

MAYENE AMARAL ARCURI

Limitações do teste de triagem de susceptibilidade a antifúngicos azóis em isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus*

Campo Grande - MS

2026

MAYENE AMARAL ARCURI

Limitações do teste de triagem de susceptibilidade a antifúngicos azóis em isolados
ambientais de *Aspergillus fumigatus*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, sob
orientação do Dr. Wellington S. Fava.

Campo Grande - MS
2026

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, sem ele nada disso seria possível, agradeço por iluminar meu caminho durante toda esta jornada. A Nossa Senhora, que com seu manto sagrado me cobriu de proteção e intercedeu por mim nos momentos de dificuldade.

A minha mãe, Ana Cristina, por sempre me permitir sonhar e nunca me deixar desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por ter aberto mão de tantas coisas para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Ao meu orientador Doutor Wellington Santos Fava, pela tremenda paciência durante essa orientação, agradeço pelos ensinamentos valiosos e por acreditar no meu potencial, o senhor transformou esse período leve e proveitoso. Aos meus colegas do Labdip, por todas as ajudas, dicas, risadas, fofocas e conselhos.

A minha família, que sempre me deu todo suporte necessário para que eu pudesse conquistar meus objetivos, vocês transformaram esse caminho mais fácil.

Aos meus amigos Dani, Will, Angel, Gabi e Gi, que conheci no começo do curso e vou levar para vida, obrigada por cada risada, briga, fofoca, choros coletivos, surtos coletivos. Sem cada um de vocês nessa jornada maluca, eu não teria conseguido.

As minhas amigas e companheiras de Labdip, Luana e Sarah, por sempre estarem lá quando eu precisei, por além de calouras da faculdade, se transformaram em amigas para vida.

A minhas amigas que estão comigo desde a escola, Hellen e Mica, vocês são tão especiais na minha vida. Agradeço por mesmo depois de tantos anos, ainda poder contar com vocês e podermos comemorar a conquista de cada uma juntas.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos.”
(Provérbios 16:3)

Resumo

Os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados cosmopolitas e estão associados com aspergiloses, infecções que afetam sobretudo indivíduos imunocomprometidos, representando relevante desafio clínico e epidemiológico. O diagnóstico dessas infecções envolve fatores do hospedeiro, aspectos clínicos e laboratoriais, sendo o tratamento baseado no uso de antifúngicos triazólicos como voriconazol, itraconazol e posaconazol. O European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recomenda testes de triagem como ferramentas preliminares para identificar possível resistência fúngica, uma vez que o Teste de Suscetibilidade Antifúngica (TSA) exige insumos frequentemente indisponíveis. Diante disso, este estudo avaliou a concordância entre o teste de triagem padronizado pelo EUCAST e os resultados do TSA em 234 isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus*. Os isolados foram submetidos ao teste de triagem com itraconazol (4 mg/L), voriconazol (2 mg/L) e posaconazol (0,5 mg/L) e, posteriormente, ao TSA com os mesmos antifúngicos em concentrações entre 0,03 e 16 mg/L. Os dados foram analisados pelo teste de McNemar (nível de significância de 5%). Os resultados demonstraram diferença significativa nas proporções de resistência e sensibilidade entre os dois métodos para itraconazol ($X^2 = 5,297$; $p = 0,021$) e voriconazol ($X^2 = 8,522$; $p = 0,003$). Para posaconazol, não houve diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 0,063$; $p = 0,804$). Conclui-se, portanto, que o protocolo EUCAST de triagem, validado para amostras clínicas, não apresenta a mesma eficácia para isolados ambientais, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de protocolos específicos para esse tipo de amostra.

Palavras-chave: Resistência antifúngica, aspergilose, triazóis, EUCAST e Teste de Suscetibilidade Antifúngica (TSA)

Abstract

Fungi of the genus *Aspergillus* are considered cosmopolitan and are associated with aspergillosis, infections that primarily affect immunocompromised individuals, representing a significant clinical and epidemiological challenge. The diagnosis of these infections involves host factors, clinical aspects, and laboratory findings, with treatment based on the use of triazole antifungals such as voriconazole, itraconazole, and posaconazole. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommends screening tests as preliminary tools to identify possible fungal resistance, given that Antifungal Susceptibility Testing (AFST) requires often unavailable supplies. Therefore, this study evaluated the agreement between the screening test standardized by EUCAST and AFST results in 234 environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. The isolates were subjected to the screening test with itraconazole (4 mg/L), voriconazole (2 mg/L), and posaconazole (0.5 mg/L) and subsequently to AFST with the same antifungals at concentrations ranging from 0.03 to 16 mg/L. Data were analyzed using McNemar's test (significance level of 5%). The results demonstrated a significant difference in the proportions of resistance and susceptibility between the two methods for itraconazole ($X^2 = 5.297$; $p = 0.021$) and voriconazole ($X^2 = 8.522$; $p = 0.003$). For posaconazole, there was no statistically significant difference ($X^2 = 0.063$; $p = 0.804$). It is concluded, therefore, that the EUCAST screening protocol, validated for clinical samples, does not demonstrate the same efficacy for environmental isolates, highlighting the need to develop specific protocols for this type of sample.

