

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO DO SUL

MURILLO AUGUSTO PALHARES

**COLONIZAÇÃO POR *ASPERGILLUS* EM PACIENTES INTERNADOS EM
HOSPITAL PÚBLICO DE CAMPO GRANDE, MS**

CAMPO GRANDE – MS
2022

MURILLO AUGUSTO PALHARES

**COLONIZAÇÃO POR ASPERGILLUS EM PACIENTES INTERNADOS EM
HOSPITAL PÚBLICO DE CAMPO GRANDE, MS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Linha de pesquisa: Aspectos laboratoriais e epidemiológico das infecções fúngicas, bacterianas e virais.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

CAMPO GRANDE – MS
2022

Aos meus pais, Marinelson e Sueli, por todo apoio e carinho durante toda trajetória de estudo, trabalho, e compreensão nos momentos de ausência.

A minha esposa Evelyn que foi a força presente, apoiou, incentivou, confiou e compartilhou de cada conquista.

Aos meus sogros e cunhados que foram a segunda família.

Eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PPGDIP) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do sul (UFMS) pela oportunidade;

À Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA) pelo apoio financeiro necessário para realização do projeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro à pesquisa, através da concessão da bolsa;

À minha orientadora Prof^a. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, pela orientação, paciência, carinho e sugestões no decorrer desde projeto.

À Maína Nunes, do Laboratório de Análises Clínicas, pela recuperação dos isolados, a partir das amostras clínicas;

À Profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang, da FACFAN-UFMS, pelo planejamento do estudo e sua aprovação nas instâncias devidas, além do apoio de infraestrutura para procedimentos de purificação e identificação fenotípica dos isolados;

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas, da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, pelas reações de sequenciamento gênico;

A Otávio Moreli Carneiro Monteiro pela revisão dos prontuários médicos e redação de artigo científico;

A Carlos Alberto Passinho Campos pelo sequenciamento gênico e interpretação dos resultados de identificação de espécies;

A Gabriel Manzi Oliboni pela extração de DNA e reação de PCR, para posterior sequenciamento gênico, e pelos testes de sensibilidade à anfotericina B;

Aos colegas do Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias-LabDIP, Faculdade de Medicina, UFMS, envolvidos na execução do projeto, em especial, ao Prof. James Venturini pelo apoio de infraestrutura e insumos no LabDIP.

“A evolução criou toda vida senciente neste planeta usando somente uma ferramenta: o erro.”

– J. Nolan, L. Joy (2016)

RESUMO

Aspergilose é uma micose invasiva, causada por espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. A aderência desses fungos aos pulmões é o fator chave para o mecanismo de colonização, que predispõe o hospedeiro para aspergilose, em suas formas alérgicas, podendo evoluir para infiltrado pulmonar com hemoptise e eosinofilia, ou formas graves, como a alveolar obstrutiva, durante o processo invasivo. Quando a invasão se limita aos pulmões, tem-se a aspergilose pulmonar invasiva e quando há disseminação, pela via sanguínea para outros órgãos, tem-se a aspergilose disseminada. Pacientes com alteração do epitélio, ou que tiveram episódios necróticos prévios, podem apresentar cavidades pulmonares que facilitam a instalação e filimentação de conídios de *Aspergillus*, resultando em massas denominadas aspergilomas. O presente trabalho teve por objetivo contribuir para o conhecimento da colonização respiratória por espécies de *Aspergillus* e seus fenótipos de resistência. Foram utilizados 94 isolados de *Aspergillus*, provenientes de amostras respiratórias de pacientes atendidos, entre janeiro 2017 e abril de 2021, em um hospital escola público terciário, situado na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. A recuperação dos isolados foi realizada após semeadura em meios de rotina, como ágar Sabouraud dextrose e/ou ágar batata com cloranfenicol, e incubação sob temperatura de 37°C. Foram identificadas cinco Seções: Fumigati (37%), Flavi (33%), Nigri (27%), Usti (2%) e Terrei (1%). A resistência a 4mg/L de itraconazol, foi verificada em teste de triagem para todos os isolados e somente um (1,1%), pertencente à Seção Flavi, apresentou resultado positivo. Os valores de concentração inibitória mínima de itraconazol, voriconazol, posaconazol e anfotericina B foram determinados para cada seção e interpretados segundo pontos de corte clínicos (*breakpoints*), preconizados pela norma de referência europeia EUCAST. A resistência foi de 11,7% (11/94), sendo maior (9,6%; 9/94) na Seção Fumigati, seguido de Flavi e Nigri (ambos 1,1%; 1/94). Por se tratar de espécies oportunistas, sendo *A. fumigatus* associado à altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados, a ocorrência de colonização respiratória por cepas resistentes pode representar risco de aspergilose refratária à terapia, caso a doença se desenvolva e o tratamento seja realizado com fármacos azólicos.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, triazóis, fármaco, resistência fúngica

