2016) .

Os antifúngicos triazoles são os agentes mais utilizados para tratamento e prevenção de Aspergilose Invasiva (AI). Anfotericina B (AmB) desoxicolato e seus derivados lipídicos são opções apropriadas para terapia inicial e de resgate de infecções por *Aspergillus* quando o voriconazol não pode ser administrado. As equinocandinas são eficazes na terapia de resgate (isolada ou em combinação) contra AI (PATTERSON, *et al.*, 2016).

Existem evidências de que a suscetibilidade aos antifúngicos varia entre as espécies de *Aspergillus* e relatos de resistência têm sido descritos (GONZALEZ-JIMENEZ, *et al.*, 2021; MEIS, *et al.*, 2016; MONTEIRO, *et al.*, 2019; PONTES, *et al.*, 2020; RESENDIZ-SHARPE, *et al.*, 2021; SU, *et al.*, 2021). Sob este aspecto, é de suma importância a identificação desses patógenos e a realização do antifungigrama a fim de se detectar resistência aos antifúngicos (WALSH, *et al.*, 2008). Além disso, o conhecimento do grau de contaminação ambiental por

espécies de *Aspergillus* é útil para se desenvolver estratégias de contenção dos propágulos fúngicos no ambiente hospitalar.

Apesar da relevância, no Brasil, poucos estudos foram realizados para caracterizar a diversidade fúngica no ar ambiente de hospitais (BARREIROS, *et al.*, 2015; BOFF, *et al.*, 2013; BRUN, *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020; GONÇALVES, *et al.*, 2018; MOBIN & SALMITO, 2006; DE ALMEIDA ALVES SIMÕES, *et al.*, 2011; TEIXEIRA, *et al.*, 2005).

Em razão da falta de estudos na região Centro-Oeste do Brasil e o fato da contaminação ambiental ser uma condição de risco para pacientes imunocomprometidos adquirirem aspergilose, o objetivo deste estudo foi investigar *Aspergillus* spp. em enfermaria de onco-hematologia de um hospital de referência do Mato Grosso do Sul e determinar a sua suscetibilidade aos antifúngicos.

Com este estudo espera-se contribuir com a literatura regional e nacional sobre o tema e com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar e equipe médica assistente com dados que possam ser úteis na elaboração de medidas de controle e prevenção de modo a minimizar os riscos de infecção por *Aspergillus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do gênero *Aspergillus*

Um dos primeiros gêneros de fungo a ser nomeado foi *Aspergillus*, pelo padre botânico, o italiano Antonio Micheli, em 1729. Ao observar as estruturas microscópicas, este pesquisador verificou que sua forma era semelhante a um aspergillum (em latim, *aspergere*), um instrumento usado para dispersar água benta em liturgias cristãs (Etymologia: *Aspergillus*, 2006).

Aspergillus compreende um grupo diversificado de espécies baseado em caracteres morfológicos, fisiológicos e filogenéticos, que impactam significativamente a biotecnologia, produção de alimentos, ambientes internos e saúde humana (SAMSON, *et al.*, 2014).

As espécies de *Aspergillus* pertencem ao reino Fungi, família Aspergillaceae, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales. O gênero engloba 446 espécies que estão divididas em 6 subgêneros (*Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Aspergillus*, *Cremeri* e *Polypaecilum*) e 27 seções (*Candidi*, *Petersoniorum*, *Nigri*, *Terrei*, *Flavipedes*, *Janorum*, *Circumdati*, *Tannerorum*, *Robusti*, *Flavi*, *Nidulantes*, *Aenei*, *Usti*, *Cavernicolarum*, *Raperorum*, *Silvatici*, *Bispori*, *Ochraceorosei*, *Sparsi*, *Fumigati*, *Clavati*, *Vargarum*, *Cervini*, *Restricti*, *Aspergillus*, *Cremeri* e *Polypaecilum*) (HOUBRAKEN, *et al.*, 2020).

Esses fungos filamentosos apresentam uma ampla diversidade de estilos de vida e são de grande importância para os seres humanos em ambientes clínicos, industriais e agrícolas (BENNETT, 2010; GIBBONS & ROKAS, 2013; KRIJGSHELD, *et al.*, 2013; SAMSON, *et al.*, 2014).

Como exemplo, cita-se o *Aspergillus fumigatus*, considerado responsável pelo maior número de mortes por fungos e pelo segundo maior número de infecções humanas por fungos (PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006); *Aspergillus flavus*, uma praga agrícola que contamina várias culturas com sua potente e cancerígena aflatoxina, responsável por grandes perdas no rendimento das colheitas e algumas mortes por ano (AMAIKE & KELLER, 2011); *Aspergillus niger* por sua vez, é

considerado uma “fábrica de células” biotecnológica amplamente utilizada na indústria alimentícia (PEL, *et al.*, 2007); *Aspergillus nidulans*, tem sido considerado um importante modelo para genética eucariótica e biologia celular (ROKAS & GALAGAN, 2008).

Em adição, muitas espécies de *Aspergillus* impulsionam a produção de bebidas e molhos no extremo Oriente e no mundo, dentre os quais citam-se *Aspergillus oryzae*, usado na fabricação de saquê (GIBBONS, *et al.*, 2012); *Aspergillus sojae*, no molho de soja (SATO, *et al.*, 2011), e *Aspergillus kawachii* tradicionalmente usado para preparar a bebida destilada japonesa chamada de Shochu (FUTAGAMI, *et al.*, 2011).

Macroscopicamente, as colônias de *Aspergillus* tem aspecto cotonoso e de cores variadas como branca, azul esverdeado, amarelo, preto, entre outras (LACAZ, *et al.*, 2002).

Quanto a sua micromorfologia, *Aspergillus* são fungos filamentosos, hialinos, que possuem hifas septadas que tendem a mostrar ramificações dicotômicas (ângulo de 45°). A partir de uma célula base saem os conidióforos. Estes são formados por uma estrutura chamada de vesícula de onde são formados as fiálides, seguidas por cadeias de conídios (figura 1) (HOUBRAKEN; DE VRIES; SAMSON, 2014; LACAZ, *et al.*, 2002; SUGUI, *et al.*, 2014).

Figura 1 - Micromorfologia de *Aspergillus* sp. em microcultivo em ágar batata, corado com lactofenol azul de algodão.



Fonte: O autor, 2022.

Os fungos do gênero *Aspergillus* estão entre os mais abundantes do mundo e exibem diversas ecologias visto que crescem em uma ampla faixa de temperatura e umidade, e não são nutricionalmente exigentes.

Se reproduzem por meio de conídios assexuados - facilmente dispersos no ar em curtas e longas distâncias, podem também produzir células de reprodução sexuada, altamente resistentes ao ambiente. Estudos prévios sugerem que o seu sucesso reprodutivo é consequência de sua alta adaptação a condições ambientais diversas (PAULUSSEN, *et al.*, 2017; STEVENSON, *et al.*, 2015; WYATT, *et al.*, 2015b).

Os ascósporos, estrutura de reprodução sexuada de espécies como *A. fumigatus* representam notável tolerância a temperaturas extremas e desidratação, podendo germinar a temperatura de ≥ 70 °C e toleram o congelamento prolongado a ≤ 12 °C por possuírem uma parede celular espessa, quando comparada com a de outras espécies de *Aspergillus* (KWON-CHUNG, *et al.*, 2013).

Esses fungos filamentosos são encontrados nos mais diversos nichos. São considerados ubíquos por estarem presentes no solo, na água, em materiais

orgânicos em decomposição, em alimentos, no ar, na poeira, tanto em ambientes rurais quanto urbanos, por serem capazes de utilizar como fonte de alimento uma grande variedade de substratos orgânicos (PAULUSSEN, *et al.*, 2017; STEVENSON, *et al.*, 2015; WYATT, *et al.*, 2015a).

No ambiente, a grande maioria é considerada sapróbia, entretanto, algumas espécies de *Aspergillus* como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. nidulans* podem causar infecções oportunistas em humanos e animais (BRAKHAGE, 2005; CHEN, *et al.*, 2019; DENNING, 1998; MONTEIRO, *et al.*, 2021; STEVENS, *et al.*, 2000).

Estes fungos desenvolveram mecanismos adaptativos que favorecem sua permanência no organismo, resistindo às condições desfavoráveis nos pulmões, mudanças de temperaturas, pH, água, nutrientes, estresse oxidativo e propriedades antifúngicas de moléculas do hospedeiro (ARASTEHFAR, *et al.*, 2021).

2.2 Aspergilose

2.2.1 Apresentações clínicas da aspergilose e grupos de risco

Aspergillus presentes no ambiente são capazes de causar infecções do tipo alérgica, crônica e invasiva (WARRIS, 2014).

A apresentação clínica da aspergilose é estabelecida pela interação parasito-hospedeiro e, dependendo da resposta imune do paciente, pode ser considerada aspergilose pulmonar invasiva (API), aspergilose pulmonar crônica (APC), aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), rinosinusite crônica, asma fúngica e bronquite (ARASTEHFAR, *et al.*, 2020; DÜMIG, *et al.*, 2020; LATGÉ & CHAMILOS, 2019; WARRIS, 2014).

A infecção comumente se inicia com a inalação de conídios (esporos assexuados) dispersos no ambiente. Após penetrar nos alvéolos, se não forem removidos pelo organismo, esses conídios podem germinar e proliferar (LATGÉ & CHAMILOS, 2019).

Em indivíduos com algum comprometimento no sistema imunológico (como na AIDS), submetidos a transplante de medula óssea, com câncer e/ou com doença pulmonar obstrutiva, algumas espécies de *Aspergillus* podem causar aspergilose invasiva (AI), uma doença predominantemente do trato respiratório que envolve o parênquima pulmonar e também pode envolver pleura, traqueia e brônquios. A partir desses sítios, o fungo pode se disseminar para outros órgãos como cérebro, fígado, rins, intestino e pele (BASSETTI & BOUZA, 2017; MERAD, *et al.*, 2021; TATTEVIN; JAUREGUIBERRY; GANGNEUX, 2004).

A aspergilose invasiva (AI) é uma infecção fúngica oportunista associada a elevada morbidade e mortalidade em pacientes imunossuprimidos em tratamento com corticosteróides, quimioterapia, neutropênicos, transplantados entre outras comorbidades (CHAKRABARTI, *et al.*, 2011; RUDRAMURTHY, *et al.*, 2019; STEINBACH, *et al.*, 2012). Os danos epiteliais pulmonares decorrentes da influenza grave e uso de corticosteróides são os principais fatores de risco para desenvolvimento da aspergilose pulmonar invasiva - API (ARASTEHFAR, *et al.*, 2020).

Outras importantes formas clínicas da aspergilose são: aspergiloma ou bola fúngica, e infecções encontradas em pacientes com fibrose cística (DOĞAN, *et al.*, 2020; FELTON, *et al.*, 2014).

Enquanto aspergilose invasiva é mais comum em indivíduos neutropênicos, aspergilose broncopulmonar alérgica acomete em maior número os pacientes com doenças pulmonares crônicas, como a asma e a fibrose cística (CHABI, *et al.*, 2015; RUSSO, *et al.*, 2020). Pacientes com diabetes e alcoólatras tendem a desenvolver aspergilose pulmonar crônica (DOĞAN, *et al.*, 2020).

Aspergiloma se desenvolve mais facilmente em pacientes que têm cavidades no pulmão em consequência de sequelas causadas pela tuberculose ou sarcoidose, por exemplo (ALASTRUEY-IZQUIERDO, *et al.*, 2018; KOSMIDIS & DENNING, 2015).

Estudos prévios mostram que indivíduos com comorbidades como covid e superinfecções bacterianas aumentam a suscetibilidade dos pacientes a adquirirem aspergilose invasiva e estão relacionadas a desfechos clínicos mais desfavoráveis (KOEHLER, *et al.*, 2020; TIEW, *et al.*, 2021).

Indivíduos com influenza que apresentam síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) grave são propensos a desenvolverem aspergilose pulmonar invasiva (API), de elevada taxa de mortalidade, quando internados por tempo prolongado (ARASTEHFAR, *et al.*, 2020).

Até pouco tempo *Aspergillus fumigatus* não era um patógeno humano comum, mas em consequência do aumento do uso de medicamentos imunossupressores, esta espécie se tornou um agente importante de infecções oportunistas (RESENDIZ-SHARPE, *et al.*, 2021).

Sabe-se que indivíduos com doença pulmonar obstrutiva aguda (DPOC), quando associada à aspergilose apresentam sintomas aumentados, função pulmonar prejudica e bronquiectasia. Até 43% dos pacientes com DPOC desenvolvem um quadro de doença fúngica, em consequência do uso de corticosteróides e sistema imune comprometido (BAFADHEL, *et al.*, 2014).

2.2.2 Epidemiologia

A frequência de infecções fúngicas oportunistas como candidíase, aspergilose e criptococose têm aumentado em todo o mundo devido ao aumento da população de risco (CADENA; THOMPSON; PATTERSON, 2021; DOĞAN, *et al.*, 2020; FERNÁNDEZ, *et al.*, 2014; STEINBACH, 2010).

Casos isolados e surtos esporádicos de aspergilose invasiva tem sido descritos principalmente em pacientes imunocomprometidos (CADENA; THOMPSON; PATTERSON, 2021; DE ALMEIDA, *et al.*, 2014; LATGÉ & CHAMILOS, 2019; LEDOUX, *et al.*, 2020; SONG; LIANG; LIU, 2020), mas também já foram descritos casos em indivíduos que não faziam parte dos grupos de risco mais conhecidos (TACCONE, *et al.*, 2015; VAZQUEZ, *et al.*, 2016). A doença parece ser mais prevalente em indivíduos do sexo masculino e com idade variando de 33 a 78 anos (MEENA, *et al.*, 2021; TACCONE, *et al.*, 2015; VAZQUEZ, *et al.*, 2016).

Em países em desenvolvimento (onde se tem grande número de pessoas de baixa renda, sem ou com pouco acesso a instalações médicas de qualidade) com

clima tropical / subtropical, doenças invasivas causadas por fungos tendem a ser mais comuns. Agentes como *Aspergillus* spp. tem o seu desenvolvimento e proliferação favorecido pelo clima quente e úmido (CHAKRABARTI, *et al.*, 2011).

De fato, pouco se sabe sobre a correlação entre o clima e o aumento de fungos do gênero *Aspergillus* em ambiente hospitalar. Estudos realizados não identificaram diferença significativa entre a densidade fúngica entre as diferentes estações (CHO, *et al.*, 2019; MARTÍNEZ-HERRERA, *et al.*, 2016). Em contrapartida, pesquisadores brasileiros observaram que, no outono, a prevalência de fungos no ambiente interno da enfermaria aumentou consideravelmente (BOFF, *et al.*, 2013).