Keywords: Antifungal resistance, aspergillosis, triazoles, EUCAST, Antifungal Susceptibility Testing (AFST).

Sumário

Introdução.....	8
Gênero Aspergillus.....	8
Aspergiloses.....	9
Resistência.....	11
Métodos de avaliação de resistência.....	12
Objetivo.....	14
Material e métodos.....	15
Coleta.....	15
Triagem.....	16
Teste de Susceptibilidade Antifúngica.....	17
Análise de dados.....	17
Resultados e discussão.....	17
Conclusão.....	21
Referências.....	22

Introdução

Gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são um grupo taxonômico vasto e complexo de fungos filamentosos, que são encontrados globalmente e desempenham um papel crucial na decomposição de matéria orgânica. Apresentam notável capacidade de prosperar nos mais diversos ambientes, do solo às superfícies internas de residências e hospitais, em diversas condições ambientais com temperaturas variadas e conseguem suportar baixas umidades (Latgé, 1999). Compreendem cerca de 446 espécies, pertencentes à classe dos Eurotiomycetes e ao filo Ascomycota (Houbraken et al., 2020), dentre as quais se destaca *Aspergillus fumigatus*, que é uma das principais espécies patogênicas para o humano, seguido por *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (Latgé & Chamilos, 2019). A reprodução dos *Aspergillus* pode ser sexuada ou assexuada, sendo que a fase sexuada ocorre por meio de ascósporos, enquanto a fase assexuada acontece através de esporos assexuais chamados conídios. Os conídios são responsáveis pela grande dispersão pelo ar e pela colonização de novos ambientes, que variam de 2,5 a 3,5 micrômetros (Figura 1) (Kwon-Chung & Sugui, 2013).

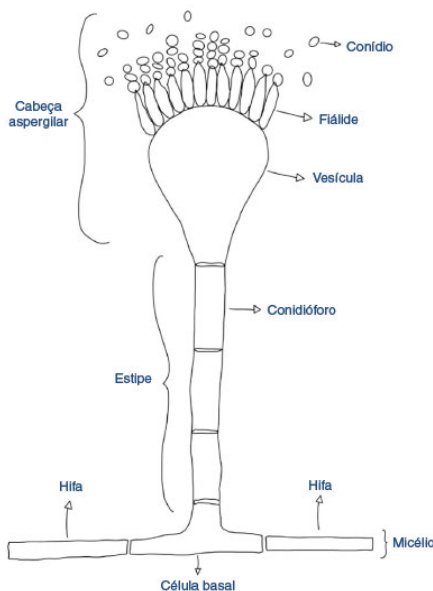


Figura 1: Características morfológicas do *Aspergillus fumigatus*.

Fonte: Serpa, 2024

Aspergiloses

Diariamente animais e humanos inalam os conídios de *Aspergillus*, mas em hospedeiros com alguma deficiência nos mecanismos de defesas pode-se desenvolver manifestações clínicas da infecção do fungo conhecida como aspergilose (Segal, 2009), sendo comum em pacientes com neutropenia prolongada, transplantados, sob terapia com corticóides em altas doses, internados em unidade de terapia intensiva (UTI) (Kosmidis & Denning, 2015). Em pacientes submetidos a transplantes hematopoiéticos e de órgãos sólidos, notou-se um aumento epidemiológico nos últimos anos, podendo ser associado ao uso de terapias imunossupressoras e ao aumento da sobrevivência desses pacientes (Cadena, Jose et al., 2021). Os conídios são inalados e depositados nos alvéolos pulmonares, onde encontram condições ideais de temperatura e nutrientes, devido à alta capacidade de dispersão, germinação e penetração nas vias respiratórias (Veerdonk et al, 2017; Dagenais & Keller, 2009; Latgé & Chamilo, 2019).

A aspergilose tem diferentes manifestações, a aspergilose pulmonar invasiva (API) é a manifestação mais preocupante, sendo uma infecção altamente letal e acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, tendo o *A. fumigatus* como principal espécie causadora (Patterson et al, 2016). O diagnóstico precoce é essencial para recuperação, no entanto pacientes imunossuprimidos podem apresentar poucos ou nenhum sintoma devido à falta de resposta inflamatória, quando apresenta algum sintoma clínico podem ser confundidos com outras infecções, por serem pouco específicos como febre, tosse, dor torácica ou pleurítica, falta de ar e/ou hemoptise (Cadena, Jose et al., 2021). Estima-se que mais de 1 milhão de pessoas morram anualmente por API no mundo, sendo o diagnóstico tardio um fator determinante (Denning, 2024).