ABSTRACT

Aspergillosis is an invasive mycosis caused by filamentous fungi of the genus *Aspergillus*. Adherence of these fungi in lungs is the key factor for colonization mechanism, which predisposes host to aspergillosis in its mild allergic forms, which may progress to pulmonary infiltrate with hemoptysis and eosinophilia, or, more severe forms, such as obstructive alveolar disease during invasive process. Patients with altered epithelium, or who have had previous necrotic episodes, may present pulmonary cavities that facilitate the installation and filamentation of *Aspergillus* conidia, resulting in masses called aspergillomas. When invasion is limited to lung, there is invasive pulmonary aspergillosis, and when there is dissemination through the blood to other organs, there is disseminated aspergillosis. The present work aimed to contribute to knowledge of respiratory colonization by *Aspergillus* species and their resistance phenotypes. Ninety-four *Aspergillus* isolates were used, from respiratory samples from patients treated between January 2017 and April 2021, in a tertiary public teaching hospital, located in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. The recovery of isolates was carried out after sowing, in routine media, such as Sabouraud dextrose agar and/or chloramphenicol potato agar, and incubated at 37°C. Five Sections were identified: Fumigati (37%), Flavi (33%), Nigri (27%), Usti (2%) and Terrei (1%). The screening test for itraconazol (4mg/L) was performed for all isolates and only one (1.1%) isolate from Section Flavi showed a positive result. The minimum inhibitory concentration values of itraconazole, voriconazole, posaconazole and amphotericin B were determined for each section and, according to clinical breakpoints of the European reference standard EUCAST. The resistance was 11.7% (11/94) being 9.6% (9/94) from the Fumigati Section, followed by Flavi Section and Nigri Section (1%; 1/94, each). As these are opportunistic species, with *A. fumigatus* associated with high mortality rates in hospitalized patients, occurrence of colonization by resistant strains may represent a risk for development of aspergillosis refractory to therapy in azole treated patients.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, triazoles, drug, antifungal resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Desenho ilustrativo das estruturas de reprodução assexuada que permitem identificação presuntiva das seções de <i>Aspergillus</i> _____	17
Figura 02. Representação de subgêneros e seções do gênero <i>Aspergillus</i> _____	18
Figura 03. Representação estrutural dos principais fármacos azólicos utilizados no tratamento da aspergilose _____	20
Figura 04. Estrutura da caspofungina_____	20
Figura 05. Estrutura da anfotericina B_____	21
Figura 06. Ilustração da placa para teste de triagem de resistência a azóis em isolados de <i>Aspergillus</i> spp._____	30
Figura 07. Ilustração do teste de triagem para resistência a itraconazol (ITZ) em placa contendo 6 poços_____	30
Figura 08. Ilustração de placas de microtitulação para teste de suscetibilidade antifúngica e acessório utilizado para leitura da reação de inibição de crescimento para determinação da concentração inibitória mínima_____	33
Figura 09. Representação numérica e percentual de 5 seções em 94 isolados de <i>Aspergillus</i> , obtidas de trato respiratório humano, 2017-2021_____	36
Figura 10. Ilustração de 3 testes de triagem para resistência ao itraconazol, com resultados negativos. A, B, C: ausência de crescimento nos poços contendo ágar suplementado com 4 g/L de itraconazol; D, E, F: crescimento de colônias em poços controle, sem antifúngico_____	38
Figura 11. Ilustração de teste de triagem para resistência ao itraconazol com resultado positivo. G e H: colônias resistentes a 4 mg/L de itraconazol; I e J: colônias nos poços controle, sem antifúngico_____	38
Figura 12. Exemplo de uma placa de teste para determinação de CIM para o antifúngico posaconazol_____	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Pontos de corte clínicos para cinco espécies de <i>Aspergillus</i> e quatro antifúngicos para interpretação clínica de valores de CIM obtidas segundo metodologia EUCAST EDEF. 9.3.2, 2020_____	33
Tabela 02. Pontos de corte epidemiológicos para cinco espécies de <i>Aspergillus</i> e quatro antifúngicos para interpretação de valores de CIM obtidas segundo metodologia EUCAST EDEF. 9.4, 2022_____	34
Tabela 03. Seções de 94 isolados de <i>Aspergillus</i> , obtidos de amostras respiratórias humanas, 2017-2021_____	35
Tabela 04. Identificação de espécie, por análise presuntiva fenotípica e confirmatória genotípica, em 36 isolados de <i>Aspergillus</i> , provenientes de trato respiratório de pacientes 2017 e 2021, Hospital Público Terciário de Ensino, Campo Grande, MS_____	36
Tabela 05. Sensibilidade a 4 antifúngicos de 94 isolados de <i>Aspergillus</i> , obtidos de trato respiratório humano, 2017-2021_____	41
Tabela 06. Intervalo de valores de CIM, CIM ₅₀ e CIM ₉₀ de 4 antifúngicos em 35 isolados da seção Fumigati, obtidos de secreção respiratória, 2017-2021_____	43
Tabela 07. Intervalo de valores de CIM, CIM ₅₀ e CIM ₉₀ de 4 antifúngicos frente a 31 isolados da seção Flavi, obtidos de secreção respiratória, 2017-2021_____	43
Tabela 08. Intervalo de valores de CIM, CIM ₅₀ e CIM ₉₀ de 4 antifúngicos frente a 21 isolados da seção Nigri, obtidos de secreção respiratória, 2017-2021_____	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American type culture collection</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Sorbent Assay</i>
ECOFF	Ponto de corte epidemiológico
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H1N1	Influenza A/ influenza H1N1
ITZ	Itraconazol
ITS	<i>Intergenic Transcribed Spacer</i>
NK	<i>Natural killers</i>
NTW	<i>non wild-type, não-selvagem</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POS	Posaconazol
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TR	<i>Tanden repeats</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
VOR	Voriconazol
WT	<i>wild-type, selvagem</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Colonização pulmonar e infecção por espécies de <i>Aspergillus</i>	13
1.2 Diagnóstico laboratorial da aspergilose	15
1.3 Tratamento da aspergilose	19
1.4 Mecanismos de resistência aos azóis em <i>Aspergillus</i>	21
1.5 Testes de sensibilidade a antifúngicos	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Locais de trabalho	27
3.2 Isolados de <i>Aspergillus</i>	27
3.3 Manutenção dos isolados	27
3.4 Identificação fenotípica	28
3.5 Identificação molecular	28
3.6 Teste de triagem para resistência aos azólicos	29
3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	30
3.7.1 Preparo de antifúngicos	31
3.7.2 Preparo de inóculos	31
3.7.3 Ensaio	31
3.7.4 Interpretação de resultados de CIM	32
4. RESULTADOS	35
4.1 Seções de <i>Aspergillus</i>	35
4.2 Espécies de <i>Aspergillus</i>	36
4.3 Fenótipos de resistência ao itraconazol por método de triagem	38
4.4 Concentração inibitória mínima dos antifúngicos (CIM)	39
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A – Isolados utilizados para estudo	54
ANEXO 1	61