Estudos prévios sugerem que, por ano, a aspergilose invasiva (AI) atinge cerca de 300.000 indivíduos e cerca de 30 milhões estão em risco de a adquirirem. A taxa de mortalidade em pacientes com AI pode chegar a 50% quando tratados e mais de 99% quando não tratados (BONGOMIN, *et al.*, 2017; DASBACH; DAVIES; TEUTSCH, 2000; SABINO, *et al.*, 2021; WHITE, *et al.*, 2010).

Acredita-se que existem, aproximadamente, três milhões de pessoas no mundo diagnosticadas com aspergilose pulmonar crônica (APC). Estima-se que em 2019, cerca de 1,2 milhão acometidas por tuberculose pulmonar tenha desenvolvido APC; 410.000 progrediram para APC após complicações da aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e quase 72.000 desenvolveram APC por complicações de sarcoidose pulmonar (BARAC, *et al.*, 2019; BONGOMIN, *et al.*, 2017; DENNING; PLEUVRY; COLE, 2011; DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013; VAN DER TORRE, *et al.*, 2021).

2.3 Impacto de *Aspergillus* no ambiente hospitalar

O ambiente contaminado com grande número de esporos fúngicos predispõe o desenvolvimento de um amplo espectro de alterações clínicas, principalmente em pacientes neutropênicos e com sistema imune deficiente (ARASTEHFAR, *et al.*, 2020; GHEITH, *et al.*, 2015).

Estima-se que, diante de condições favoráveis, um indivíduo pode inalar até

200 conídios presentes no ar ambiente (GONZALEZ-JIMENEZ, *et al.*, 2021). Indivíduos saudáveis têm o sistema imune capaz de eliminar os conídios de *Aspergillus* sp. dos pulmões. Entretanto, indivíduos com sistema imune imunossuprimido (ou imunocomprometido) podem desenvolver um amplo espectro de alterações clínicas e até culminar com desfecho fatal se não diagnosticados e tratados.

Estudos prévios descrevem que, em pacientes críticos, a taxa de mortalidade associada a aspergilose pulmonar invasiva pode ser de até 99% (DAGENAIS & KELLER, 2009; DASBACH; DAVIES; TEUTSCH, 2000; GONZALEZ-JIMENEZ, *et al.*, 2021; LATGÉ & CHAMILOS, 2019; MULDOON, *et al.*, 2017; WHITE, *et al.*, 2010).

Casos isolados e surtos de aspergilose têm sido descritos em hospitais brasileiros (MONTEIRO, *et al.*, 2021; NEGRI, *et al.*, 2014; PONTES, *et al.*, 2020; REICHERT-LIMA, *et al.*, 2018) e de todo o mundo (LEDOUX, *et al.*, 2020; GUNARATNE; WIJEYARATNE; SENEVIRATNE, 2007; MACHADO, *et al.*, 2021; ZHU, *et al.*, 2020). No ambiente hospitalar, conídios de *Aspergillus* spp. podem estar presentes no sistema de ventilação, em poeiras (de móveis e aquelas espalhadas em consequência de obras e/ou construção), vasos de plantas e flores (HAHN, *et al.*, 2002; MEHEUST, *et al.*, 2014; THIO, *et al.*, 2000).

Em hospitais, estudos de vigilância da contaminação ambiental têm sido estimulados, principalmente em áreas onde estão internados os pacientes críticos. Estudos prévios recomendam que haja uma atenção especial para a qualidade do ar em hospitais, principalmente em relação aos fungos, devido sua capacidade proliferativa, a fim de proteger os pacientes de infecções hospitalares e de possível piora do quadro clínico (CHO, *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020).

Em unidades onde estão internados pacientes neutropênicos com doenças hematológicas recomenda-se o uso de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air). Um ambiente biologicamente seguro para os pacientes, visitantes e funcionários do hospital é responsabilidade da instituição a qual deve prover meios para higiene e desinfecção adequadas (DA SILVA AQUINO, *et al.*, 2016).

Estudo recente mostra que a aquisição de COVID-19 quando associada a AI é uma morbidade que contribui para o aumento da mortalidade (KOEHLER, *et al.*, 2020).

2.4 Tratamento e resistência aos antifúngicos

Inicialmente, o tratamento da aspergilose é baseado apenas na suspeita clínica, tendo em vista que nem todos os laboratórios dispõem de técnicas apropriadas para identificar e realizar testes de suscetibilidade para fungos filamentosos como *Aspergillus* spp. (SCHMIEDEL & ZIMERLLI, 2016).

Os antifúngicos azoles (voriconazol, itraconazol, posaconazol e isavuconazol) são os agentes mais utilizados para tratamento e prevenção de Aspergilose Invasiva (AI). O poliênico Anfotericina B (AmB) desoxicolato e seus derivados lipídicos são opções apropriadas para terapia inicial e de resgate de infecções por *Aspergillus* quando o voriconazol não pode ser administrado (ARASTEHFAR, *et al.*, 2021).

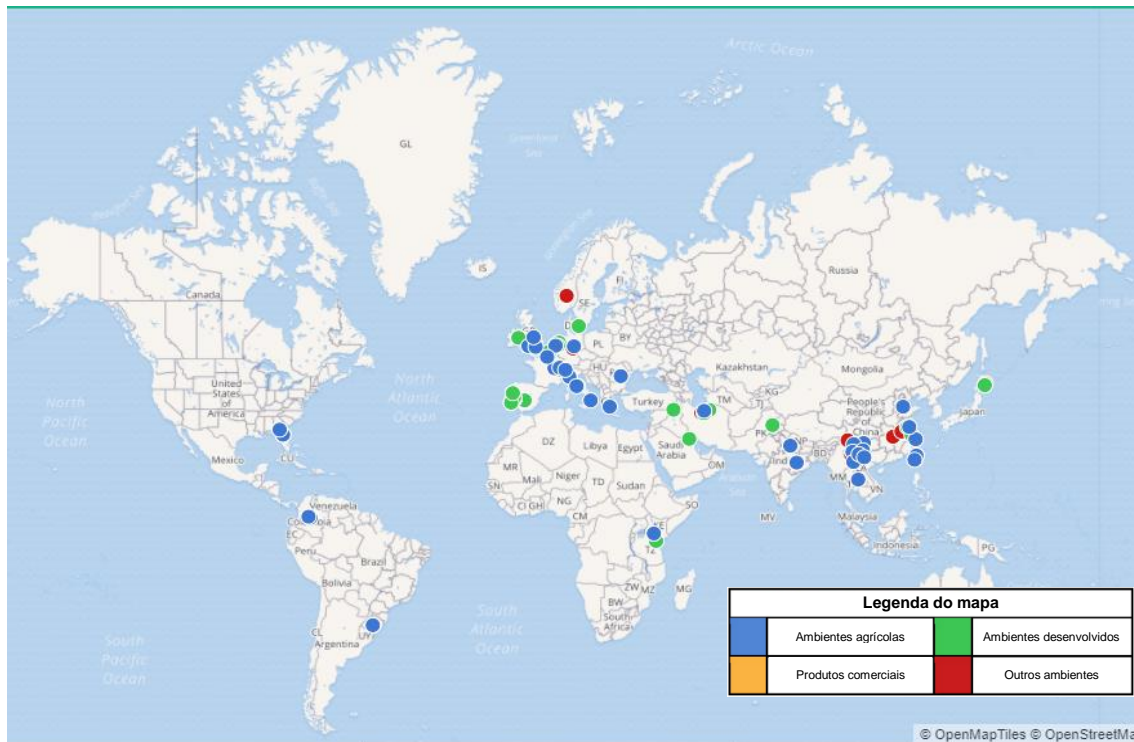
As equinocandinas são eficazes na terapia de resgate (isolada ou em combinação) contra AI mas não se recomenda seu uso rotineiro como monoterapia para o tratamento primário desse tipo de infecção, visto que são mais eficazes quando combinadas com outros fármacos (KANJ, *et al.*, 2018; PATTERSON, *et al.*, 2016).

Estudos mostram um aumento gradual de *Aspergillus fumigatus* resistentes aos azoles (Figura 2), isolados de ambientes agrícolas (horticultura ou produção agrícola), ambientes desenvolvidos (parques públicos, jardins, casas, locais de trabalho ou hospitais), produtos comerciais (produtos de varejo, produtos vendidos em lojas), outros ambientes (floresta isolada). Infecções causadas por *A. fumigatus* resistentes é na atualidade um importante problema de saúde pública (PARENT-MICHAUD, *et al.*, 2020; SABINO, *et al.*, 2021).

Há dois tipos de resistência antifúngica, a microbiológica, que ocorre quando há inibição do crescimento do organismo ou patógeno frente à uma concentração do antimicrobiano maior do que necessária para inibir o tipo selvagem, e a clínica, na qual o crescimento do patógeno é inibido por uma concentração de antimicrobiano que tem uma chance maior de haver falha terapêutica, ou seja, é necessário uma concentração maior do que a normalmente usada para inibir o crescimento do

patógeno, em consequência do tratamento não ser eficaz quando utilizadas concentrações usualmente eficientes (PFALLER, 2012).

Figura 2 - *Aspergillus fumigatus* resistentes aos azoles isolados de diversos ambientes.



Fonte: BURKS, *et al.*, 2021.

Estudos recentes sugerem que o aumento de aspergilose causadas por *Aspergillus* resistentes aos azoles pode ser consequência de profilaxia ou terapia antifúngica prolongada (BUIL, *et al.*, 2021). Essa resistência pode surgir tanto durante a terapia como também ser de origem ambiental (CHOWDHARY, *et al.*, 2017; DOĞAN, *et al.*, 2020; RESENDIZ-SHARPE, *et al.*, 2018; SHARMA, *et al.*, 2019).

De acordo com pesquisadores, o uso de fungicidas no meio agrícola pode induzir resistência aos antifúngicos por serem semelhantes aos azólicos utilizados na clínica médica (DOĞAN, *et al.*, 2020).

A resistência aos azoles, em sua maioria, está relacionada a mutações no

gene CYP51A. As mutações pontuais de CYP51A são descritas frequentemente em pacientes que passaram por um longo tratamento com azoles (GONZALEZ-JIMENEZ, *et al.*, 2021; PONTES *et al.*, 2020; SU, *et al.*, 2021).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de AI é desafiador e requer um alto nível de suspeição clínica. O padrão ouro para provar infecções fúngicas invasivas é o isolamento do fungo em cultura ou a observação do mesmo em exames histopatológicos em tecido. Este exame raramente está disponível a tempo devido aos riscos envolvidos na realização de biópsias durante a pancitopenia (DE PAUW, *et al.*, 2008).

A detecção de antígeno galactomanana (GM, um constituinte da parede celular das hifas) no sangue é atualmente o teste não invasivo para aspergilose invasiva mais amplamente utilizado. Tem uma sensibilidade de aproximadamente 71% e uma especificidade de aproximadamente 89% em pacientes hematológicos de alto risco (PFEIFFER, *et al.*, 2006).

Os laboratórios clínicos de rotina que fazem identificação de fungos filamentosos como *Aspergillus* normalmente se baseiam nas características fenotípicas (macro e micromorfológicas) do fungo, e consegue assim, identificar a seção a qual *Aspergillus* pertence. Para a identificação a nível de espécie é necessário que sejam feitos testes moleculares e outros testes como o da termotolerância, útil para identificação de *A. fumigatus* sensu stricto (DOĞAN, *et al.*, 2020).

O reconhecimento das diferentes espécies dentro das seções tem um importante papel na escolha da terapia a ser utilizada, dado que há diferentes perfis de suscetibilidade frente aos antifúngicos (DOĞAN, *et al.*, 2020).

Uma investigação microbiológica aprimorada e monitoramento sorológico dos pacientes podem diferenciar colonização das categorias de maior potencial patogênico (FELTON, *et al.*, 2014).

2.6 Identificação e determinação da suscetibilidade antifúngica

Para a identificação de isolados até o nível de seção, os micologistas utilizam as características macroscópicas (cor e aspecto) das colônias e realizam microcultivo em lâmina contendo blocos de ágar batata (LACAZ, *et al.*, 2002; WALSH; HAYDEN; LARONE, *et al.*, 2018). Essa identificação nem sempre é fácil, faz-se necessário um micologista experiente para identificar características morfológicas desses organismos que muitas vezes se sobrepõem ou são bastante similares (BALAJEE, *et al.*, 2009).

Para uma identificação mais fidedigna das espécies e estudos epidemiológicos, é essencial que sejam feitas técnicas de biologia molecular como sequenciamento genético utilizando os genes das regiões calmodulina e β -tubulina. Para análise das sequências é importante usar bancos de dados públicos, como o GenBank, que possuem uma rica quantidade de sequências disponíveis (ARASTEHFAR, *et al.*, 2021).

As espécies de *Aspergillus* mais frequentemente isoladas no ambiente hospitalar fazem parte das seções *Circumdati*, *Clavati*, *Cremeri*, *Nigri*, *Restricti*, *Usti* e *Versicolores* (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016; SÁNCHEZ SPINOSA, *et al.*, 2021).

Com isolados resistentes aos azoles sem resposta efetiva à terapia, testes de triagem devem ser feitos utilizando VIPcheck, seguido por SensiTitre, microdiluição em caldo ou por tiras de concentração de gradiente (KOEHLER, *et al.*, 2020; ULLMANN, *et al.*, 2018).

Para se determinar a suscetibilidade aos antifúngicos têm sido descritos diferentes métodos como disco difusão em ágar, microdiluição em caldo, microdiluição em placas, microdiluição em sistemas automatizados. Os testes de referência para se determinar a concentração inibitória mínima (MIC) dos antifúngicos mais utilizados são os de microdiluição em caldo padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

No Brasil utilizamos o BrCast, um subcomitê do EUCAST. Os métodos mais práticos para serem realizados na rotina do laboratório de microbiologia e que também informam o MIC incluem a microdiluição em caldo colorimétrica (Sensititre

Yest-One) e a difusão em ágar com fitas (Etest®) contendo gradientes de concentração de alguns antifúngicos (ESPINEL-INGROFF, *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a presença de *Aspergillus* spp. no ar ambiente da enfermaria de onco-hematologia de um Hospital de referência do Mato Grosso do Sul bem como caracterizar as espécies.