Outra forma é a aspergilose pulmonar crônica (APC), que afeta pacientes com doenças pulmonares anteriores que resultaram em lesões nos tecidos pulmonares, desenvolvem a infecção de evolução lenta (Denning, 2024). Pode-se manifestar de diversas formas como aspergiloma simples, conhecido também como bola fúngica, que apresenta uma massa fúngica em uma cavidade pulmonar preexistente, sem invasão do parênquima adjacente (Latgé & Chamilo, 2019). Uma das mais comuns aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC) que se não tratada, pode evoluir para aspergilose pulmonar fibrosante crônica (APFC) forma mais grave da doença, a aspergilose pulmonar necrotizante crônica ou semi-invasiva é localmente invasiva e ocorre principalmente em pacientes com imunodeficiência leve ou com doença pulmonar crônica (Chowdhary et al, 2017).

Também pode se apresentar como aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), que é a reação alérgica a exposição excessiva aos conídios de *Aspergillus* e afeta principalmente indivíduos com doenças pulmonares prévias como asma ou fibrose cística, caracteriza por episódios de broncoespasmo, expectoração de tampões mucosos e sintomas constitucionais. O tratamento tardio pode levar a formação de fibrose pulmonar e perda progressiva da função respiratória (Kousha et al., 2011).

O tratamento das aspergiloses baseia-se no uso de antifúngicos, sendo os azóis a primeira linha para a forma invasiva, eles atuam inibindo a enzima lanosterol 14- α -desmetilase codificada pelo gene *cyp51A*, crucial para a síntese do ergosterol, componente essencial da membrana celular fúngica. O resultado é o acúmulo intracelular de esteróis pré-metilados tóxicos, comprometendo permeabilidade celular e funções vitais, levando à inibição do crescimento fúngico e, em última instância, à morte celular. Representados principalmente pelo voriconazol (VOR), itraconazol (ITC), posaconazol (POS), sendo esses os principais tratamentos a aspergilose (Patterson *et al.*, 2016).

O itraconazol é um triazol de primeira geração, está disponível principalmente em formulação oral para terapias das formas crônicas e utilizado no tratamento das aspergiloses alérgicas e não-invasivas, pode ser considerado para aspergilose pulmonar invasiva (API) em casos de intolerância ou indisponibilidade de outros agentes, contudo seu uso nessa condição é raramente recomendado. O uso é um desafio pela absorção variável que é significativamente afetada pela acidez gástrica e pela presença de alimentos (Ullmann et al., 2018).

Voriconazol é recomendado como fármaco primário para o tratamento de aspergiloses invasivas, sendo um triazol de segunda geração, demonstrou superioridade sobre a anfotericina B. Disponível sob a forma de intravenosa, que tem uma boa absorção e penetração em tecido sendo indicado para o tratamento, é administrado também em comprimido e suspensão oral. É metabolizado pelo fígado, com farmacocinética não linear em adultos, onde o aumento da dose eleva desproporcionalmente sua concentração plasmática (Lestrade et al, 2019).

Posaconazol é um triazol de segunda geração, com estrutura molecular semelhante ao itraconazol, destaca-se por seu papel na profilaxia de API em pacientes neutropênicos de alto risco. Doses mais altas também são utilizadas como terapia de salvamento eficaz quando o voriconazol falha ou é intolerado. Destaca-se como antifúngico oral de amplo espectro, superando outras opções disponíveis em eficácia clínica, outras vantagens incluem seu perfil de segurança, com menor nefrotoxicidade e uma probabilidade reduzida de interações com outros medicamentos (Chen et al, 2020).

Resistência

A emergência global de resistência aos azóis, particularmente em *A. fumigatus*, representa uma grave ameaça à saúde pública (Snelders et al., 2008; Lockhart, Beer & Toda, 2020). Essa resistência aos antifúngicos é geralmente associada a mutações do gene *cyp51A*, que codifica a enzima 14- α -esterol desmetilase, alvo farmacológico desta classe de antifúngicos, a resistência com isolados clínicos mostra-se adquirida durante o tratamento prolongado (Verweij et al., 2007; Mellado et al., 2007). A estrutura codificada pela enzima tem dois canais de entrada ligados, o canal 1 e o canal 2, que estão imersos nas membranas do retículo endoplasmático, essas mutações resultam na substituição de resíduos hidrofóbicos menores por resíduos maiores em alças proteicas localizadas nas proximidades dos canais de entrada da enzima, causando o fechamento parcial do canal 2 e impedindo fisicamente o encaixe adequado das moléculas volumosas dos azólicos no sítio ativo (Snelders et al., 2011). A presença de mutações do tipo tandem repeats (TRs) na região promotora do gene *cyp51A*, frequentemente associadas a substituições de aminoácidos. As combinações TR34/L98H e TR46/Y121F/T289A são as mais prevalentes globalmente e estão associadas à superexpressão do gene *cyp51A* combinada a alterações estruturais na enzima, resultando em altos níveis de resistência cruzada a múltiplos azólicos (Chowdhary, et al.; 2017).