1. INTRODUÇÃO

A aspergilose é micose causada por espécies de fungos filamentosos enquadrados no gênero *Aspergillus*, da família *Trichocomaceae*, ordem *Eurotiales* e filo *Ascomycota*. *Aspergillus* é extremamente ubíquo, sendo encontrado, fartamente, em diversos ambientes e, até mesmo em locais com baixo teor de água disponível e temperaturas elevadas (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011). O gênero *Aspergillus* foi descrito em 1729 por Micheli, o que possibilitou novos estudos para muitos pesquisadores descobrirem diversas características morfológicas e fisiológicas, levando à separação de inúmeras espécies. Em 2010 eram descritas 200 espécies (BENNET, 2016), mas hoje são reconhecidas cerca de 400 delas (HOUBRAKEN et al, 2020). As espécies apresentam diferenciações morfológicas e moleculares que resultam em diferentes atividades de água, colorações de esporos (conídios), colônias de cores variadas, taxas distintas de crescimento sob determinadas temperaturas e produção de metabólitos, muitos com características toxigênicas (SAMSON; VARGA, 2009; MURRAY, 2006). As micotoxinas produzidas por *Aspergillus* estão relacionadas com perda econômica por contaminação de alimentos. Espécies produtoras de micotoxinas, como *Aspergillus flavus*, podem atingir colheitas antes ou depois de armazenadas e, se as condições de armazenamento forem inadequadas e favorecerem crescimento fúngico, produzem grandes quantidades de aflatoxinas (PACHECO et al., 2010; HEDAYATI et al., 2007). As micotoxinas trazem impacto econômico e são capazes de causar a morte de animais e seres humanos quando ingeridas, devido à aflatoxicose. Algumas espécies, e suas respectivas toxinas, são listadas no Anexo 01 (ADAM et al. 1998; WANGIKAR, et al, 2005; FURLANI et al, 2001; KLICH, 2002; MICHAILIDES et al, 2007; YU et al, 2005).

As características de ampla dispersão e adaptação ao meio ambiente, permitem que conídios de *Aspergillus* sejam transportados em bioaerossóis, os quais são constantemente inalados por hospedeiros animais. O contato efêmero, ou colonização do trato respiratório, por *Aspergillus* em pessoas saudáveis pode causar crises alérgicas, com sintomatologia leve, como coriza, ou até manifestações mais graves, como febre alta, infiltrado pulmonar, hemoptise e eosinofilia. As manifestações alérgicas tendem a ser passageiras, em alguns casos, mas requerem atenção pois podem anteceder formas mais graves como a forma alveolar obstrutiva ou até a forma invasiva (OHARA et al., 2016; ROSENBERG, 1977; GAGO; DENNING; BOWYER, 2019). Pacientes com aspergilose, desse modo, apresentam, desde inflamação local das vias aéreas como rinite ou aspergilose broncopulmonar alérgica, até a forma mais letal, a

aspergilose pulmonar invasiva. Portanto, a aspergilose se apresenta sob quadros clínicos variados, a depender do volume do inóculo e de condições do hospedeiro, sendo a colonização prévia um fator de risco para desenvolvimento da doença (BEISSWENGER; HESS; BALS, 2012).