3.2 Objetivos específicos:

- Detectar a presença de fungos do gênero *Aspergillus* do ar ambiente da enfermaria de onco-hematologia de um Hospital terciário de Campo Grande-MS.
- Identificar as espécies de *Aspergillus* isolados por meio de testes fenotípicos e genotípicos.
- Determinar o perfil de suscetibilidade antifúngica de *Aspergillus fumigatus* isolados.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo, local e período da pesquisa

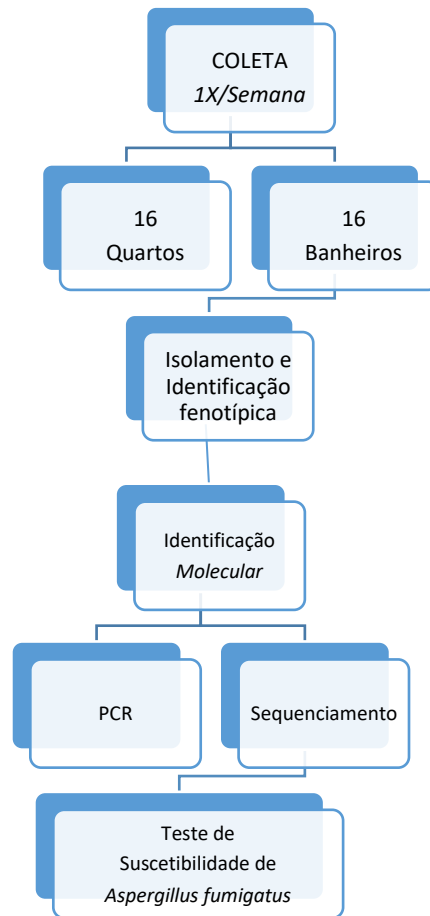
Este estudo é de natureza descritiva, de desenho transversal, baseada no isolamento de *Aspergillus* spp. de amostras provenientes do ar ambiente de uma unidade de onco-hematologia de um hospital terciário, de 399 leitos, situado no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. O setor de onco-hematologia possui 46 leitos, divididos em 16 enfermarias, cada qual com um quarto e um banheiro, sem filtros de ar e sem aparelhos de condicionadores de ar.

As amostragens do ar foram realizadas semanalmente às sextas-feiras, entre 9h e 12h, durante 28 semanas, de agosto de 2019 a fevereiro de 2020.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas (LPM) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FACFAN – UFMS) e no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas na Universidade Estadual de Campinas (LEMDI - UNICAMP).

A figura 3 ilustra, resumidamente, os procedimentos realizados para o isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* do ar da unidade de onco-hematologia de um hospital terciário de Campo Grande - MS.

Figura 3 - Fluxograma de atividades realizadas: coleta, isolamento, identificação de *Aspergillus* e teste de suscetibilidade.



4.2 Procedimentos de coleta

Para a coleta de amostras do ar ambiente foi utilizado impactador de ar (M Air T, Millipore-Merck, Billerica, Massachusetts, EUA), o qual aspirou um volume de 100L/min (LOEFFERT, *et al.*, 2017) em cada local de amostragem.

Os meios de cultura utilizados para isolamento dos fungos foram o Ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid, Austrália) suplementado com cloranfenicol 0,05 g / L e o Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (Scharlab, Espanha). A figura 4 mostra placas de Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol contendo colônias de diferentes cores e aspectos (cremoso, filamentosos) de fungos presentes no ar de ambiente hospitalar.

Figura 4 – Colônias de diferentes espécies de fungos em agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol isoladas do ar ambiente no setor de onco-hematologia.



4.2.1 Locais de coleta

As coletas foram realizadas nos quartos e banheiros dos pacientes da unidade de onco-hematologia, localizada no 4º andar de um prédio de 8 andares. A coleta de ar foi realizada em 1 ponto de cada quarto e em 1 ponto de cada banheiro. Os locais de coleta foram identificados pelos números 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465 e 466.

A figura 5 mostra um ponto de coleta de um quarto recentemente desocupado.

Figura 5 – Ponto de coleta no quarto da unidade de onco-hematologia.



4.3 Procedimentos para identificação fúngica

Após as coletas, as placas foram identificadas, embaladas e transportadas em caixa de isopor até o LPM – UFMS, onde ficaram incubadas por 72 h a 30°C. As colônias sugestivas de *Aspergillus* sp. foram repicadas em placas contendo Ágar Batata Dextrose (Laborclin, Brasil) para isolamento de colônias puras. Em seguida, as colônias eram armazenadas pelo método de Castellani (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992).

Para realização das provas de identificação, uma alíquota desta suspensão era inoculada em Ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid, Austrália).

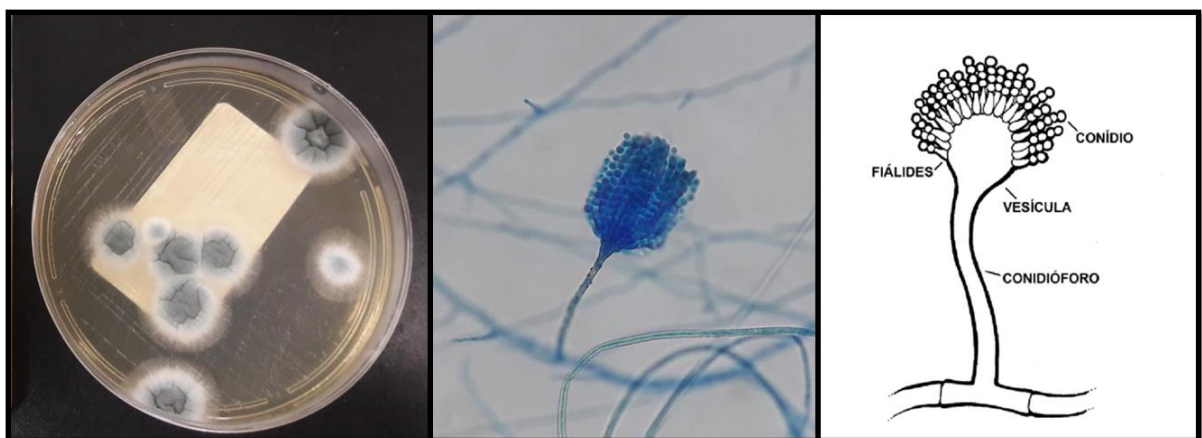
A identificação das seções de *Aspergillus* isolados foi realizada por metodologia clássica de visualização de características macroscópicas e micromorfológicas (HOUBRAKEN, *et al.*, 2020), e confirmada por metodologia molecular: PCR (HADRICH, *et al.*, 2010) e sequenciamento de DNA (BALAJEE, *et al.*, 2009).

4.3.1 Características morfológicas utilizadas na identificação de *Aspergillus*

Inicialmente, fez-se a observação características macroscópicas (cor, aspecto e

textura) de cada colônia isolada e, em seguida, uma pequena amostra foi adicionada em lâmina de microscopia contendo uma gota de lactofenol azul algodão. Em objetivas de 10 e 40 as estruturas microscópicas (conidióforo, distribuição das fiálides na vesícula, tipo de fiálides e conídios) eram cuidadosamente avaliadas (LACAZ, *et al.*, 2002). A Figura 6, ilustra colônias características de *A. fumigatus* e sua micromorfologia em lactofenol-azul algodão. 400 X.

Figura 6 - Colônias de *A. fumigatus* e sua micromorfologia em lactofenol-azul algodão. 400 X.



Fonte: MESQUITA-ROCHA (2019), com adaptação.

4.4 Identificação molecular

Todos os isolados não identificados pelas características morfológicas, os pertencentes da seção flavi e fumigati foram identificados por técnicas moleculares, enquanto os da seção nigri foram selecionados aleatoriamente (de 5 em 5).

4.4.1 Extração de DNA

Com um swab umedecido em tampão fosfato salina (Sigma, EUA) fez-se um raspado de colônias puras de *Aspergillus* cultivadas em ágar Batata Dextrose (Laborclin, Brasil) por 48h horas a 37 °C. Em seguida, os conídios foram depositados em microtubos de 2mL contendo 500 µL de tampão fosfato salina e 3g de microesferas de zircônio (Loccus, Brasil).

Para a ruptura mecânica da parede celular os microtubos com as amostras foram colocados no MagNA Lyser (Roche, EUA) a uma velocidade de 5.000 rpm (rotações por minuto) por 99 segundos, sendo o processo repetido três vezes. Posteriormente, colocadas na centrífuga a 10.000 g por 2 min a 22°C (Centrifuge 5424R, Eppendorf, Alemanha).

A extração do DNA genômico das amostras de *Aspergillus* foi feita utilizando-se o QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen Sciences, Maryland USA) seguindo as instruções do fabricante.

4.4.2 Amplificação do DNA alvo pela PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para amplificação dos fragmentos de DNA dos isolados pertencentes à seção *Aspergillus fumigatus* foram utilizados primers das regiões β -tubulina 2A (bt2A) e β -tubulina 2B (bt2B) (Sigma, EUA) (BALAJEE, *et al.*, 2009; GLASS, 1995; HENRY; IWEN; HINRICHS, 2000; SALAH, *et al.*, 2019) e para os isolados pertencentes à seção *Aspergillus niger*, seção *Aspergillus flavus* e os que não foram possíveis de serem identificados apenas com β -tubulina foram utilizados primers das regiões calmodulina 5 (CaM5) e calmodulina 6 (CaM6) (Sigma, EUA) (HONG, *et al.*, 2005).

As sequências dos primers utilizados estão no quadro 1. Para a realização das PCR foram utilizados microtubos 0,2 mL, contendo 12,5 μ L de PCR Master Mix (Promega, EUA), 1,25 μ L de cada primer 10mM, 2 μ L de produto restante da extração de DNA e água livre de nuclease (Promega, EUA). O volume final foi de 25 μ L.

Quadro 1 – Sequência de bases dos primers utilizados na amplificação e sequenciamento de DNA para identificação molecular das espécies de *Aspergillus* (BERAQUET, *et al.*, 2020; PONTES, 2018).

Primer	Sequência de bases
β -tubulina 2A	5'–GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC–3'
β -tubulina 2B	5'–ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC–3'

Calmodulina 5	5'–CCGAGTACAAGGAGGCCTTC–3'
Calmodulina 6	5'–CCGATAGAGGTCATAACGTG–3'

Para a realização das PCR foi utilizado o termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems, EUA). No quadro 2 são mostradas as condições das reações de PCR.

Quadro 2 – Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação de DNA das regiões de β -tubulina 2A/2B e Calmodulina 5/6.

Reação de PCR β-tubulina 2A/2B			
Passos	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	
Anelamento	58	30 s	40
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	5 min	1
Refrigeração	4	X	
Reação de PCR Calmodulina 5/6			
Passos	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	
Anelamento	53	30 s	40
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	5 min	1
Refrigeração	4	X	

Posteriormente foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen, EUA), em corrida a 100V por 25 min. As amostras foram coradas com 1,2 μ L Novel Juice (GeneDirex, EUA). Para cada 3 μ L de DNA foi utilizado 5 μ L de DNA Ladder (Invitrogen, EUA) e 2,4 μ L de corante. As bandas foram observadas pelo fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia).

4.4.3 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada adicionando 2 μL da enzima Exosap-IT Express (Applied Biosystems, EUA) a 5 μL de produto de PCR. A mistura foi levada ao termociclador, por 5 min, sendo 4 min a 37°C e 1 min a 80°C.

4.4.4 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando os produtos de PCR, com os primers β -tubulina (BT) 2A e 2B e calmodulina (CMD) 5 e 6, Big Dye TM Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, EUA), tampão e água ultrapura destilada (Invitrogen, EUA). Para o sequenciamento foram preparadas reações contendo 1 μL de Big Dye Terminator, 1 μL de *buffer*, 1 μL de primer β -tubulina 2A, 1 μL de primer β -tubulina 2B, 1 μL de primer CMD 5 e 1 μL de primer CMD 6 (cada primer em tubo diferente). Ambos a 1,6 mM, 2 μL do produto de PCR já purificado, com um volume final de 10 μL . Como controle de qualidade foi usado o DNA do plasmídeo Pgen e o *primer* M13. Para este processo foi realizado o termociclador nos parâmetros da reação de sequenciamento descritos no quadro 3.

Quadro 3 – Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento.

Reação de Sequenciamento			
Passos	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	10 s	
Anelamento	50	15 s	30
Extensão	60	4 min	
Refrigeração	4	X	

4.4.5 Reação de precipitação com etanol EDTA

As amostras foram submetidas à reação de precipitação com EDTA e lavagem com etanol. Primeiramente, foram adicionados 2,5 µL de EDTA (Invitrogen, EUA) com concentração de 125 mM, pH 8 e 30 µL de etanol 100% para biologia molecular (Sigma, EUA). A placa foi incubada em temperatura ambiente, protegida da luz por 15 min, em seguida as amostras foram centrifugadas a 3.000g por 30 min a 4°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Alemanha). Houve o descarte do sobrenadante, sendo novamente adicionados 30 µL de álcool 70% e repetida a centrifugação a 3.000g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e a placa com as amostras incubada a 60°C por 10 min.

Após serem realizadas a lavagem e precipitação com etanol, 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA) foi adicionada em cada poço utilizado. A placa foi colocada em banho seco a 95°C por 3 min e logo em seguida colocada em gelo por 2 min. O sequenciamento foi realizado no sequenciador SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

4.4.6 Análise das sequências de DNA

As sequências de DNA para cada um dos dois pares de ambos os primers (β2A/2B e CMD5/6) foram editadas e alinhadas no software Sequencher 5.2.4 e posteriormente estas foram inseridas e comparadas com as sequências disponíveis no GenBank pelo Basic Local Alignment Search Tool (Blast).

4.5 Teste de suscetibilidade

Neste estudo foi realizada uma amostragem de conveniência, no qual optou-se por realizar o teste de suscetibilidade somente dos *A. fumigatus*, fungo de maior potencial patogênico.

O teste de suscetibilidade *in vitro* foi realizado seguindo o documento EUCAST 9.3.2 por meio da microdiluição em caldo (European Committee on Antimicrobial

Susceptibility Testing, 2020a) com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, posaconazol e voriconazol, todos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Os antifúngicos utilizados foram escolhidos de acordo com os pontos de corte estabelecidos no documento para interpretação dos MICs dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, posaconazol e voriconazol para *A. fumigatus* (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020b).

O meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), com L-glutamina, sem bicarbonato, suplementado com 2% de glicose e tamponado com MOPS a 0,165 M (ácido morfolinopropanosulfônico) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para todos os testes de suscetibilidade.

4.5.1 Preparo da solução estoque

Os antifúngicos foram diluídos em DMSO e preparados de acordo com o protocolo do EUCAST e armazenados em alíquotas distribuídas em flaconetes de 2 mL, mantidos a -20°C. As concentrações pretendidas foram alcançadas a partir da diluição da solução estoque, diluindo-as em RPMI.