Os azólicos, particularmente o voriconazol, constituem a terapia de primeira linha para o tratamento da aspergilose invasiva, condição que apresenta mortalidade elevada mesmo em condições ideais. A infecção por isolados resistentes está correlacionada com maior tempo de hospitalização, necessidade de múltiplas trocas de regime terapêutico e aumento significativo da taxa de mortalidade, que pode exceder 80% em pacientes imunocomprometidos quando o tratamento empírico inicial não é eficaz (Lestrade et al., 2019). Adicionalmente, a resistência cruzada entre diferentes azólicos limita substancialmente as opções terapêuticas, uma vez que isolados portadores de TR34/L98H apresentam altas concentrações inibitórias mínimas (MIC) para itraconazol e voriconazol, enquanto aqueles com TR46/Y121F/T289A demonstram resistência especificamente elevada ao voriconazol, justamente o fármaco de escolha (van der linden et al., 2015).

Atualmente, a aparição de mutações de resistência em isolados, mesmo em pacientes que não fizeram uso prolongado dos azóis, vem se tornando alarmante. *A. fumigatus* não é um fungo que causa alardes aos agricultores, no entanto habitat o solo, acabam sendo expostos a diversos meios de controles exposto a uma variedade de agentes fungicidas, utilizados para

combater outros fungos fitopatogênicos, com a estrutura semelhante aos azóis (Verweij et al, 2007).

Métodos de avaliação de resistência

A detecção rápida da resistência é uma ferramenta essencial para o combate das aspergiloses, podendo assim garantir uma terapia adequada, pois a intervenção precoce melhora as chances de recuperação do paciente (Patterson, 2016). O método de microdiluição em caldo, padronizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A e pela European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) , é amplamente reconhecido como o padrão-ouro para testes de suscetibilidade (CLSI, 2017; EUCAST, 2022). Esta técnica quantitativa determina a Concentração Inibitória Mínima (MIC), servindo como referência para validação de outros métodos (Pfaller, 2005). No entanto, sua execução é complexa e demanda tempo, requerendo preparo de múltiplas diluições, meios de cultura específicos, incubação prolongada (24-48 horas no mínimo, até 72 horas para alguns fungos) e leitura visual ou espectrofotométrica dos pontos finais, com custo operacional alto limita sua adoção em larga escala em laboratórios clínicos de rotina (Durand et al., 2021).

Com o aumento da demanda por testes de suscetibilidade antifúngica, impulsionada pela crescente das infecções invasivas e dos casos de resistência a azóis, demonstrou as limitações dos métodos de referência pela sua alta complexidade, custo elevado e demanda de tempo (Fisher et al, 2022; Lestrade, et al. 2019). O método de screening utilizando placas de ágar com azóis de 4 poços, destacando-se pela facilidade de execução, baixo custo e rapidez na liberação de resultados, composto por ágar RPMI 2% dextrose com antifúngicos solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos até as concentrações de 4 mg/L para Itraconazol, 2 mg/L para Voriconazol e 0,5 mg/L para Posaconazol, e um poço para controle de crescimento positivo sem adição de antifúngicos. O crescimento é observado e classificado de 0 a 3 em comparação com crescimento do controle sendo 0 - nenhum crescimento visível, 1- crescimento fraco, 2 - crescimento menor que o controle, 3 - crescimento desinibido semelhante ao controle (Arendrup et al, 2017).

O teste por discos de difusão destaca-se pela facilidade de execução, baixo custo e rapidez na liberação de resultados, utiliza discos impregnados com concentrações fixas do antifúngico em ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 g/ml de azul de metileno, e a interpretação baseia-se na medida do diâmetro do halo de inibição, no entanto sua confiabilidade pode variar significativamente dependendo do antifúngico testado (Pfaller, 2005). Outro método é o Etest que utiliza a difusão do agente em ágar, consiste em uma fita

de papel que é colocada na superfície do ágar com um gradiente de concentração do antifúngico, com objetivo de obter o MIC de forma mais simples, contudo tem um custo elevado e a leitura pode ser complexa (Meinerz, 2010; Pfaller, 2003).

O método de escala rápido e simplificado, adequado para qualquer laboratório de microbiologia clínica, pode ser utilizado para garantir que apenas isolados potencialmente resistentes sejam submetidos e selecionados para a microdiluição como teste confirmatório. E ajudando os clínicos a tomar decisões importantes sobre terapia antifúngica enquanto aguardam resultados definitivos de MIC, especialmente em regiões com alta prevalência de resistência aos azólicos. (Buil et al, 2017).

A identificação precisa de isolados resistentes é benéfica e destaca a importância da vigilância sobre a prevalência da resistência aos azóis em *A. fumigatus* ambientais. Esse monitoramento permite a compreensão sob a disseminação de mecanismos de resistência no ecossistema, identificar potenciais fontes de exposição e analisar a evolução genética desses fungos no ambiente. A vigilância epidemiológica permite a construção de novas estratégias que visem o controle da resistência (van der Linden et al, 2015).

Objetivo

Avaliar a concordância entre o teste de triagem padronizado pelo EUCAST e o Teste de Suscetibilidade Antifúngica (microdiluição) na detecção de resistência à antifúngicos triazólicos em isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus*.