1.1 Colonização pulmonar e infecção por espécies de *Aspergillus*

Os conídios, produzidos pelas hifas, no solo, vegetais ou em matéria orgânica em decomposição, são liberados no ar atmosférico e, facilmente, carregados pelo vento. Os conídios de tamanho variado podem ser tão pequenos ($2-3\mu\text{m}$) que, quando em contato com as vias aéreas ou fissuras cutâneas, mucosa ocular, conduto auditivo e trato gastrointestinal, pode se alojar e permanecer nesses locais por período indeterminado (O’GORMAN, 2011).

Após inalação, a deposição dos conídios (esporos) nos pulmões pode passar despercebida pelo sistema imune, o que caracteriza a forma assintomática da aspergilose, como descrito para *A. fumigatus*, colonizante de hospedeiro humano. A aderência de *Aspergillus* nos pulmões é o fator chave para o mecanismo de colonização e Gago e colaboradores (2019) acreditam que este processo é feito através de ligações mediadas por proteínas, como albumina e colágeno. No entanto, os conídios encontram uma série de dificuldades para germinarem, ou seja, formarem hifas no trato respiratório. A presença de muco na parede extracelular dificulta a aderência dos conídios e células do trato respiratório, tecido pseudo-estratificado com camada ciliar, são capazes de limpar a superfície externa, dificultando formação de hifas e desenvolvimento da doença (VAN DE VEERDONK et al., 2017).

Contra os mecanismos fisiológicos de defesa do hospedeiro, a presença de galactomanana na parede da célula fúngica favorece a formação de biofilmes capazes de dar maior sobrevivência a esse agente etiológico (GAGO; DENNING; BOWYER, 2019). Entretanto, estas e outras moléculas, da superfície das células fúngicas, são identificadas pela resposta imune do hospedeiro que, na maioria das vezes, é capaz de controlar ou evitar o estado de colonização. Muitas proteases são, também, produzidas durante o processo de crescimento fúngico, sendo capazes de danificar a parede do epitélio resultando, porém, em forte sinal de alerta para o hospedeiro que, então, ativa a resposta imune através da produção de citocinas (GAGO; DENNING; BOWYER, 2019).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mediada pela resposta imune inata, contribui para destruição das estruturas fúngicas, através de reações de oxidação do NADPH. A resposta imune adaptativa é realizada por células T *helper* e células T citotóxicas (VAN DE VEERDONK et al., 2017). Nos pulmões os macrófagos e neutrófilos são células importante na defesa contra *Aspergillus* spp., sendo que macrófagos são capazes de destruir conídios, enquanto neutrófilos são capazes de destruir hifas. Portanto, a neutropenia é um importante fator de risco associado à aspergilose invasiva (BEISSWENGER et al, 2012; SAMARAKOON; SOUBANI, 2008).

Na vigência de algumas doenças e condições de risco, a aspergilose pode se instalar, sob as suas diversas formas. Pacientes tabagistas, com alteração do epitélio, ou aqueles que tiveram episódios necróticos, por conta de outras patologias como tuberculose, H1N1, etc. podem apresentar cavidades pulmonares que facilitam a instalação de conídios e sua filamentação, resultando em massas denominadas aspergilomas, conhecidos também como “bolas fúngicas”. Tais condições permitem que os pequenos conídios possam atravessar as vias aéreas e atingir os alvéolos. Quando germinados podem colonizar e, dependendo das condições do paciente, as hifas podem se infiltrar nos tecidos causando a forma invasiva da aspergilose (DENNING, 1998). Aspergilomas são descritos em pacientes com tuberculose pulmonar prévia e podem anteceder a forma invasiva, no caso de pacientes imunocomprometidos (GAGO; DENNING; BOWYER, 2019; VAN DE VEERDONK et al., 2017). Casos de aspergiloma são descritos no Brasil, como um relato de seis pacientes, atendidos na Santa Casa de Porto Alegre (RS), com idade média de 50 anos, sendo cinco do gênero masculino, todos HIV negativos, com tosse, expectoração, febre e hemoptise (GUAZZELLI et al., 2012). Aspergilomas não são formas raras da doença, sendo *A. fumigatus* o agente etiológico em 90% dos casos (ZMEILI; SOUBANI, 2007).

Os pacientes que necessitam de transplante de pulmão e desenvolvem a síndrome da bronqueolite obliterante, com taxas de prevalência e mortalidade significativas excedendo 50% e 40%, respectivamente (LAW et al., 2019), pode ser agravada com a colonização por *Aspergillus*, como demonstrada por Weigt e colaboradores (2013), em que a presença do *A. fumigatus*, em particular, resulta em complicações da doença e risco para aspergilose invasiva (WEIGT et al., 2013).

A aspergilose invasiva é determinada quando espécies de *Aspergillus*, presentes no epitélio pulmonar, conseguem se desenvolver e invadir o parênquima, chegando aos vasos sanguíneos, podendo causar trombose, infarto, necrose e hemorragia. A sintomatologia pode

ser febre, acompanhado de dor e hemoptise (KOUSHA et al., 2011). Exames radiológicos podem revelar o que é conhecido como sinal do halo e aspecto de “vidro fosco”, sugestivos da doença. Quando a invasão se limita ao pulmão, tem-se a aspergilose pulmonar invasiva e quando há invasão e disseminação pela via sanguínea para outros órgãos tem-se a aspergilose disseminada (PILANIYA et al., 2015).