4.5.2 Preparo do inóculo

Após 72h de incubação a 30°C em Ágar Batata (HiMedia, Índia), as colônias de *A. fumigatus* foram levemente raspadas com o auxílio de um swab umedecido em água estéril e adicionadas em tubos contendo 5 mL de água destilada estéril suplementada com 0,1% de tween 20. A contagem dos conídios foi realizada nos quadrantes centrais de uma câmara de Neubauer. Houve então o ajuste do inóculo para uma concentração final de 3×10^6 UFC/mL. Em seguida, fez-se uma diluição 1:10 em água destilada estéril para se obter uma concentração de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL. Foram distribuídos em placas de microtitulação 100 μ L da suspensão em cada poço, desde o controle positivo, para certificar de que os microrganismos estavam viáveis, até a diluição mais concentrada do fármaco. A suspensão final de conídios foi de 1 - 2,5 x

10⁵ UFC/mL.

Os testes foram validados com a utilização de cepas padrão para o controle de qualidade, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, as quais foram suspensas em água destilada estéril à uma concentração equivalente à escala 0,5 de McFarland e distribuídos 100 µL em cada poço das colunas 2-12, nas linhas G e H, respectivamente. Os valores obtidos foram comparados com os valores de corte previamente estabelecidos pelo documento do EUCAST *Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents* v.10.0 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020b).

4.5.3 Preparo das placas de microtitulação

Em cada placa de 96 poços, com fundo chato, foram diluídos os antifúngicos anfotericina B, posaconazol, itraconazol e voriconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As colunas 1 e 12 foram utilizadas para os controles negativo e positivo de crescimento, respectivamente. O controle negativo continha apenas 200 µL de meio de cultura RPMI, enquanto no controle positivo foram adicionados 100 µL de RPMI e 100 µL da suspensão do inóculo. Nas colunas 2 a 11 foram distribuídos 100 µL das suspensões dos inóculos e 100 µL dos antifúngicos diluídos em RPMI. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

4.5.4 Leitura das concentrações inibitórias mínimas (MIC)

As placas foram incubadas a 35°C e observadas com 24 horas de incubação para leitura dos resultados dos controles de qualidade e 48 horas para leitura dos resultados de *Aspergillus*. Para os controles foi considerado no poço onde houve 50% de inibição do crescimento, enquanto para *Aspergillus* foi considerado o poço com 100% de inibição de crescimento. As leituras foram realizadas por meio de um espelho de leitura.

De acordo com o documento EUCAST (Tabelas de ponto de corte para

interpretação dos MICs dos antifúngicos v.10.0) que determina os pontos de corte para interpretação de resistência ou sensibilidade, para *A. fumigatus*, uma cepa é resistente de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 - Ponto de corte para interpretação de resistência ou sensibilidade para isolados de *A. fumigatus*.

Antifúngico	MIC (mg/L)	
	Sensível	Resistente
Itraconazol	≤ 1	> 1
Posaconazol	$\leq 0,12$	$> 0,25$
Voriconazol	≤ 1	> 1
Anfotericina B	≤ 1	> 1

Fonte: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2020b).

O posaconazol possui uma área de incerteza técnica (ATU), a qual a interpretação é incerta, que caso a cepa se apresente sensível ao itraconazol, esta também deve ser considerada sensível para posaconazol, caso seja resistente ao itraconazol, a cepa deve ser notificada como resistente ao posaconazol e ser sugerido o sequenciamento do CYP51A e confirmação dos MICs.

4.6 Considerações éticas

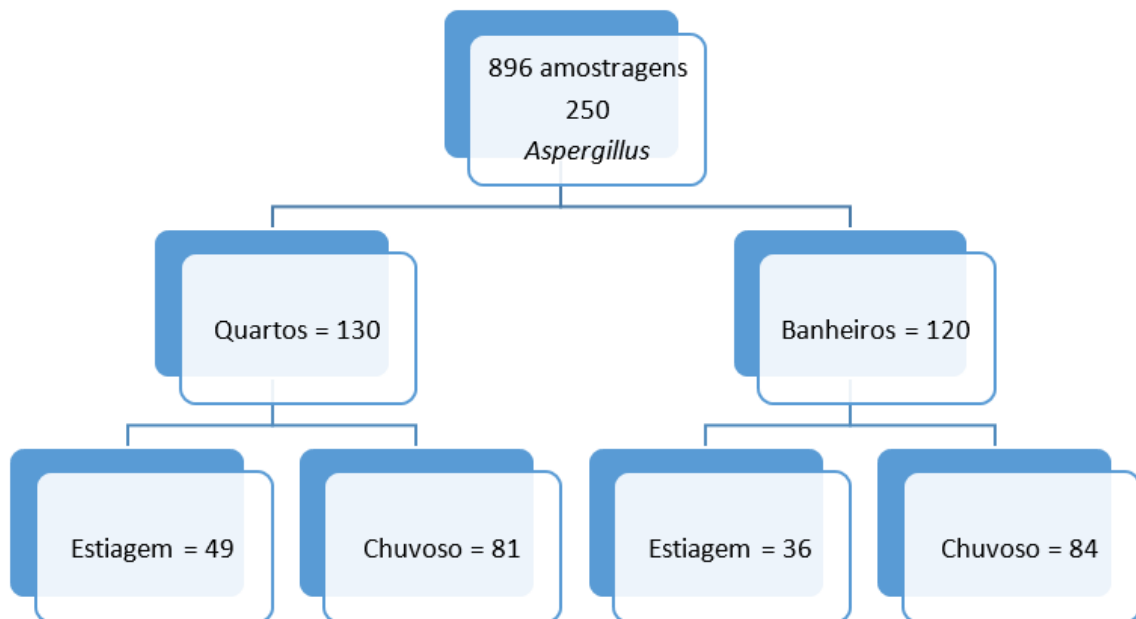
Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital (06/2018).

5 RESULTADOS

5.1 *Aspergillus* isolados do ar da enfermaria de onco-hematologia

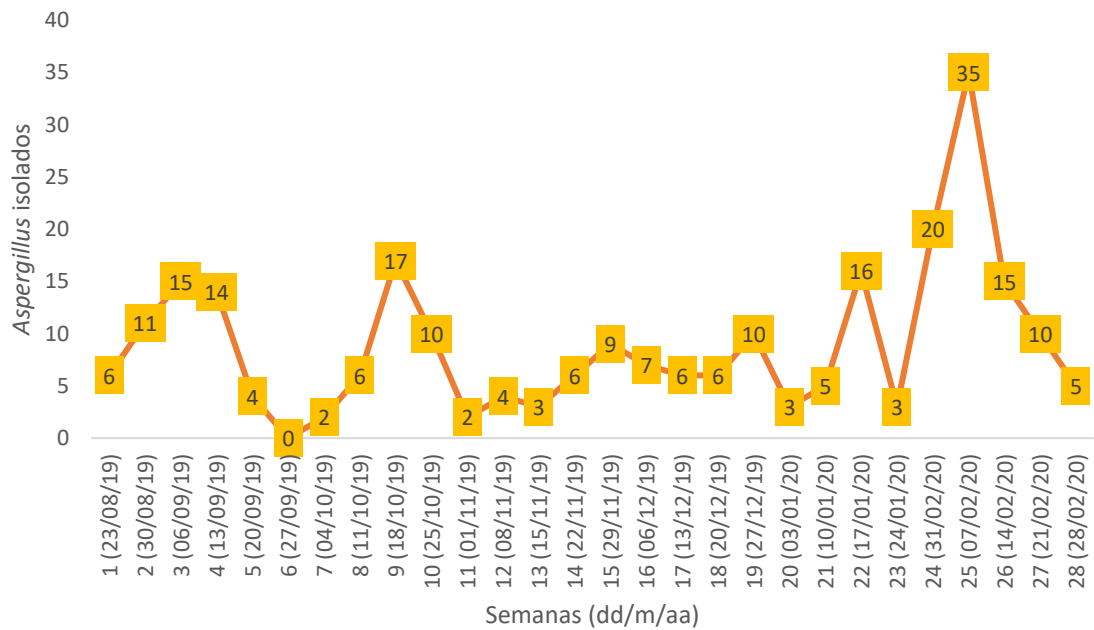
No período de agosto de 2019 a fevereiro de 2020, de um total de 896 amostras de ar ambiente coletadas foram isolados 250 *Aspergillus* spp. Como pode ser observado na figura 7, a quantidade de isolados de *Aspergillus* em quartos (n=130) de pacientes foi superior à quantidade isolada nos banheiros (n=120) e foi mais prevalente no verão.

Figura 7 - Descrição da frequência de *Aspergillus* isolados do ar ambiente de acordo com o local de isolamento e as estações do ano (28 semanas).



A figura 8 ilustra a distribuição de número de amostras positivas para *Aspergillus* por semana de coleta.

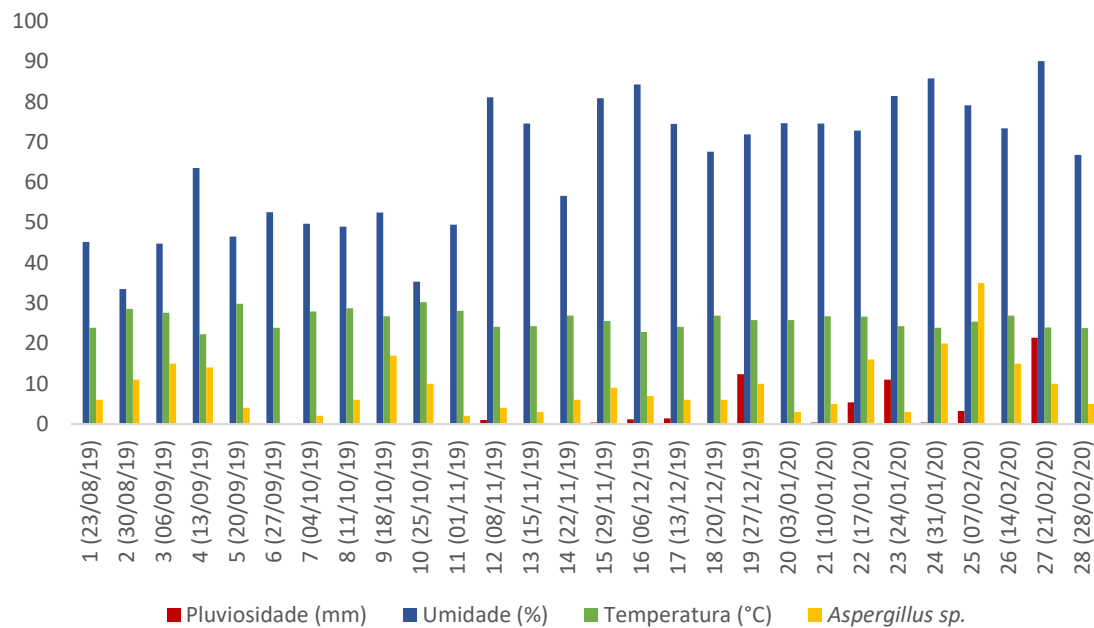
Figura 8 - Distribuição de número de amostras positivas para *Aspergillus* por semana de coleta.



Na semana 6 não houve crescimento de *Aspergillus* spp. em nenhum setor de coleta (16 quartos e 16 banheiros). A semana 25 foi a de maior número de isolamento (n=35). Nesta semana observou-se que havia uma pequena reforma em um dos banheiros da unidade.

A figura 9 ilustra a pluviosidade, umidade e temperatura nos dias que foram realizadas as coletas.

Figura 9 – Frequência de *Aspergillus* segundo precipitação, umidade e temperatura nos dias de amostragem do ar. Agosto de 2019 a fevereiro de 2020. Campo Grande – Mato Grosso do Sul, Centro-Oeste, Brasil.



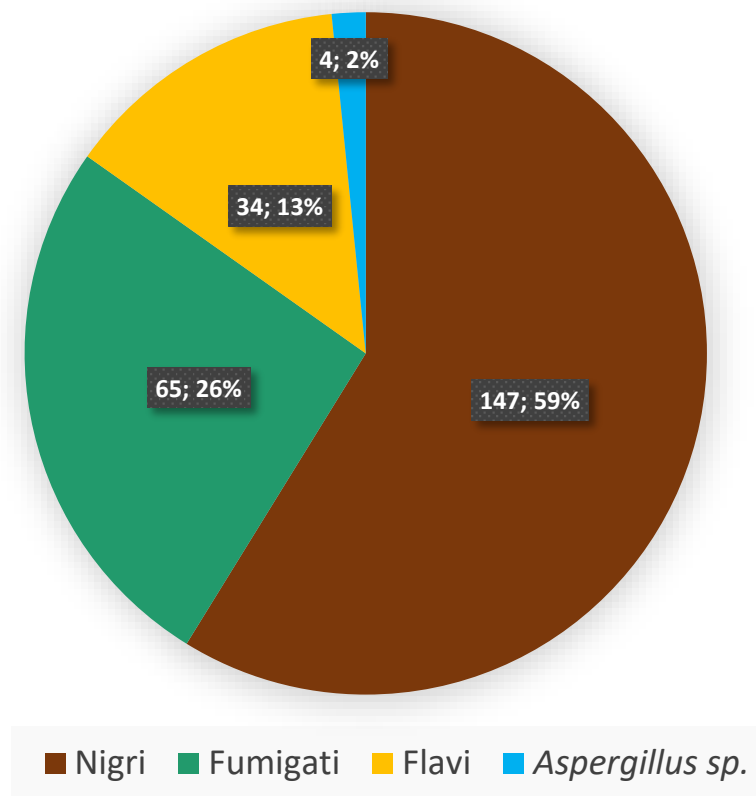
Fonte: CEMTEC, MS.

Dentre 250 *Aspergillus* spp. isolados, 85 (34%) foram isolados no período de estiagem (agosto e outubro) e 165 (66%) no período de chuvas (novembro a fevereiro).

5.2 Identificação fenotípica (ao nível de seção)

A análise das características morfológicas destes 250 *Aspergillus* isolados nos permitiu identificar espécimes pertencentes a 3 diferentes seções (Figura 10), dos quais 147 (58,8%) foram considerados pertencentes à **seção nigri**, 65 (26%) à **seção fumigati**, 34 (13,6%) à **seção flavi**. Os 4 (1,6%) isolados restantes não foram identificados (*Aspergillus* sp.).

Figura 10 - Seções de *Aspergillus* isolados do ar ambiente de uma unidade de onco-hematologia identificadas por meio de testes fenotípicos em Campo-Grande - MS, Brasil. Agosto de 2019 a fevereiro de 2020.