Material e métodos

Coleta

A coleta das amostras para esse trabalho foram provenientes do projeto LatAsp (Pesquisa Latino-Americana de Resistência aos Azóis em *Aspergillus fumigatus*). Com o protocolo de ciência cidadã foram coletadas 6.954 amostras de *A. fumigatus* em 11 países da América Latina (com exceção da Venezuela devido a restrições políticas) (Figura 2). As coletas foram conduzidas por meio de exposição de tiras adesivas ao ar ambiente por aproximadamente 10 horas, em quatro diferentes momentos, entre julho de 2022 e agosto de 2023. Os voluntários foram orientados a coletar as amostras sempre no mesmo local, garantindo a comparabilidade dos dados. Após a coleta, as amostras foram identificadas e enviadas aos laboratórios para as análises microbiológicas.

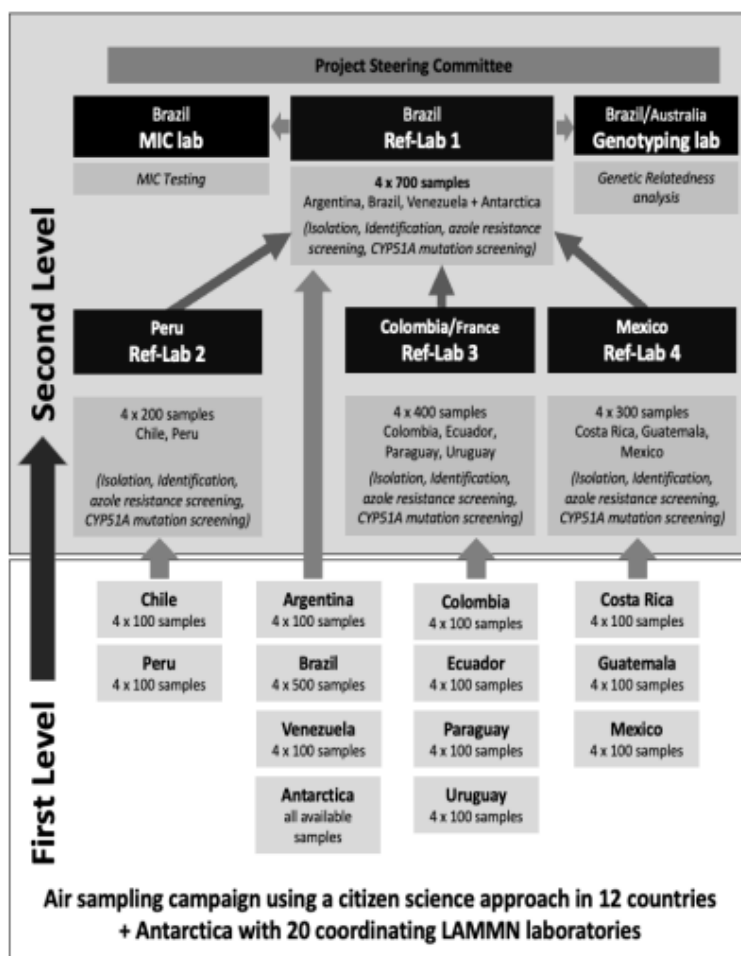


Figura 2: Fluxograma do projeto.

Fonte: Relatório final do LatAsp, 2024 (Comunicação pessoal Dr. Wellington Santos Fava)

No laboratório, as amostras foram inoculadas a partir da tira adesiva em um tubo com meio ágar batata inclinado. Em uma cabine de fluxo laminar com o auxílio de uma alça estéril descartável. Os tubos foram incubados em estufa com temperatura constante de 37°C durante 48 horas. Após a incubação, com auxílio de um swab, foi preparada uma suspensão de conídios com concentração equivalente à escala McFarland 0.5 em água destilada com NaCl.

Triagem

Neste trabalho foram selecionado 234 isolados de *A. fumigatus* que demonstraram crescimento e foram submetidos a triagem no método em placa de ágar com azol, no qual foi inoculado 20 µL da solução de esporos em uma placa de ágar RPMI 2% dextrose com antifúngicos solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos até as concentrações de 4 mg/L para Itraconazol, 2 mg/L para Voriconazol e 0,5 mg/L para Posaconazol, e um poço para controle de crescimento positivo sem adição de antifúngicos. Foram incubadas à 37° C, avaliado o crescimento após 48 horas e classificado pela escala de crescimento, de acordo com Arendrup et al. (2017) e Buil et al. (2017) com: 0 - nenhum crescimento visível, 1- crescimento fraco, 2 - crescimento menor que o controle, 3 - crescimento desinibido semelhante ao controle. Os isolados que cresceram até 1 na escala foram classificados como sensíveis e os que tiveram a capacidade de crescer 2 ou 3 foram classificados como resistentes.