A aspergilose pulmonar invasiva foi descrita, primeiramente, em 1953 e classificada dentre as formas mais graves da doença. A forma está associada, geralmente, a pacientes que fazem tratamento oncológico ou que passam por processo de imunossupressão. As taxas de mortalidade excedem 50%, mas podem chegar a 90% em pacientes que são transplantados (NICOLLE et al., 2011). O risco maior de infecção fúngica grave, associado à alta mortalidade, está de fato em pacientes imunodeprimidos, com períodos de longa neutropenia, associados ou não ao HIV, transplantados de órgãos sólidos ou de células tronco hematopoiéticas ou, ainda, com imunodepressão primária (BEISSWENGER et al, 2012; SAMARAKOON; SOUBANI, 2008). O acometimento dessa forma em pessoas, aparentemente, saudáveis, é raro e com exames radiológicos mostrando sinal de halo e aspecto de vidro fosco, indicando invasão fúngica nos pulmões, sugestivas de aspergilose. No entanto, a confirmação do diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva requer exames laboratoriais (PILANIYA et al., 2015).

1.2 Diagnóstico laboratorial da aspergilose

Provas imunológicas para diagnóstico da aspergilose são empregadas desde a década de 80, com a primeira reação realizada por aglutinação em partículas de látex, para pesquisa de galactomanana, um antígeno circulante liberado a partir da parede celular de *Aspergillus*. Houve, então, substituição da prova de aglutinação pela técnica de *Enzyme Linked Sorbent Assay* (ELISA), por ser um método mais confiável e reprodutível para auxiliar no diagnóstico (PFEIFFER et al, 2006). A técnica de ELISA utiliza anticorpos monoclonais (EB-A2) de roedores sensibilizados e imunizados com *A. fumigatus*. Os anticorpos são capazes de reagir com as diversas espécies de *Aspergillus*, mas reconhecem exoantígenos presentes em outros fungos não pertencentes a esse gênero, como por exemplo, *Penicilium*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Fusarium* e outros (STYNEN et al., 1992).

A detecção molecular de aspergilose, através do sequenciamento de DNA fúngico presente em amostras biológicas, aporta maior rapidez no diagnóstico da aspergilose. Além disso, pode ser dirigida para detecção gênica de mutações associadas à resistência a antifúngicos

azólicos; porém, a técnica que emprega a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) que, normalmente, é utilizada nessa reação, é restrita a grandes centros de pesquisa, ou diagnóstico, de referência, devido à sua complexidade e custo envolvidos (WHITE et al, 2017).

O diagnóstico laboratorial conclusivo para aspergilose é realizado por isolamento do agente etiológico em meio de cultura, a partir de material biológico. A identificação do agente leva em conta a análise macroscópica e microscópica das colônias de *Aspergillus*. Usa-se meios, comumente empregados em laboratórios de rotina micológica, como ágar Sabouraud ou ágar batata, em que as colônias fúngicas apresentam crescimento rápido, em até sete dias de incubação (LACAZ et al., 2002). Os conídios conferem cores distintas às colônias, em tons de verde, amarelo, marrom, branco e preto, as quais podem ser cotonosas ou pulverulentas, sendo este um dos parâmetros para identificação presuntiva de seção e subgênero (KLICH, 2002).

A análise microscópica das colônias permite a observação do talo filamentosos septado e hialino, com ramificações dicotômicas (hifas vegetativas) e formação de conidióforos (hifas reprodutivas) a partir de “célula-pé”. Nas extremidades dos conidióforos são produzidas estruturas vesiculares, de diâmetro e forma variadas, destinadas à reprodução assexuada. Sobre cada vesícula, formam-se pequenas estruturas tubulares, em uma ou duas camadas, denominadas fiálides e métulas (Figura 01). Na extremidade desse conjunto são produzidos os conídios (esporos assexuados exógenos) perfilados em cadeias. O conjunto de conidióforo, vesícula, fiálides, métulas e conídios, é chamado de cabeça aspergilar e, normalmente, está em posição perpendicular à célula pé da hifa vegetativa que a sustenta. A forma desse conjunto é um dos critérios fenotípicos utilizados para a identificação presuntiva da seção e sub-gênero (MURRAY, 2006).