5.3 Identificação molecular

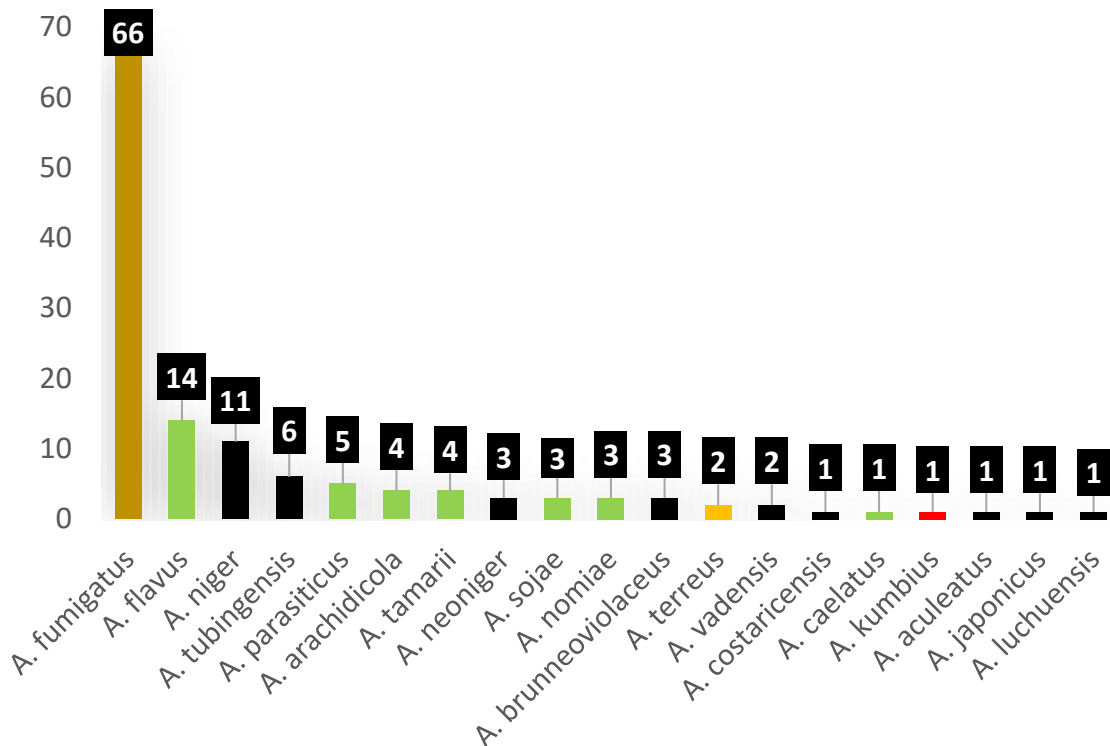
Dos 250 isolados, 132 (52,8%) foram selecionados para identificação molecular. Entre esses, 65 previamente identificados como da seção fumigati, 34 da seção flavi, os 4 não identificados pelas características macro e micromorfológicas, e os 29 restantes, foram aleatoriamente selecionados da seção nigri.

Assim, 132 isolados de *Aspergillus* foram analisados por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento dos quais 78 (59,1%) foram amplificados com β -tubulina 2A e 2B, 3 (2,3%) com calmodulina 5 e 6, e 51 (38,6%) com ambos os primers.

Por meio das análises moleculares entre 132 isolados de *Aspergillus* foi possível identificar 19 espécies de *Aspergillus* (Figura 11) pertencentes a 5 diferentes seções.

Figura 11 - *Aspergillus* do microbioma hospitalar (enfermaria de onco-hematologia) identificados por biologia molecular. Campo Grande-MS, agosto de 2019 a fevereiro

de 2020.



Obs.: Colunas da mesma cor correspondem a espécies de uma mesma seção.

5.4 Suscetibilidade antifúngica de *A. fumigatus* isolados do microbioma

Devido a relevância clínica, de todos os isolados identificados como *Aspergillus fumigatus* (N=66), fez-se o teste de suscetibilidade para avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) frente aos antifúngicos posaconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Suscetibilidade antifúngica de 66 *Aspergillus fumigatus* isolados do ar ambiente frente a antifúngicos triazólicos e anfotericina B.

Antifúngico	Concentração inibitória mínima (mg/L)							
	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2
	n (%)							
Itraconazol	0	2	5	2	38	14	5	0
		(3,0)	(7,6)	(3,0)	(57,6)	(21,2)	(7,7)	
Posaconazol	6	5	17	27	9	1	1	0
	(9,1)	(7,6)	(25,7)	(40,9)	(13,6)	(1,5)	(1,5)	
Voriconazol	0	2	3	5	2	31	21	2
		(3,0)	(4,5)	(7,6)	(3,0)	(47,0)	(31,8)	(3,0)
Anfotericina B	0	0	1	5	25	14	21	0
			(1,5)	(7,6)	(37,9)	(21,2)	(31,8)	

De acordo com o documento EUCAST que determina os pontos de corte para interpretação de resistência/sensibilidade para *A. fumigatus* (Tabela 1), no presente estudo, 3 (4,5%) dos 66 *A. fumigatus* isolados eram resistentes a um ou mais antifúngico azólico. Entre esses, 2 (3,0%) eram resistentes ao posaconazol (MIC = 0,5 a 1,0 mg/L), e 2 (3,0%) ao voriconazol (MIC = 2,0 mg/L). Nenhum *Aspergillus fumigatus* mostrou resistência *in vitro* ao itraconazol e a anfotericina B e em relação ao posaconazol, 9 (13,6%) ficaram na área de incerteza técnica (MIC = 0,25).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, o ar ambiente de uma enfermaria onde se encontravam internados pacientes com leucemia aguda e crônica, linfoma, mielodisplasias; mieloma múltiplo; síndromes mieloproliferativas entre outras foi monitorado para a presença de *Aspergillus*, por um período de 28 semanas.

Na enfermaria de onco-hematologia do hospital de estudo não há ar condicionado, filtros ou sistemas de filtragem do ar ambiente nos quartos e banheiros, dos quais foram isolados 250 *Aspergillus*. Estudos realizados sugerem a instalação de filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) para controlar e garantir uma qualidade do ar no ambiente hospitalar para controlar infecções fúngicas e reduzir efetivamente a contaminação ambiental por propágulos fúngicos (BELLANGER, *et al.*, 2017; CHO, *et al.*, 2018; FALVEY; STREIFEL, 2007).

O isolamento de *Aspergillus* sp. no ar ambiente é um fato comum. Entretanto, o isolamento de espécies sabidamente patogênicas (como *A. fumigatus* e *A. flavus*) onde estão internados pacientes neutropênicos e imunossuprimidos é uma situação muito séria.

Os resultados obtidos neste estudo documentou pela primeira vez a presença de diferentes espécies de *Aspergillus* isoladas do ar ambiente em um hospital terciário de Mato Grosso do Sul. Faz-se importante lembrar que estes fungos têm potencial de causar uma série de infecções, desde infecção isolada até surto de aspergilose (GUNARATNE; WIJEYARATNE; SENEVIRATNE, 2007; LEDOUX, *et al.*, 2020; MACHADO, *et al.*, 2021; MONTEIRO, *et al.*, 2021; NEGRI, *et al.*, 2014; PONTES, *et al.*, 2020; REICHERT-LIMA, 2018; ZHU, *et al.*, 2020).

No período proposto, de um total de 896 coletas de ar ambiente, 250 *Aspergillus* foram isolados de 32 locais (16 quartos e 16 banheiros). Com esses resultados deduz-se que nem todos os locais de coleta (n=32) tinham *Aspergillus* no ar ambiente. Este dado é muito bom pois podemos inferir que os cuidados de limpeza e higienização da maioria dos quartos e banheiros está sendo eficaz e a densidade de esporos destes fungos é muito baixa.

Em um único dia de coleta (semana 6), não foi isolado nenhum *Aspergillus* de nenhum ponto de coleta (n=32). O não isolamento de nenhuma colônia de *Aspergillus* pode estar relacionado a um ambiente recentemente higienizado, extremamente limpo

e/ou com sistema de filtro HEPA.

Considerando que na unidade estudada não existe filtro HEPA e que em todos os locais de coleta (16 quartos e 16 banheiros) da “semana 6” não foi isolado nenhum *Aspergillus* (fungo comum de ambiente), é mais provável que tenha ocorrido algum problema técnico na preparação do meio de cultura ou no tempo de incubação das placas. Acredita-se que a temperatura de incubação não tenha limitado o crescimento deste fungo que cresce em uma ampla faixa de temperatura (KWON-CHUNG, *et al.*, 2013).

Por outro lado, o isolamento de uma grande quantidade de fungos, como o encontrado na “semana 25”, (n = 35) sugere um ambiente mais contaminado e conseqüentemente de maior risco de infecção.

Já está bem estabelecido que o ambiente contaminado com grande número de esporos fúngicos predispõe o desenvolvimento de um amplo espectro de alterações clínicas, principalmente em pacientes neutropênicos como os pacientes os internados no hospital estudado (ARASTEHFAR, *et al.*, 2020; GHEITH, *et al.*, 2015; GONZALEZ-JIMENEZ, *et al.*, 2021).

Acredita-se que o aumento no número de isolados de *Aspergillus* na “semana 25” esteja relacionado com a reforma de um dos banheiros da unidade observada no mesmo dia da coleta de amostras.

Estudos prévios mostram que esporos de *Aspergillus* spp. e outros fungos podem ser transportados não só pelo ar ambiente, mas também por indivíduos internados, por visitantes, profissionais da equipe de saúde e ainda por materiais biológicos, equipamentos e insumos contaminados (DA SILVA AQUINO, *et al.*, 2016; HAHN, *et al.*, 2002; THIO, *et al.*, 2000).

Na Espanha, foi possível identificar uma cepa clínica geneticamente igual à encontrada no ambiente, indicando uma infecção adquirida em consequência do meio contaminado, ou ainda, que o próprio paciente, colonizado, tenha disseminado os isolados no ambiente (GONZALEZ-JIMENEZ, *et al.*, 2021).

Faz-se importante destacar que não é só o ambiente contaminado que favorece o desenvolvimento de aspergilose. Muitas outras condições (intrínsecas e extrínsecas) estão envolvidas neste processo. Fator de virulência que interfere

diretamente na patogenicidade, fatores físicos e químicos, o sistema imunológico comprometido, desnutrição, uso prolongado de fármacos imunossupressoras e antimicrobianos por tempo prolongado, falta de atenção aos procedimentos de biossegurança, higienização inadequada do ambiente, objetos, mobiliário e de instrumentos hospitalares são alguns exemplos (DA SILVA AQUINO, *et al.*, 2016; RAKSHA & URHEKAR, 2017).

O maior número de isolamento de *Aspergillus* sp. em quartos do que banheiros pode ser devido a maior circulação de pessoas nos quartos.

O hospital de referência está localizado em um ambiente com clima tropical, no qual os invernos são períodos de seca e os verões períodos de muita chuva e quentes. Ainda é pouco conhecida a associação entre o desenvolvimento da aspergilose e o clima.

Estudos prévios (MARTÍNEZ-HERRERA, *et al.*, 2016; REICHERT-LIMA, 2018), na presente pesquisa não houve diferença entre a concentração de fungos no período chuvoso e no período de estiagem. Como foram realizadas coletas desiguais em cada período, estas podem não representar as estações completamente.

Apesar da grande relevância, poucos são os estudos de vigilância que monitoram microrganismos patogênicos presentes no ambiente. Além disso, nem todo laboratório de microbiologia dispõe de meios de cultura e testes apropriados para a identificação de fungos filamentosos.

A identificação destes fungos por testes fenotípicos, apesar de simples e de baixo custo, não é feita na maioria dos laboratórios de rotina devido à escassez de profissionais treinados para este fim.

Na presente investigação, foram realizados testes fenotípicos (que se baseiam principalmente na observação das características morfológicas dos fungos) e genotípicos.

As principais limitações dos testes fenotípicos são que, um mesmo fungo, pode apresentar-se de cor e aspectos distintos quando cultivados em diferentes meios de cultura ou sob diferentes condições de incubação (LACAZ, *et al.*, 2002).

Outra limitação, é que com o microscópio óptico comum, nem sempre é possível a visualização do arranjo das fiáldes em cima da vesícula e muitas

estruturas são similares entre as espécies de uma mesma seção. Devido a esta dificuldade, somente 3 diferentes seções foram identificadas por meio das características macro e micromorfológicas: **seção nigri**, **seção fumigati** e **seção flavi**. No presente estudo, somente quatro isolados com características do gênero *Aspergillus* não puderam ser identificados pelas características morfológicas e foram, nesta fase, classificados como *Aspergillus* sp.

Apesar de isolados de *Aspergillus* pertencente à seção nigri terem sido isolados em maior número (n=147) em nosso estudo, destaca-se, pela importância clínica, o grande número *Aspergillus* (n=65) isolados do ar ambiente de enfermaria de onco hematologia pertencente a seção fumigati.

A presença de *Aspergillus fumigatus* na unidade de onco-hematologia é preocupante pois esta é a causa mais comum de infecções invasivas causadas por *Aspergillus*. Outra espécies também isoladas em nosso estudo, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger* também causam aspergilose invasiva (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020; LAMOTH, 2016).

Com a técnica de PCR e sequenciamento foi possível identificar 52,8% *Aspergillus* isolados neste estudo a nível de espécie. Descreve-se aqui dezenove espécies de *Aspergillus* pertencentes a 5 diferentes seções [*Aspergillus* seção nigri (n=29), seção fumigati (n=66); seção flavi (34), seção terrei (1) e seção circumdati (1)], diferente das técnicas fenotípicas que identificaram apenas 3 seções.

Apesar disto, observou-se uma boa identificação das seções feitas por meio das características fenotípicas (macro e micromorfologia) com a identificação genotípica de patógenos como *Aspergillus* pertencentes a seção **fumigati** (65/66), **seção flavi** (34/34) e **seção nigri** (29/29). Este resultado, mostra um microbiologista com habilidade em diferenciar estruturas fúngicas pode ser de grande valia na identificação de patógenos fúngicos no laboratório de rotina do hospital.