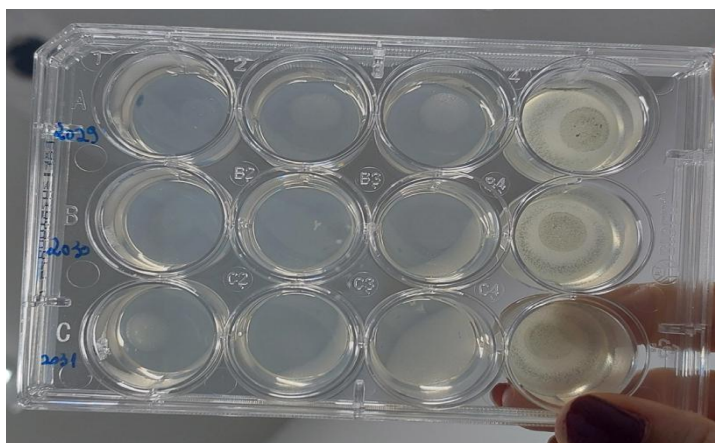


Figura 3: Placa de triagem com 12 poços com controle positivo à direita.

Fonte: Waldschmidt, 2024

Teste de Suscetibilidade Antifúngica

Conforme o documento definitivo E.Def 9.4 do EUCAST o teste padrão método de microdiluição em caldo. Foram testadas em concentrações que variaram de 0,03 a 16 mg/L.

Após ser incubado por 48 horas foram analisados de acordo com o MIC (Concentração Inibitória Mínima) e classificados como sensíveis ou resistentes com base nos pontos de corte epidemiológicos (ECVs) estabelecidos por Arendrup et al. (2017).

Análise de dados

Para avaliar a concordância entre os métodos utilizou-se o Teste de McNemar com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas separadamente para cada antifúngico.

Resultados e discussão

Os 234 isolados ambientais foram analisados conforme seu crescimento em cada antifúngico itraconazol (ITZ), voriconazol (VOR) e posaconazol (POS).

Itraconazol

Itraconazol apresentou discordância entre os teste (Tabela 1), com 195 isolados que se apresentaram como sensíveis na triagem, na microdiluição 94,4% desses isolados concordaram com a classificação e 5,6% mostraram-se como resistentes. Contudo, dos 39 isolados que apresentaram-se resistentes pela triagem, apenas 33,3% confirmaram-se como resistentes e 66,7% se mostraram sensíveis. O teste de McNemar apresentou diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=5,297$; valor $p=0,021$), levando à rejeição da hipótese nula de igualdade de proporções.

Tabela 1 : Tabulação cruzada entre triagem e MIC para itraconazol. Frequência absoluta e relativa da classificação de sensibilidade pelo teste de disco (Triagem_ITZ e Triagem_VOR) em comparação com o teste de concentração inibitória mínima (MIC_ITZ) para 234 isolados.

Tabulação cruzada Triagem_ITZ * MIC_ITZ

		MIC ITZ		Total
		Sensível	Resistente	
Triagem_ITZ Sensível	Contagem	184	11	195
	% em Triagem_ITZ	94,4%	5,6%	100,0%
	% em MIC_ITZ	87,6%	45,8%	83,3%
Resistente	Contagem	26	13	39
	% em Triagem_ITZ	66,7%	33,3%	100,0%
	% em MIC_ITZ	12,4%	54,2%	16,7%
Total	Contagem	210	24	234
	% em Triagem_ITZ	89,7%	10,3%	100,0%
	% em MIC_ITZ	100,0%	100,0%	100,0%

Voriconazol

O antifúngico voriconazol obteve discordância entre os testes (Tabela 2), na triagem 228 isolados apresentaram-se como sensíveis e 6 como resistentes. Na microdiluição 91,7% dos sensíveis apresentaram concordância com o primeiro teste e 8,3% dos isolados como resistentes, os que foram classificados como resistentes apenas 33,3% concordam com a classificação prévia e 66,7% não. O teste de McNemar apresentou diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 8,522$; $p = 0,003$), levando à rejeição da hipótese nula de igualdade de proporções.

Tabela 2 : Tabulação cruzada entre triagem e MIC para voriconazol. Frequência absoluta e relativa da classificação de sensibilidade pelo teste de disco (Triagem_ITZ e Triagem_VOR) em comparação com o teste de concentração inibitória mínima (MIC_VOR) para 234 isolados.

Tabulação cruzada Triagem_VOR * MIC_VOR

		MIC_VOR		Total
		Sensível	Resistente	
Triagem_VOR	Sensível			
	Contagem	209	19	228
	% em Triagem_VOR	91,7%	8,3%	100,0%
	% em MIC_VOR	98,1%	90,5%	97,4%
	Resistente			
	Contagem	4	2	6
	% em Triagem_VOR	66,7%	33,3%	100,0%
	% em MIC_VOR	1,9%	9,5%	2,6%
Total	Contagem	213	21	234
	% em Triagem_VOR	91,0%	9,0%	100,0%
	% em MIC_VOR	100,0%	100,0%	100,0%

Posaconazol

O posaconazol mostrou concordância entre os testes, pela triagem o posaconazol apresentou 224 isolados sensíveis e 10 resistentes, no TSA 96,9% se confirmaram sensíveis e 3,1% discordaram da triagem. Dos resistentes, 90% apresentaram discordância e apenas 10% confirmaram a resistência apresentada pela triagem. Neste antifúngico não detectou uma diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 0,063$; $p = 0,804$).