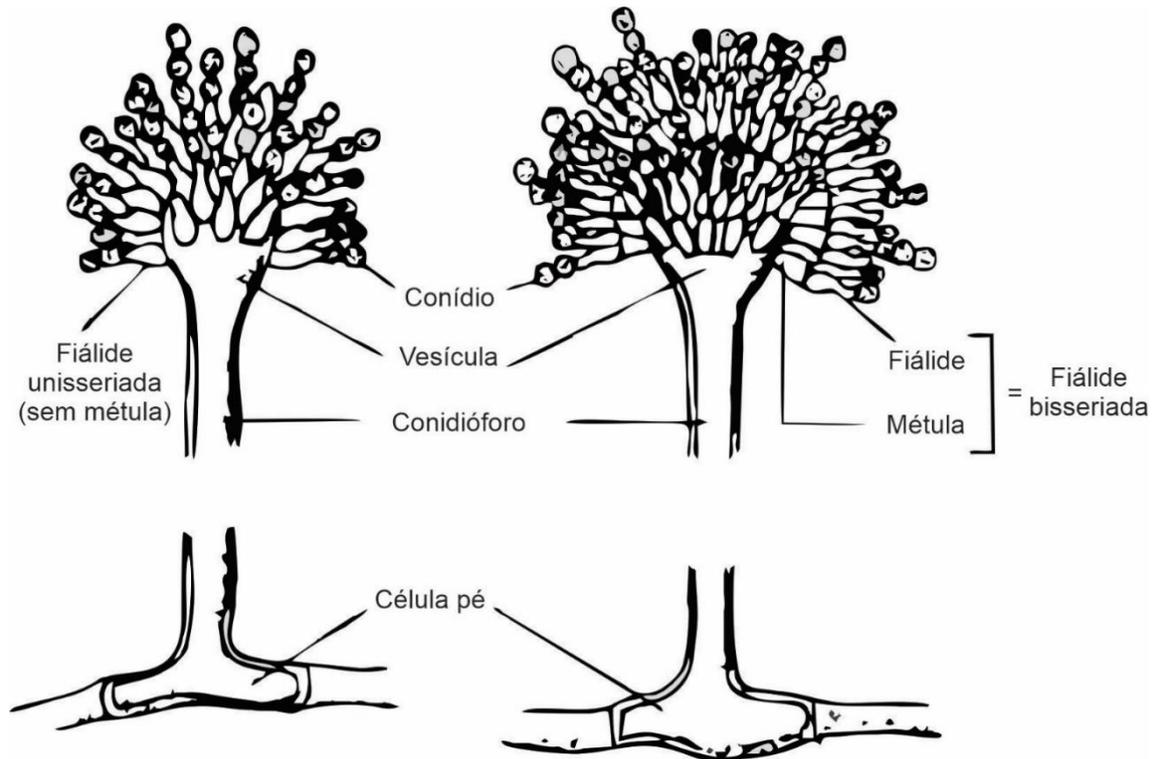


Figura 01. Desenho ilustrativo das estruturas de reprodução assexuada que permitem identificação presuntiva das seções de *Aspergillus*

Fonte: Adaptado de WALSH; HAYDEN; LARONE, 2018

Após o advento das metodologias para análise genética, o gênero *Aspergillus* passou por diversas mudanças taxonômicas e, atualmente, pode ser dividido e caracterizado em sete grandes subgêneros: *Fumigati*, *Aspergillus*, *Cremeri*, *Polypaecilium*, *Circundati*, *Nidulantis* e *Candidi*. Para cada subgênero há a divisão em seções, atualmente, em número de 27 (HOUBRAKEN et al., 2020).

As seções incluem: *Candidi*, *Petersoniorum*, *Nigri*, *Terrei*, *Flavipedes*, *Janorum*, *Circundati*, *Tannerorum*, *Robusti*, *Flavi*, *Nidulantes*, *Aenei*, *Usti*, *Cavemicolarum*, *Raperorum*, *Silvatici*, *Bispori*, *Ochraceorosei*, *Sparsi*, *Fumigati*, *Clavati*, *Vargarum*, *Cervini*, *Restricti*, *Aspergilus*, *Cremeri*, *Polypaecilum*. (HOUBRAKEN et al., 2020).

Espécies, geneticamente, relacionadas estão agrupadas em uma mesma Seção, segundo filogenia combinada usando nove *loci* (RPB1, RPB2, Cct8, Tsr1, CaM, BenA, SSU, LSU, ITS) (Figura 02). As espécies de cada Seção são discriminadas por sequenciamento gênico da região *Intergenic Transcribed Spacer* (ITS), que mesmo com sua capacidade de variabilidade interespecífica, são regiões conservadas entre espécies. Genes são, também, alvos de sequenciamento para determinação de espécies que não apresentem ITS específico, sendo aqueles que codificam β -tubulina e calmodulina os principais (FRISVAD; LARSEN, 2016).

A identificação da espécie é de grande importância clínica, pois possuem características distintas de virulência e resistência (MURRAY, 2006). Assim, a Seção Fumigati, mais frequente agente de aspergilose, contém *A. fumigatus*, com diferentes níveis de suscetibilidade para cada antifúngico, assim como, *A. lentulus*, que é resistente *in vitro* a diversos fármacos, como: anfotericina B, azóis e equinocandinas, indicados no tratamento da aspergilose (BADDLEY et al., 2009).