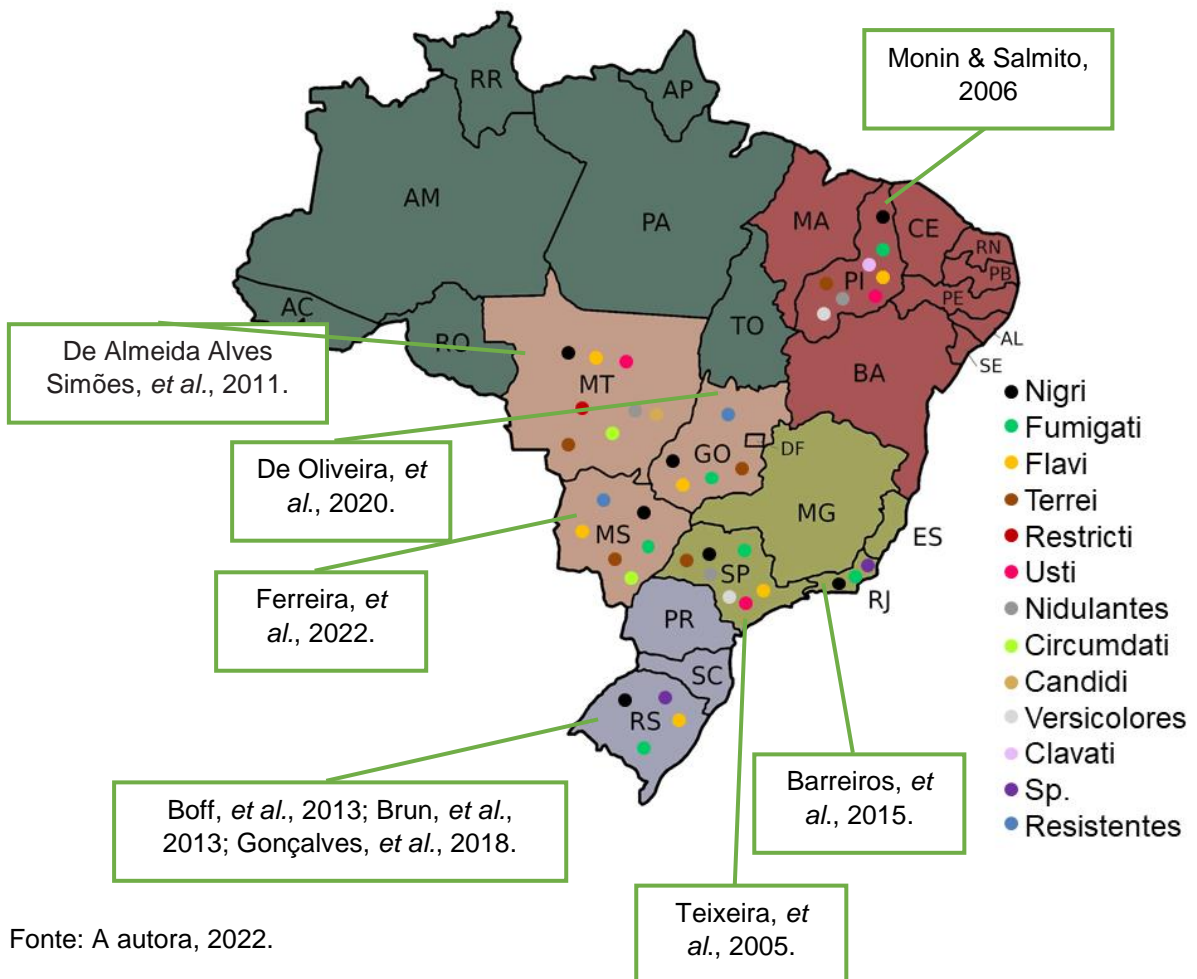
Similar ao encontrado em outros estudos (CURTIS, *et al.*, 2005) as cinco espécies de *Aspergillus* mais prevalentes isoladas dentro do hospital) foram *A. fumigatus* (66; 50%), *A. flavus* (14; 10,6%), *A. niger* (11; 8,3%), *A. tubingensis* (6; 4,5%) e *A. parasiticus* (5; 3,8%).

Estudo realizado por Barreiros e colaboradores (2015), no Rio de Janeiro, identificou a seção nigri como mais prevalente (29%), seguida pela seção fumigati.

Todavia, em São Paulo a seção mais encontrada foi a fumigati (50%), e as seções nigri e flavi apresentaram uma quantidade semelhante: (19,5%) e (18%), respectivamente (REICHERT-LIMA, 2018).

Na figura 12 pode-se observar a distribuição de isolados de *A. fumigatus* resistentes no Brasil, e a diversidade de *Aspergillus* no país provenientes do ar de ambiente hospitalar.

Figura 12 – *Aspergillus fumigatus* resistentes e distribuição da diversidade do gênero *Aspergillus* provenientes do microbioma hospitalar no Brasil.



Os resultados obtidos mostram que as técnicas moleculares utilizadas são excelentes ferramentas para a identificação de *Aspergillus* ao nível de espécie, (as quais as análises fenotípicas não conseguem identificar) e, são úteis em estudos

epidemiológicos (ARASTEHFAR, *et al.*, 2021; BARTON, 2013).

Entretanto, os métodos moleculares não são acessíveis para laboratórios de rotina hospitalar possuem custo muito elevado para a maioria das instituições públicas de países em desenvolvimento. Por isso, esses recursos ficam limitados a pesquisadores e centros de referência, sendo ainda necessário treinar microbiologistas para identificar adequadamente fungos filamentosos (LACAZ, *et al.*, 2002; PONTES, 2018).

O conhecimento do perfil regional de suscetibilidade antifúngica se faz importante tendo em vista que a resistência antimicrobiana pode refletir nos isolados humanos que também varia de um hospital para outro e dificulta o tratamento.

Embora haja tratamentos eficazes, tais micoses possuem alta morbimortalidade (NUCCI, *et al.*, 2010). A cada ano, um milhão e meio de pessoas vão a óbito em todo mundo em decorrência de micoses, sendo o gênero *Aspergillus* o maior causador de infecção sistêmica, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (BONGOMIN, *et al.*, 2017).

No presente estudo, foi avaliada a suscetibilidade antifúngica de 66 isolados identificados como *Aspergillus fumigatus*. Esta espécie é a de maior importância, visto que é a mais envolvida em casos de aspergilose (LAMOTH, 2016).

A. fumigatus isolados de ambiente resistentes aos azoles têm sido identificados mundialmente. Há registro de cepas resistentes em todos os continentes, exceto na Antártica, sendo a maior prevalência na Europa (56,7%), seguida pelo Oriente Médio (12,3%), Ásia Leste (10,4%), África (6,3%), América do Sul (5,4%), Índia (4,9%), e América do Norte (3,9%). O substrato que mais apresenta isolados resistentes aos azoles é o solo, seguido pelo ar (BURKS, *et al.*, 2021; GONZALEZ-JIMENEZ, *et al.*, 2021).

No Brasil há poucos dados de resistência de *Aspergillus* isolados de pacientes e do ambiente (DE OLIVEIRA, 2020). Testes de suscetibilidade para fungos filamentosos como *Aspergillus*, não são comuns em rotinas laboratoriais mesmo havendo casos de resistência aos azólicos de isolados clínicos.

Neste estudo pioneiro no estado do Mato Grosso do Sul, isolamos 3 amostras ambientais (4,5%) de *Aspergillus* resistentes a azoles. Uma amostra (1,5%) foi isolada

no quarto (459) e duas (3%) nos banheiros (465 e 466) da enfermaria. O isolado do quarto apresentou resistência ao posaconazol (18 AF), enquanto um isolado do banheiro se mostrou resistente ao voriconazol (62 AF), e o outro (1 SP) a ambos os medicamentos. Embora o número de *Aspergillus fumigatus* resistentes aos azoles ser pequeno, recomenda-se medidas de prevenção de infecção no setor pela CCIH, de modo a evitar a exposição dos pacientes a esses patógenos oportunistas.

Em nosso estudo, não foi detectada resistência à anfotericina B em *A. fumigatus* isolados do ar ambiente. No entanto, a resistência a esse polieno já foi descrita em dois hospitais de Goiás, outro estado da região Centro-Oeste do Brasil. De Oliveira *et al.* (2020) identificaram 20 *Aspergillus* no hospital 1 e 6 *Aspergillus* no hospital 2, sendo 50% e 100% resistentes à anfotericina B, respectivamente.

No Brasil foram descritas amostras de *A. fumigatus* resistentes no Rio Grande do Sul, de 20 isolados de ambiente agrícola, 25% eram resistentes ao itraconazol e 5% ao posaconazol. Todos foram sensíveis ao voriconazol (DENARDI, *et al.*, 2018).

Burks e colaboradores (2021) fez uma revisão, na qual 52 estudos independentes avaliaram 1.292 isolados ambientais resistentes, e descreveu que mais da metade das amostras foram coletadas em ambientes como jardins com flores e hospitais, enquanto apenas 35,6% eram provenientes de ambientes agrícolas.

Em consequência do crescimento de isolados resistentes aos antifúngicos azólicos é importante ter alternativas para o tratamento, como a anfotericina B e as equinocandinas. Estes agentes também podem ser ineficazes, fazendo com que haja poucas ou nenhuma opção terapêutica, logo, é importante estabelecer estratégias de controle ambiental e desenvolver novos compostos ou combinações de fármacos (REICHERT-LIMA, 2018).

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da biodiversidade fúngica hospitalar no Brasil e fornece subsídios para a implementação de medidas de controle de contaminação fúngica pelo ar em enfermaria onde se encontram pacientes com elevado risco para aspergilose invasiva.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo nos permitem concluir que:

No hospital terciário de referência que atende a população de todo Mato Grosso do Sul foi possível identificar a presença de fungos contaminantes do ar, inclusive os pertencentes ao gênero *Aspergillus*, que podem ser fontes de aspergilose em pacientes neutropênicos.

Por meio das características morfológicas macro e microscópicas a identificação das espécies do gênero se torna complexa, por apresentarem características não distinguíveis, sendo necessário utilizar métodos moleculares. Foi realizada a extração, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético e foram identificadas isolados pertencentes a 5 seções diferentes.

O teste de suscetibilidade in vitro foi realizado, pela técnica de microdiluição em caldo e a maioria de *Aspergillus fumigatus* isolados (63) são sensíveis aos antifúngicos azoles e a anfotericina B. Entretanto, já se observa a emergência de *A. fumigatus* (n=3) resistentes aos azoles (um ao posaconazol, um ao voriconazol e um a ambos os antifúngicos).

É necessário realizar um monitoramento maior para conhecer a sazonalidade e também obter amostras clínicas de pacientes para saber se a contaminação ambiental está relacionada com casos de aspergilose no hospital.

REFERÊNCIAS

- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. *et al.* Treatment of chronic pulmonary aspergillosis: current standards and future perspectives. **Respiration**, v. 96, n. 2, p. 159-170, 2018.
- AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual review of phytopathology**, v. 49, p. 107-133, 2011.
- ARASTEHFAR, A. *et al.* COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA)—from immunology to treatment. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 91, 2020.
- ARASTEHFAR, A. *et al.* *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. **Studies in Mycology**, v. 100, p. 100115, 2021.
- BAFADHEL, M. *et al.* *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. **European Respiratory Journal**, v. 43, n. 1, p. 64-71, 2014.
- BALAJEE, S. A. *et al.* Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3138-3141, 2009.
- BARAC, A. *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis update: A year in review. **Medical mycology**, v. 57, n. Supplement_2, p. S104-S109, 2019.
- BARREIROS, G. *et al.* Effect of the implosion and demolition of a hospital building on the concentration of fungi in the air. **Mycoses**, v. 58, n. 12, p. 707-713, 2015.
- BARTON, R. C. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. **Scientifica**, v. 2013, 2013.
- BASSETTI, M.; BOUZA, E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. suppl_1, p. i39-i47, 2017.
- BELLANGER, A. P. *et al.* Fungal aerocontamination exposure risk for patients in 3 successive locations of a pediatric hematology unit department: Influence of air equipment and building structure on air quality. **American journal of infection control**, v. 45, n. 10, p. e109-e113, 2017.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. **Aspergillus: molecular biology and genomics**, p. 1-17, 2010.
- BERAQUET, C. A. G. *et al.* Triagem de resistência de isolados de *Aspergillus fumigatus* frente a anfotericina B e equinocandinas e avaliação de combinações de antifúngicos para isolados resistentes. 2020.
- BOFF, C. *et al.* The indoor air as a potential determinant of the frequency of invasive aspergillosis in the intensive care. **Mycoses**, v. 56, n. 5, p. 527-531, 2013.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BRAKHAGE, A. A. Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. **Current drug targets**, v. 6, n. 8, p. 875-886, 2005.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020a. 9.3.2. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Disponível em: https://www.eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/ast_of_moulds/. Acesso em: 11 fev. 2021.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020b. 10.0. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents. Disponível em: <https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>. Acesso em: 25 fev. 2021.

BRUN, C. P. *et al.* Fungal spore concentrations in two haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) units containing distinct air control systems. **Epidemiology & Infection**, v. 141, n. 4, p. 875-879, 2013.

BUIL, J. B. *et al.* Genetic and Phenotypic Characterization of in-Host Developed Azole-Resistant *Aspergillus flavus* Isolates. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 164, 2021.

BURKS, C. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment: Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 7, p. e1009711, 2021.

CADENA, J.; THOMPSON, G. R.; PATTERSON, T. F. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 415-434, 2021.

CEMTEC, Centro de Monitoramento do Tempo e do Clima de MS. Disponível em: <https://www.cemtec.ms.gov.br/boletins-meteorologicos/>. Acesso em 09 de jan. 2022.

CHABI, M. L. *et al.* Pulmonary aspergillosis. Diagnostic and interventional imaging, v. 96, n. 5, p. 435-442, 2015.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Invasive aspergillosis in developing countries. **Medical mycology**, v. 49, n. Supplement_1, p. S35-S47, 2011.

CHEN, Y. C. *et al.* Azole resistance in *Aspergillus* species in Southern Taiwan: An epidemiological surveillance study. **Mycoses**, v. 62, n. 12, p. 1174-1181, 2019.

CHO, S. Y. *et al.* Characteristics of culture-positive invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. Comparison between *Aspergillus fumigatus* and non-fumigatus *Aspergillus* species. **Medicine**, v. 96, n. 49, dez. 2017.

CHO, S. Y. *et al.* Profiles of environmental mold: indoor and outdoor air sampling in a hematology hospital in Seoul, South Korea. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 11, p. 2560, 2018.

CHO, S. Y. *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibility profile of *Aspergillus* species: comparison between environmental and clinical isolates from patients with hematologic malignancies. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 7, p. e02023-18, 2019.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. Azole-resistant aspergillosis: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_3, p. S436-S444, 2017.

CURTIS, L. *et al.* *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 3, p. 188-196, 2005.

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.

DASBACH, E. J.; DAVIES, G. M.; TEUTSCH, S. M. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 1524-1528, 2000.

DA SILVA AQUINO, I. *et al.* Evaluation of disinfectants for elimination of fungal contamination of patient beds in a reference hospital in Piauí, Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 11, p. 1-4, 2016.

DE ALMEIDA, Z. G.; FARIAS, L. R. Epidemiological investigations of principal nosocomial infections in Brazil and identification of pathogens responsible: a bibliographic approach. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 49-53, 2014.

DE ALMEIDA ALVES SIMÕES, Sara; JÚNIOR, Diniz Pereira Leite; HAHN, Rosane Christine. Fungal microbiota in air-conditioning installed in both adult and neonatal intensive treatment units and their impact in two university hospitals of the central western region, Mato Grosso, Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 109-116, 2011.