A taxa de falsos resistentes aos antifúngicos, principalmente ao itraconazol e voriconazol, demonstra uma possível falha no protocolo da EUCAST de triagem para *A. fumigatus* ambientais. Desenvolvido e validado com foco em isolados clínicos, o método não apresenta a mesma sensibilidade e especificidade quando aplicado diretamente a isolados ambientais. O protocolo emprega concentrações fixas (breakpoints epidemiológicos, ou ECVs) derivadas da distribuição de Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) em populações clínicas (EUCAST, 2020; Arendrup et al., 2020). No entanto, as populações ambientais de *A. fumigatus*, podem ser suscetíveis a pressões seletivas distintas, notadamente a exposição a fungicidas azólicos agrícolas que são estruturalmente semelhantes aos antifúngicos clínicos. Essa exposição pode selecionar variantes com alterações fenotípicas sutis que não correspondem necessariamente aos fenótipos de resistência clinicamente relevantes (Snelders et al., 2012; Fisher et al., 2022).

A triagem baseia-se no crescimento ou não em uma concentração fixa do antifúngico, o que torna suscetível a interpretar fenótipos de crescimento atenuado (trailing growth). Esse fenômeno pode ser causado por variações normais do teste ou por respostas temporárias do fungo, e não necessariamente por uma resistência real ao antifúngico (Verweij et al., 2016).

A proporção de falsos positivos (66,7%) é clinicamente relevante. Em um cenário clínico, um paciente com resultado falso-positivo poderia levar à restrição indevida de opções terapêuticas, que com um teste de microdiluição completo posteriormente refutaria o resultado inicial de resistência na triagem (Hodiamont et al., 2009). No âmbito ambiental, a utilização exclusiva da triagem resultaria em uma prevalência de resistência superestimada. Dados inflados prejudicam os sistemas de monitoramento, podendo gerar alarmes infundados, direcionar políticas públicas ineficientes, atrapalhar a identificação de focos reais de resistência e prejudicam análise de tendências temporais reais (Fisher et al., 2022).

As discordâncias observadas para itraconazol e voriconazol, mas não para posaconazol, refletem os distintos perfis de resistência cruzada associados a mutações no gene *cyp51A* de *A. fumigatus*. As mutações no códon G54 conferem resistência cruzada específica para itraconazol e posaconazol, enquanto mutações no códon M220 resultam em resistência predominante a itraconazol, com padrões variáveis para voriconazol e posaconazol (Mellado et al., 2007). O mecanismo ambiental de maior relevância epidemiológica global, a mutação TR34/L98H, confere resistência cruzada a todos os triazólicos de uso clínico, o que explicaria parte das discordâncias observadas, especialmente considerando a origem ambiental dos 234 isolados avaliados neste estudo (Verweij et al., 2016). Já o mecanismo TR46/Y121F/T289A associa-se a altos níveis de resistência a voriconazol, mas apresenta

resistência parcial a itraconazol e sensibilidade variável ao posaconazol (van der Linden et al., 2015).

É importante ressaltar que o posaconazol não apresentou diferença significativa, sugerindo que com esse antifúngico não existe diferença significativa entre os métodos. No entanto, 90% dos isolados classificados como resistentes na triagem mostraram-se sensíveis na microdiluição. Considerando o um número limitado de isolados resistentes entre as amostras e um espectro mais estável em comparação aos outros antifúngicos, devido a barreira mais elevada à resistência a mutações ambientais. Nessa situação, testes estatísticos podem não detectar diferenças significativas mesmo quando as taxas de erro são numericamente altas, exigindo uma interpretação cautelosa que priorize a análise descritiva dos dados (Altman, 1991; Buil, 2018).

A plasticidade fenotípica refere-se à capacidade de um organismo de alterar sua fisiologia ou morfologia em resposta a mudanças ambientais, sem alterar seu genótipo. Ao ser exposto ao itraconazol, o *A. fumigatus* ativa mecanismos de defesa imediatos que desencadeiam uma resposta após a exposição do medicamento, como bombas que tentam expulsar da célula. Isso representa um mecanismo de "sobrevivência inicial", permitindo que o fungo diminua a intensidade temporariamente o efeito do azol e mantenha algum grau de viabilidade, que pode ser confundido com resistência (Snelders et al., 2015). Entretanto a microdiluição avalia diferentes concentrações, essa plasticidade fenotípica não é suficiente para sustentar o crescimento em concentrações relevantes, levando a um MIC baixo e classificação de sensibilidade.

A resistência aos azóis é uma emergência de preocupação global, em *A. fumigati* insere-se no conceito de Saúde Única (One Health), pois surge no ambiente (pelo uso de fungicidas na agricultura) e afeta a saúde humana (Fisher et al., 2022). Portanto, a vigilância ambiental é essencial para o controle da resistência. No entanto, a aplicação do protocolo EUCAST, de usar triagem para distinguir isolados ambientais resistentes ou sensíveis, pode gerar dados questionáveis, que exibem maior complexidade biológica e diversidade que os clínicos.