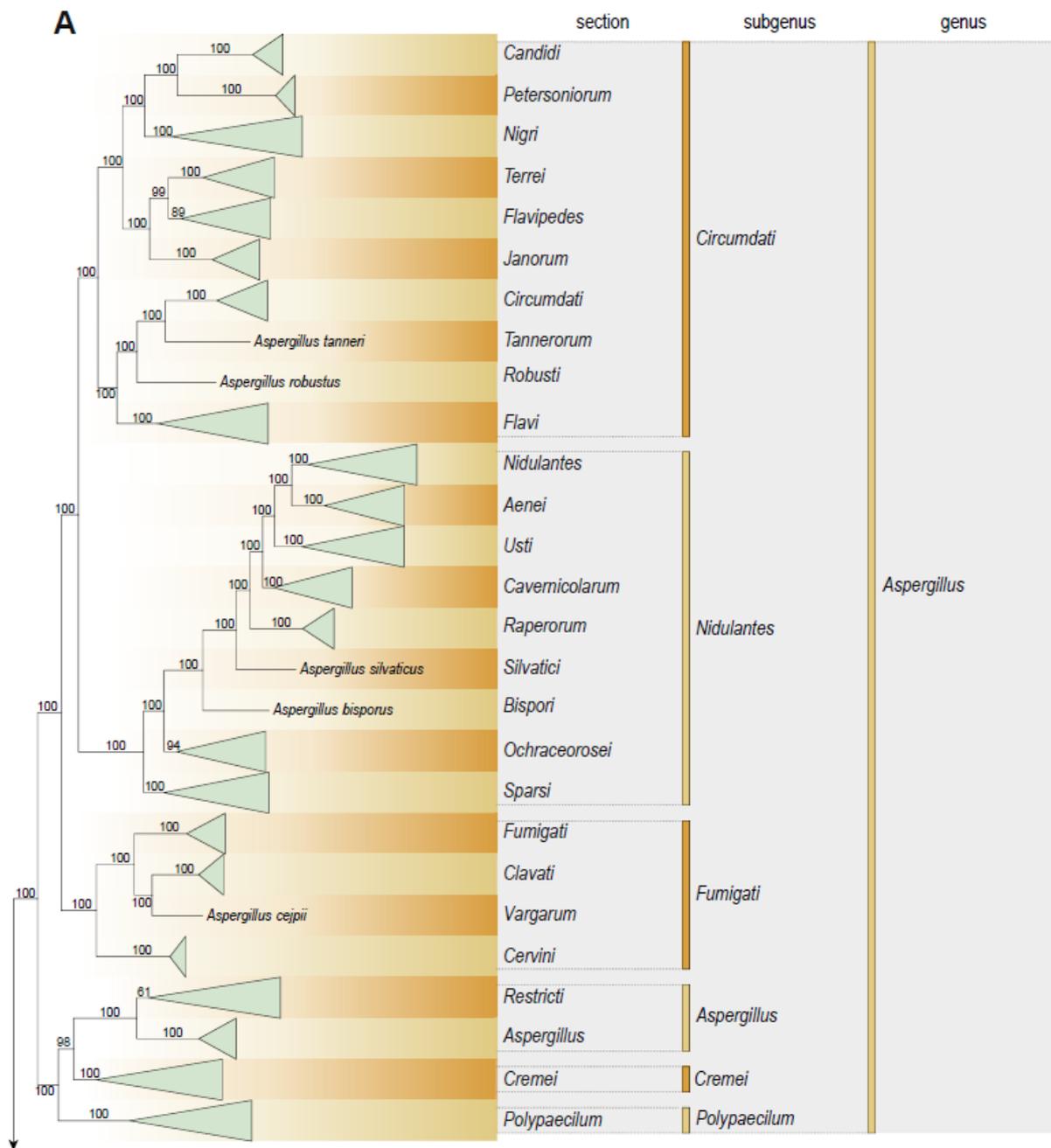


Figura 02. Representação de subgêneros e seções do gênero *Aspergillus*

Fonte: HOUBRAKEN et al., 2020

1.3 Tratamento da aspergilose

No tratamento para aspergilose são utilizados fármacos azólicos: itraconazol (ITZ), posaconazol (POS) e voriconazol (VOR), sendo que, fluconazol (destinado à infecções fúngicas por leveduras e dermatofitoses) não deve ser utilizado, pois *Aspergillus*, assim como a extensa maioria dos fungos filamentosos, apresenta resistência intrínseca a este antifúngico (Figura 03). O VOR, de acordo com recomendações internacionais, é utilizado como o fármaco de escolha no tratamento da aspergilose (PATTERSON et al., 2016).

A classe química dos azóis atua na inibição de processos da via bioquímica responsável por produzir ergosterol. O ergosterol é um componente abundante, essencial na regulação de fluidez e integridade da membrana celular de todos os fungos. A inibição da sua síntese, pelos azóis, ocorre por bloqueio da enzima 14- α -demetilase, pertencente ao grande grupo denominado citocromo P-450, que participa do processo bioquímico de transformação do lanosterol em ergosterol (BRUNTON, 2012).