DE OLIVEIRA, M. T. *et al.* Risks associated with pathogenic fungi isolated from surgical centers, intensive care units, and materials sterilization center in hospitals. Risks associated with pathogenic fungi isolated from critical hospital areas. **Medical mycology**, v. 58, n. 7, p. 881-886, 2020.

DENARDI, L. B. *et al.* In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 30-36, 2018.

DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clinical infectious diseases**, p. 781-803, 1998.

DENNING, D. W.; PLEUVRY, A.; COLE, D. C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 89, p. 864-872, 2011.

DENNING, D. W.; PLEUVRY, A.; COLE, D. C. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. **European Respiratory Journal**, v. 41, n. 3, p. 621-626, 2013.

DE PAUW, B. *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 12, p. 1813-1821, 2008.

DOĞAN, Ö. *et al.* Phenotypic and Genotypic Evaluation of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates from Clinical and Environmental Specimens. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 54, n. 2, p. 291-305, 2020.

DÜMIG, M. *et al.* The infectious propagules of *Aspergillus fumigatus* are coated with antimicrobial peptides. **Cellular Microbiology**, p. e13301, 2020.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Method-dependent epidemiological cutoff values for detection of triazole resistance in *Candida* and *Aspergillus* species for the Sensititre YeastOne colorimetric broth and Etest agar diffusion methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 1, 2019.

Etymologia: *Aspergillus*, 2006. **Emerging Infectious Diseases**. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/3/et-1203_article. Acesso em 25 de jun. 2021.

FALVEY, D. G.; STREIFEL, A. J. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. **Journal of Hospital Infection**, v. 67, n. 1, p. 35-41, 2007.

FELTON, I. C.; SIMMONDS, N. J. *Aspergillus* and cystic fibrosis: old disease—new classifications. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 20, n. 6, p. 632-638, 2014.

FERNÁNDEZ, M. *et al.* Especies de *Aspergillus* en ambientes hospitalarios con pacientes pediátricos en estado crítico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 3, p. 176-181, 2014.

FUTAGAMI, T. *et al.* Genome sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit shochu. 2011.

GAUTIER, M.; NORMAND, A. C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical microbiology and infection**, v. 22, n. 8, p. 662-669, 2016.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

- GHEITH, S. *et al.* Hospital environment fungal contamination and aspergillosis risk in acute leukaemia patients in Sousse (Tunisia). **Mycoses**, v. 58, n. 6, p. 337-342, 2015.
- GIBBONS, J. G. *et al.* The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Current Biology**, v. 22, n. 15, p. 1403-1409, 2012.
- GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 1, p. 14-22, 2013.
- GONÇALVES, C. L. *et al.* Airborne fungi in an intensive care unit. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 265-270, 2018.
- GONZALEZ-JIMENEZ, I. *et al.* Hospital Environment as a Source of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains with TR34/L98H and G448S Cyp51A Mutations. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 22, 2021.
- GUNARATNE, P. S.; WIJEYARATNE, C. N.; SENEVIRATNE, H. R. *Aspergillus* meningitis in Sri Lanka—a post-tsunami effect?. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 7, p. 754-756, 2007.
- HADRICH, I. *et al.* Invasive aspergillosis: epidemiology and environmental study in haematology patients (Sfax, Tunisia). **Mycoses**, v. 53, n. 5, p. 443-447, 2010.
- HAHN, T. *et al.* Efficacy of high-efficiency particulate air filtration in preventing aspergillosis in immunocompromised patients with hematologic malignancies. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 23, n. 9, p. 525-531, 2002.
- HENRY, T.; IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1510-1515, 2000.
- HONG, S. B. *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1316-1329, 2005.
- HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in applied microbiology**, v. 86, p. 199-249, 2014.
- HOUBRAKEN, J. *et al.* Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v. 95, p. 5-169, 2020.
- KANJ, A.; ABDALLAH, N.; SOUBANI, A. O. The spectrum of pulmonary aspergillosis. **Respiratory medicine**, v. 141, p. 121-131, 2018.
- KOEHLER, P. *et al.* Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020.

KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Thorax**, v. 70, n. 3, p. 270-277, 2015.

KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 74, p. 1-29, 2013.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 12, p. e1003743, 2013.

LACAZ, C. da S. *et al.* Tratado de micologia médica. 2002.

LAMOTH, F. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 683, 2016.

LATGÉ, J. P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, 2019.

LEDOUX, M. P. *et al.* Invasive pulmonary aspergillosis. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, p. 080-098, 2020.

LOEFFERT, S. T. *et al.* Monitoring of clinical strains and environmental fungal aerocontamination to prevent invasive aspergillosis infections in hospital during large deconstruction work: a protocol study. **BMJ open**, v. 7, n. 11, p. e018109, 2017.

MACHADO, M. *et al.* Invasive pulmonary aspergillosis in the COVID-19 era: An expected new entity. **Mycoses**, v. 64, n. 2, p. 132-143, 2021.

MARTÍNEZ-HERRERA, E. O. *et al.* Fungal diversity and *Aspergillus* in hospital environments. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 23, n. 2, 2016.

MEHEUST, D. *et al.* Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 248-260, 2014.

MEIS, J. F. *et al.* Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150460, 2016.

MEENA, D. S. *et al.* Clinical manifestations, diagnosis, and treatment outcome of CNS aspergillosis: A systematic review of 235 cases. **Infectious diseases now**, v. 51, n. 8, p. 654-660, 2021.

MERAD, Y. *et al.* *Aspergillus* Genus and Its Various Human Superficial and Cutaneous Features. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 643, 2021.

MESQUITA-ROCHA, S. *Aspergillus fumigatus*: aspectos gerais e importância na medicina contemporânea. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 37, n. 2, p. 169-173.2019, 2019.

MOBIN, M.; SALMITO, M. A. Fungus microbiota in air conditioners in intensive care units in Teresina, Piauí. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 556-559, 2006.

MONTEIRO, C. *et al.* *Aspergillus* species collected from environmental air samples in Portugal—Molecular identification, antifungal susceptibility and sequencing of *cyp51A* gene on *A. fumigatus* sensu stricto itraconazole resistant. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 4, p. 1140-1148, 2019.

MONTEIRO, O. M. C. *et al.* A Rare Case of *Aspergillus* Mediastinitis After Coronary Artery Bypass Surgery: A Case Report and Literature Review. **The American Journal of Case Reports**, v. 22, p. e933193-1, 2021.

MULDOON, E. G.; STREK, M. E.; PATTERSON, K. C. Allergic and noninvasive infectious pulmonary aspergillosis syndromes. **Clinics in chest medicine**, v. 38, n. 3, p. 521-534, 2017.

NEGRI, C. E. *et al.* Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3633-3640, 2014.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

O'GORMAN, C. M. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. **Fungal biology reviews**, v. 25, n. 3, p. 151-157, 2011.

PARENT-MICHAUD, M. *et al.* Prevalence and mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* species in a Canadian tertiary care centre, 2000 to 2013. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 4, p. 849-858, 2020.

PATTERSON, T. F. *et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. e1-e60, 2016.

PAULUSSEN, C. *et al.* Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017.

PEL, H. J. *et al.* Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology*, v. 25, n. 2, p. 221-231, 2007.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement_1, p. S3-S14, 2006.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

PFEIFFER, C. D.; FINE, J. P.; SAFDAR, N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 10, p. 1417-1727, 2006.

PONTES, L. Vigilância de resistência frente a antifúngicos azólicos de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus*. 2018.

PONTES, L. *et al.* *Aspergillus fumigatus* clinical isolates carrying CYP51A with TR34/L98H/S297T/F495I substitutions detected after four-year retrospective azole resistance screening in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. e02059-19, 2020.

RAKSHA, G. S.; URHEKAR, A. D. Virulence factors detection in *Aspergillus* isolates from clinical and environmental samples. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 11, n. 7, p. DC13, 2017.

REICHERT-LIMA, F. *et al.* Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, v. 61, n. 6, p. 360-365, 2018.

REICHERT-LIMA, F. Avaliação de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp.: caracterização morfológica e molecular de espécies, perfil de suscetibilidade e busca por mutações relacionadas à resistência aos antifúngicos azólicos. 2018.

RESENDIZ-SHARPE, A. *et al.* Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. **Medical mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S83-S92, 2018.

RESENDIZ-SHARPE, A. *et al.* Triazole-Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* in Latin American and African Countries. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 292, 2021.

RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservation of fungi and actinomycetes in distilled water. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 159-165, 1992.

ROKAS, A.; GALAGAN, J. E. ***Aspergillus nidulans* genome and a comparative analysis of genome evolution in *Aspergillus***. Taylor & Francis, Boca Raton, 2008.

RUDRAMURTHY, S. M. *et al.* Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 55, 2019.

RUSSO, A. *et al.* Pulmonary aspergillosis: an evolving challenge for diagnosis and treatment. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 9, n. 3, p. 511-524, 2020.

SABINO, R. *et al.* Trends on *Aspergillus* Epidemiology—Perspectives from a National Reference Laboratory Surveillance Program. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 28, 2021.

SALAH, H. *et al.* The emergence of rare clinical *Aspergillus* species in Qatar: Molecular characterization and antifungal susceptibility profiles. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1677, 2019.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SÁNCHEZ ESPINOSA, K. C. *et al.* Phylogenetic Identification, Diversity, and Richness of *Aspergillus* from Homes in Havana, Cuba. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 115, 2021.

SATO, A. *et al.* Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239. **DNA research**, v. 18, n. 3, p. 165-176, 2011.

SCHMIEDEL, Y.; ZIMMERLI, S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. **Swiss medical weekly**, v. 146, p. w14281, 2016.

SHARMA, C. *et al.* Genomic perspective of triazole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates without cyp51A mutations. **Fungal genetics and biology**, v. 132, p. 103265, 2019.

SONG, G.; LIANG, G.; LIU, W. Fungal co-infections associated with global COVID-19 pandemic: a clinical and diagnostic perspective from China. **Mycopathologia**, v. 185, n. 4, p. 599-606, 2020.

STEINBACH, W. J. Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 9, p. 1321-1327, 2010.

STEINBACH, W. J. *et al.* Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. **Journal of Infection**, v. 65, n. 5, p. 453-464, 2012.

STEVENS, D. A. *et al.* Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. **Clinical Infectious Diseases**, p. 696-709, 2000.

STEVENSON, A. *et al.* Is there a common water-activity limit for the three domains of life?. **The ISME journal**, v. 9, n. 6, p. 1333-1351, 2015.

SU, H. *et al.* Potency of olorofim (F901318) compared to contemporary antifungal agents against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates, and review of azole resistance phenotype and genotype epidemiology in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2021.

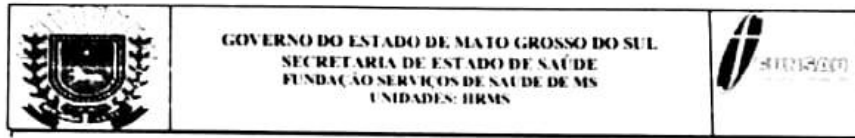
SUGUI, J. A. *et al.* *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 2, p. a019786, 2014.

- TACCONE, F. S. *et al.* Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 7, 2015.
- TATTEVIN, P.; JAUREGUIBERRY, S.; GANGNEUX, J. P. Cerebral aspergillosis. **Revue Neurologique**, v. 160, n. 5 Pt 1, p. 597-605, 2004.
- TEIXEIRA, A. B. A. *et al.* Antifungal susceptibility and pathogenic potential of environmental isolated filamentous fungi compared with colonizing agents in immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 160, n. 2, p. 129-135, 2005.
- TIEW, P. Y. *et al.* A high-risk airway mycobiome is associated with frequent exacerbation and mortality in COPD. **European Respiratory Journal**, v. 57, n. 3, 2021.
- THIO, C. L. *et al.* Refinements of environmental assessment during an outbreak investigation of invasive aspergillosis in a leukemia and bone marrow transplant unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 1, p. 18-23, 2000.
- ULLMANN, A. J. *et al.* Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, p. e1-e38, 2018.
- VAN DER TORRE, M. H. *et al.* Molecular Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* in Chronic Pulmonary Aspergillosis Patients. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 152, 2021.
- VAZQUEZ, J. A. *et al.* The changing epidemiology of invasive aspergillosis in the non-traditional host: risk factors and outcomes. **Steroids**, v. 25, n. 20, p. 5, 2016.
- WALSH, T. J. *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 3, p. 327-360, 2008.
- WALSH, T. J.; HAYDEN, R. T.; LARONE, D. H. **Larone's medically important fungi: A guide to identification**. John Wiley & Sons, 2018.
- WARRIS, A. The biology of pulmonary *Aspergillus* infections. **Journal of Infection**, v. 69, p. S36-S41, 2014.
- WHITE, P. L. *et al.* *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1231-1240, 2010.
- WYATT, T. T. *et al.* A decrease in bulk water and mannitol and accumulation of trehalose and trehalose-based oligosaccharides define a two-stage maturation process towards extreme stress resistance in ascospores of *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*). **Environmental microbiology**, v. 17, n. 2, p. 383-394, 2015a.
- WYATT, T. T. *et al.* Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *Neosartorya fischeri*

(*Aspergillus fischeri*) and other fungi. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 395-411, 2015b.

ZHU, X. *et al.* Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. **Virus Research**, v. 285, p. 198005, 2020.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital



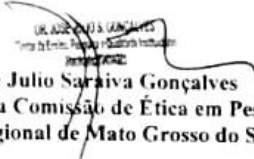
AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA - Nr. 06/2018

A Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, declara estar informada da metodologia que será desenvolvida no projeto de pesquisa intitulado "ASPERGILOSE INVASIVA: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E ESTUDO AMBIENTAL EM ENFERMARIA DE ONCOLOGIA-HEMATOLOGIA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE MATO GROSSO DO SUL", coordenado pela Professora Dra Marilene Rodrigues Chang a ser realizado no período de 2018 a 2020, a partir da sua aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS.

A Diretoria de Ensino e Pesquisa autoriza a coordenadora e demais pesquisadores o acesso aos prontuários dos pacientes envolvidos na pesquisa conforme normas de Funcionamento do Setor de Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME).

Ciente de que sua metodologia será desenvolvida conforme preconiza a resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012 e demais resoluções complementares. Autorizo a realização da pesquisa nesta instituição.

Campo Grande, MS 31 de Janeiro de 2018.


Dr. José Julio Saraiva Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa
Hospital Regional de Mato Grosso do Sul

Fundação Serviços de Saúde MS/HRMS
Rua Engenheiro Lutero Lopes, 36-Aero Rancho
Campo Grande-MS

APÊNDICE A – Dados dos testes de suscetibilidade dos antifúngicos (Itraconazol, Posaconazol, Voriconazol e Anfotericina B para os 66 isolados de *A. fumigatus*.