Diante disso é necessário o uso da triagem como etapa inicial, empregando a escala que exclui apenas os isolados que não apresentam nenhum tipo de crescimento (classificados com 0). Essa abordagem é útil para processar um grande volume de amostras e identificar isolados que necessitam de uma análise mais aprofundada. Para confirmar possível resistência, todos os isolados com qualquer tipo de crescimento na triagem, devem ser

submetidos ao teste de microdiluição completa, diminuindo as chances de excluir isolados ambientais verdadeiramente resistentes.

Conclusão

Levando em consideração os achados deste presente estudo, verifica-se que o uso do teste de triagem padronizado pelo EUCAST como única ferramenta na vigilância quantitativa a resistência aos azóis em *A. fumigatus* de origem ambiental é um risco para estudos, podendo excluir alguns isolados que de fato resistentes ou resultando em falsos positivos, evidenciando a necessidade de pesquisas para protocolos específicos para amostras ambientais, uma vez que o protocolo EUCAST de triagem é validado para amostras clínicas.

Referências

A formatação das referências bibliográficas seguiu as regras de formatação da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT NBR 6023/2018.

ALTMAN, Douglas G. **Practical statistics for medical research**. Chapman and Hall/CRC, 1991.

ARENDRUP, Maiken Cavling et al. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3325-3333, 2017.

ARENDRUP, M. C. et al. How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 11, p. 1464-1472, 2020.

BUIL, J. B. et al. Single-center evaluation of an agar-based screening for azole resistance in *Aspergillus fumigatus* by using VIPcheck. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 10.1128/aac. 01250-17, 2017.

BUIL, Jochem B. et al. Itraconazole, voriconazole, and posaconazole CLSI MIC distributions for wild-type and azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 103, 2018.

CADENA, Jose; THOMPSON, George R.; PATTERSON, Thomas F. Aspergillosis: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 415-434, 2021.

CHEN, Lu et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole. **Drugs**, v. 80, n. 7, p. 671-695, 2020.

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

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**. 3rd ed. **CLSI standard M38**. [S. l.]: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

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

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. e428–e438, 1 jul. 2024. DOI 10.1016/S1473-3099(23)00692-8.

DURAND, Charlotte et al. Can we improve antifungal susceptibility testing?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 720609, 2021.

EUCAST. **EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.4, Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.** [S. l.]: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2022.

FISHER, M. C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022.

HODIAMONT, Caspar J. et al. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. **Medical mycology**, v. 47, n. 2, p. 217-220, 2009.

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.

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

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

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **European respiratory review**, v. 20, n. 121, p. 156-174, 2011.

LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

LATGÉ, J. P., & Chamilos, G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, 33(1), e00140-18, 2019

LESTRADE, P. P. A. et al. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 799-806, 2019.

LESTRADE, Pieter P. et al. Voriconazole resistance and mortality in invasive aspergillosis: a multicenter retrospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 9, p. 1463-1471, 2019.

LOCKHART, Shawn R.; BEER, Karlyn; TODA, Mitsuru. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: what you need to know. **Clinical microbiology newsletter**, v. 42, n. 1, p. 1-6, 2020.

MEINERZ, Ana Raquel Mano et al. Avaliação dos métodos de teste e microdiluição em caldo para o estudo da suscetibilidade do *Sporothrix schenckii* com o itraconazol. **Ciência Animal Brasileira/Brazilian Animal Science**, v. 11, n. 2, p. 344-348, 2010.

MELLADO, E. et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1897-1904, 2007.

PFALLER, J. B. et al. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1126-1129, 2003.

PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility testing methods. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 8, p. 929-943, 2005.

PATTERSON, Thomas 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.

SEGAL, Brahm H. Aspergillosis. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 18, p. 1870-1884, 2009.

SERPA, Faradiba Sarquis et al. Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA): guia da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia para o diagnóstico e manejo. **Arq Asma Alerg Imunol**, p. 189-212, 2024.

SNELDERS, Eveline et al. The structure–function relationship of the *Aspergillus fumigatus* cyp51A L98H conversion by site-directed mutagenesis: the mechanism of L98H azole resistance. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 11, p. 1062-1070, 2011.

SNELDERS, Eveline et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e31801, 2012.

SNELDERS, E. et al. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; an expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, artigo 28, 2015.

ULLMANN, Andrew 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.

VERWEIJ, Paul E.; MELLADO, Emilia; MELCHERS, Willem JG. Multiple-triazole–resistant aspergillosis. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 14, p. 1481-1483, 2007.

VERWEIJ, P. E. et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 3, p. 362-368, 2016.

VAN DER LINDEN, J. W. M. et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 6, p. 1041, 2015.

WALDSCHMIDT, S. C. **Diversidade genética de isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus*: Marcadores ISSR e susceptibilidade a antifúngicos**. 2024. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.