Dados dos isolados			Itraconazol		Posaconazol		Voriconazol		Anfotericina B	
Data	Amostra		ITC	MIC	PSC	MIC	VRC	MIC	AMB	MIC
23/08/2019	456 B3	1AF	S	0,06	S	0,015	S	0,12	S	0,25
	457 Q2	2AF	S	0,06	S	0,03	S	0,06	S	0,25
	462 B2	3AF	S	0,06	S	0,015	S	0,03	S	0,25
30/08/2019	453 B1	4AF	S	0,12	S	0,015	S	0,06	S	0,25
	461 Q1	5AF	S	0,06	S	0,015	S	0,03	S	0,5
	465 B3	6AF	S	0,06	S	0,015	S	0,06	S	0,25
06/09/2019	452 B3	7AF	S	0,5	S	0,06	S	0,5	S	0,5
	454 Q1	8AF	S	0,03	S	0,03	S	0,12	S	0,5
	460 B3	9AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,5
13/09/2019	452 B2	10AF	S	0,03	S	0,015	S	0,12	S	0,5
	457 Q1	11AF	S	0,25	S	0,03	S	0,12	S	0,5
	460 B2	12AF	S	0,25	S	0,03	S	0,12	S	0,5
	461 Q1	13AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25
	461 B2	14AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25
20/09/2019	458 Q3	15AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,25
	458 B2	16AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,25
11/10/2019	452 Q1	17AF	S	0,5	S	0,12	S	0,5	S	0,25
	457 Q1	18AF	S	0,5	R	0,5	S	1	S	1
	459 Q1	19AF	S	1	S	0,12	S	0,5	S	0,25
18/10/2019	452 B1	20AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,25
	453 B4	21AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25
	457 B1	22AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25
	458 Q3	23AF	S	0,5	ATU	0,25	S	1	S	1
	460 Q1	24AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,25
	460 B2	25AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,5
	462 Q3	26AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25
25/10/2019	454 Q2	27AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25
	455 B1	28AF	S	0,5	S	0,12	S	0,5	S	0,25
	463 Q1	29AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,25
	466 Q2	30AF	S	0,25	S	0,06	S	1	S	1
01/11/2019	462 Q1	31AF	S	0,5	S	0,12	S	0,5	S	0,25
08/11/2019	451 Q1	32AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,25
	456 Q1	33AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25
	466 Q1	34AF	S	0,5	S	0,12	S	0,5	S	1
22/11/2019	457 Q2	35AF	S	0,5	S	0,06	S	1	S	0,5
29/11/2019	453 Q1	36AF	S	0,25	ATU	0,25	S	0,5	S	1
	455 Q1	37AF	S	0,5	S	0,06	S	1	S	0,5
06/12/2019	452 B1	38AF	S	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,06
	453 B1	39AF	S	0,5	S	0,12	S	1	S	1
	457 Q1	40AF	S	0,25	S	0,12	S	1	S	1
	458 B1	41AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,5
13/12/2019	462 Q1	42AF	S	0,25	S	0,12	S	0,25	S	0,12
	465 B3	43AF	S	0,5	S	0,12	S	1	S	0,25
27/12/2019	460 Q1	44AF	S	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,12
	462 B2	45AF	S	0,25	S	0,03	S	1	S	0,12
10/01/2020	456 Q1	46AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	1
17/01/2020	457 B1	47AF	S	0,25	S	0,12	S	1	S	0,25
	460 Q2	48AF	S	0,5	S	0,12	S	1	S	0,25
	460 B1	49AF	S	1	S	0,12	S	1	S	1
	466 B1	50AF	S	1	S	0,12	S	1	S	1
24/01/2020	455 Q1	51AF	S	0,12	S	0,06	S	0,5	S	0,5
	460 B1	52AF	S	0,25	S	0,06	S	1	S	0,12

31/01/2020	451 B1	53AF	S	1	S	0,06	S	0,5	S	1
	454 Q1	54AF	S	1	S	0,12	S	0,5	S	1
	455 B1	55AF	S	0,25	ATU	0,25	S	1	S	0,5
	456 B1	56AF	S	0,25	ATU	0,25	S	0,5	S	1
07/02/2020	451 B4	57AF	S	0,25	ATU	0,25	S	1	S	1
	457 B3	58AF	S	0,25	S	0,12	S	0,5	S	1
	459 Q4	59AF	S	0,5	ATU	0,25	S	1	S	1
	463 Q1	60AF	S	0,25	ATU	0,25	S	0,5	S	0,5
	464 B4	61AF	S	0,5	ATU	0,25	S	1	S	1
	465 B1	62AF	S	0,25	ATU	0,25	R	2	S	1
	466 B3	63AF	S	0,25	S	0,12	S	1	S	1
14/02/2020	464 B2	64AF	S	0,25	S	0,12	S	1	S	1
21/02/2020	456 B2	65AF	S	0,25	S	0,12	S	1	S	1
28/02/2020	465 Q1	1SP	S	0,25	R	1	R	2	S	0,12

*ATU: Área de incerteza técnica.

APÊNDICE B – Dados do sequenciamento de DNA de 132 isolados.

Dados dos isolados		Sequenciamento							
		β-tubulina				Calmodulina			
Data	Amostra	Espécie	Query	Ident	Acesso	Espécie	Query	Ident	Acesso
23/08/2019	456 B3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MT196113.1				
	457 Q1	<i>Aspergillus sojae</i>	100	99,26	HQ285598.1				
	457 Q2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	458 Q1	<i>Aspergillus tamaraii</i>	99	100	JX489771.1	<i>Aspergillus tamaraii</i>	99	99,62	MK451527.1
	459 B1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	99,81	HQ632716.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	97,2	KX231824.1
	462 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MT196114.1				
30/08/2019	453 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	KF434079.1				
	453 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	100	MH536090.1				
	461 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MT196113.1				
	462 B2	<i>Aspergillus parasiticus</i>	99	99,08	L49386.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	99	99,02	MK451480.1
	464 Q3	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	100	HQ632719.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	99,6	KX664477.1
	465 B3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
06/09/2019	451 B6	<i>Aspergillus arachidicola</i>	100	99,45	KJ767720.1				
	452 B3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MN637722.1				
	453 Q1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	99,08	L49386.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	99,14	LR584230.1
	454 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MT196113.1				
	455 Q2	<i>Aspergillus arachidicola</i>	100	99,45	KJ767720.1				
	456 Q1	<i>Aspergillus niger</i>	100	99,82	KM189806.1	<i>Aspergillus niger</i>	99	99,6	KX231826.1

	456 Q2	<i>Aspergillus arachidicola</i>	100	99,45	KJ767720.1				
	458 Q2	<i>Aspergillus tamarii</i>	100	99,81	KU353729.1	<i>Aspergillus tamarii</i>	99	99,83	MK304477.1
	460 B3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,79	MN637722.1				
	462 Q3	<i>Aspergillus parasiticus</i>	99	99,07	L49386.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	99,12	LR584230.1
13/09/2019	451 B3	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	KX462752.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,17	MK304465.1
	452 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	452 B6	<i>Aspergillus sojae</i>	100	99,06	HQ285598.1				
	457 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MT196114.1				
	457 Q4	<i>Aspergillus sojae</i>	100	99,09	HQ285598.1	<i>Aspergillus sojae</i>	98	99,14	LR584230.1
	459 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,79	MN148876.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,66	MN986409.1
	459 B1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	99,46	KT326813.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	98,6	KX769863.1
	460 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	460 B8	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	98,71	L49386.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	98,9	LR584230.1
	461 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	461 B1	<i>Aspergillus arachidicola</i>	100	99,45	KJ767720.1				
	461 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
20/09/2019	458 Q3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	458 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	KJ175506.1				
11/10/2019	452 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	99,82	KJ175506.1				
	456 Q1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	99,82	KT326813.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	99,79	KX769863.1
	457 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	MH536090.1				

	458 B1	<i>Aspergillus flavus</i>	99	100	MN148824.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,6	MN986409.1
	459 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	KJ175506.1				
18/10/2019	452 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	453 B4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	457 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	458 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,81	MN148824.1				
	458 Q3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	KJ175506.1				
	460 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	MH536090.1				
	460 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,79	MT196114.1				
	461 Q1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	99,46	KT326813.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	99	98,88	KX769863.1
	462 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN148872.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN986409.1
	462 Q3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,47	KF669421.1				
	463 Q3	<i>Aspergillus nomiae</i>	100	99,63	MK373042.1	<i>Aspergillus nomiae</i>	100	99,81	MT764844.1
25/10/2019	454 Q2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,8	MT196114.1				
	455 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	KX462752.1	<i>Aspergillus flavus</i>	99	99,83	MK304465.1
	455 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,81	MN637722.1				
	460 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN148872.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN986409.1
	462 B1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	99,82	JX545082.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100	100	KX769863.1
	463 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,64	MH536090.1				
	466 Q2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
01/11/2019	462 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	99,61	MH536090.1				

08/11/2019	451 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	456 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	99,1	MH536090.1				
	466 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98	99,78	MH536090.1				
15/11/2019	456 B1	<i>Aspergillus neoniger</i>	99	98,74	LC573659.1	<i>Aspergillus neoniger</i>	100	96,1	MK451448.1
22/11/2019	457 Q2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	MH536090.1				
	458 B1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	KX462752.1				
	466 Q1	<i>Aspergillus nomiae</i>	100	99,81	MK373042.1	<i>Aspergillus nomiae</i>	100	99,76	MK119692.1
29/11/2019	451 Q1	<i>Aspergillus tamaraii</i>	100	99,82	JX489771.1	<i>Aspergillus tamaraii</i>	100	99,66	MK451527.1
	453 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	455 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	463 B1	<i>Aspergillus costaricensis</i>	98	100	MH614546.1	<i>Aspergillus costaricensis</i>	100	99,7	MH644994.1
06/12/2019	452 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH844690.1				
	453 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	457 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	458 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	MH536090.1				
	465 Q1	<i>Aspergillus nomiae</i>	100	99,81	MK373042.1	<i>Aspergillus nomiae</i>	99	100	MK119692.1
13/12/2019	460 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	KX462752.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,83	MK304465.1
	462 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	MN637722.1				
	463 Q2	<i>Aspergillus terreus</i>	100	94,41	MF185038.1	<i>Aspergillus terreus</i>	99	98,9	EU147530.1
	465 B1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN148872.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN986409.1
	465 B3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MN637722.1				

20/12/2019	451 Q1	<i>Aspergillus niger</i>	99	98,39	KF669400.1	<i>Aspergillus niger</i>	100	100	KX231826.1
27/12/2019	457 B1	<i>Aspergillus caelatus</i>	100	99,44	AY017539.1	<i>Aspergillus caelatus</i>	100	100	MK119725.1
	460 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	KJ175506.1				
	462 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	99,27	MH536090.1				
	463 B1	<i>Aspergillus niger</i>	99	100	HQ632726.1				
	466 B2	<i>Aspergillus kumbius</i>	99	98,43	MT184782.1	<i>Aspergillus kumbius</i>	100	97,9	MT184788.1
10/01/2020	453 Q1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	100	91,91	HQ632667.1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	99	93,87	LC573677.1
	456 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
17/01/2020	453 B1	<i>Aspergillus niger</i>	99	97,32	HQ632698.1				
	457 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	MH536090.1				
	460 Q2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	95	96,55	JX501424.1				
	461 Q1	<i>Aspergillus japonicus</i>	100	99,68	AY585543.1	<i>Aspergillus japonicus</i>	100	100	EU021690.1
	461 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,82	MH536090.1				
	462 Q1	<i>Aspergillus neoniger</i>	99	98,48	LC573659.1	<i>Aspergillus neoniger</i>	100	97,96	MK451448.1
	465 Q1	<i>Aspergillus terreus</i>	100	99,82	JQ897354.1	<i>Aspergillus terreus</i>	100	100	LT899598.1
	465 B1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	99,08	L49386.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	99,82	MK451480.1
	466 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	99,82	KJ175506.1				
24/01/2020	455 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	460 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				

31/01/2020	451 Q1					<i>Aspergillus brunneoviola ceous</i>	100	99,8	MW030650.1
	451 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	454 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,60	MN637722.1				
	455 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99	100	JX501424.1				
	456 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,02	MH536090.1				
	458 B1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN148872.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,83	MN986409.1
	459 B1	<i>Aspergillus niger</i>	100	100	KX231821.1	<i>Aspergillus niger</i>	100	100	MN619777.1
	463 B1	<i>Aspergillus neoniger</i>	100	99,27	LC573659.1	<i>Aspergillus neoniger</i>	99	97,9	MH644991.1
07/02/2020	451 Q1	<i>Aspergillus niger</i>	100	99,81	HQ632694.1	<i>Aspergillus niger</i>	99	98,30	KX231826.1
	451 B4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	98,94	KY565356.1				
	453 B1	<i>Aspergillus tamaraii</i>	100	100	KU353729.1	<i>Aspergillus tamaraii</i>	100	100	MK304477.1
	455 Q1	<i>Aspergillus vadensis</i>	97	100	MT261357.1	<i>Aspergillus vadensis</i>	100	100	MH644878.1
	457 B1	<i>Aspergillus niger</i>	100	99,45	KM189806.1	<i>Aspergillus niger</i>	99	99,8	JX024263.1
	457 B3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	99,47	KJ175506.1				
	458 Q1	<i>Aspergillus flavus</i>	100	100	MN148824.1				
	458 B2	<i>Aspergillus flavus</i>	100	99,81	MN148876.1				
	459 Q4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	460 Q1	<i>Aspergillus niger</i>	100	100	KM189806.1	<i>Aspergillus niger</i>	100	100	KX231826.1
	463 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MN637722.1				
	463 B2	<i>Aspergillus niger</i>	100	99,82	HQ632694.1	<i>Aspergillus niger</i>	100	98,29	KX231826.1
464 B4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1					

	465 B1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MN637722.1				
	466 B1	<i>Aspergillus niger</i>	99	99,46	HQ632702.1	<i>Aspergillus niger</i>	100	99,82	JX024263.1
	466 B3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
14/02/2020	455 Q1	<i>Aspergillus niger</i>	99	99,64	KF669400.1	<i>Aspergillus niger</i>	100	99,79	KX231826.1
	463 B1					<i>Aspergillus brunneoviola ceous</i>	98	100	MH645028.1
	464 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
21/02/2020	451 B1	<i>Aspergillus luchuensis</i>	100	99,82	LC573653.2	<i>Aspergillus luchuensis</i>	100	100	MK166177.1
	456 B2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				
	460 B1	<i>Aspergillus vadensis</i>	99	100	MT261357.1	<i>Aspergillus vadensis</i>	100	99,8	MH644878.1
28/02/2020	459 B1					<i>Aspergillus brunneoviola ceous</i>	99	99,47	MH645020.1
	465 Q1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	100	MH536090.1				