Outros fármacos antifúngicos, como caspofungina e micafungina, pertencentes à classe das equinocandinas podem, também, ser utilizados no tratamento da aspergilose (Figura 04). No entanto, de acordo com recomendações e *guidelines* internacionais, estes fármacos devem ser utilizados, somente, em associação aos azóis, ou quando houver falha terapêutica com outra classe medicamentosa (PATTERSON et al., 2016; DENARDI et al., 2018). As equinocandinas possuem, como mecanismo de ação, a inibição da enzima β -1,3-glucano sintase, que é responsável pela biotransformação da UDP-glicose em β -1,3-glucana, componente importante da parede celular fúngica. Quando ocorre a inibição da enzima, e conseqüente deficiência do componente polissacarídeo, há extravasamento de componentes celulares causado pela alta pressão osmótica exercida sobre a parede enfraquecida. As equinocandinas, portanto, atuam na síntese da parede celular fúngica e não sobre a membrana celular, como a classe dos fármacos azólicos e, como será visto, a dos polienos (HEBERT et al., 2005).

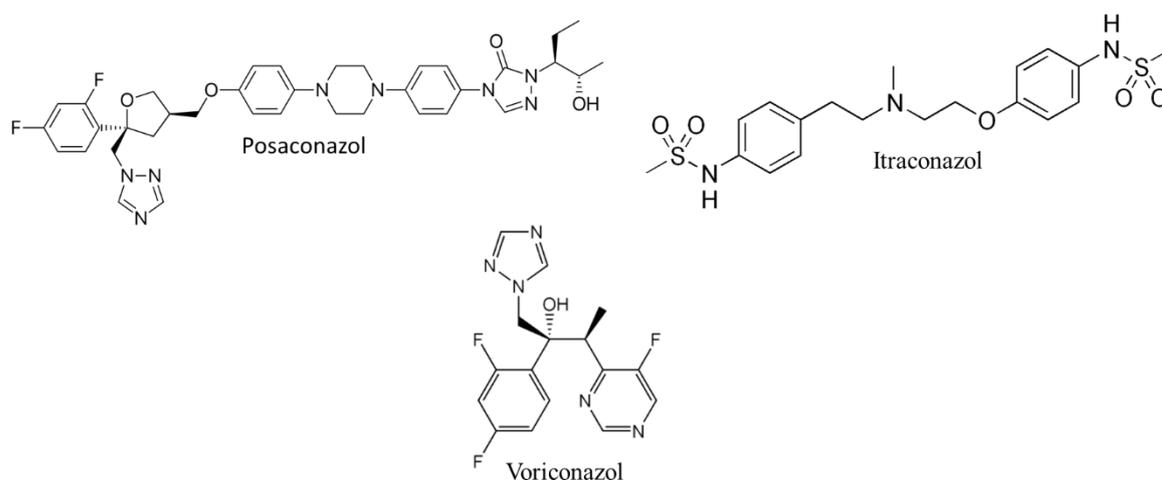


Figura 03. Representação estrutural dos principais fármacos azólicos utilizados no tratamento da aspergilose

Fonte: BERGOLD; GEORGIADIS, 2004

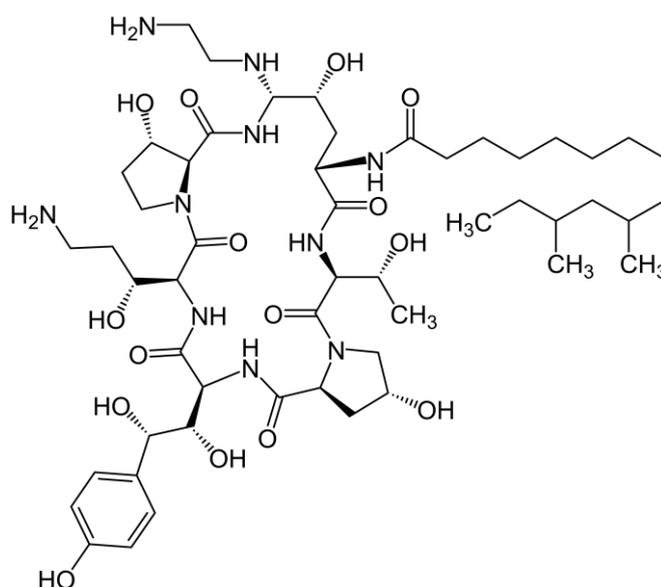


Figura 04. Estrutura da caspofungina

Fonte: Caspofungina. Stringfixer, Disponível em: <https://stringfixer.com/pt/Caspofungin>. Acesso 28 de set. de 2021

A classe dos polienos é representada, na clínica médica, pela anfotericina B (Figura 05) e nistatina. A utilização da anfotericina é, em regra, intravenosa, pois sendo pouco hidrossolúvel não deve administrada de forma intramuscular ou via oral, e indicada para infecções fúngicas sistêmicas, podendo ser utilizada no tratamento de aspergilose (MURRAY et al, 2006; BRUNTON, 2012), porém, a administração empírica dos polienos é, ainda, recomendada para pacientes que estão em neutropenia prolongada e persistem com febre mesmo após a utilização

de antibióticos de amplo espectro (PATTERSON et al., 2016). Apesar do tratamento com anfotericina B ser, extremamente, efetivo na maioria dos casos de infecções fúngicas invasivas, seu uso é limitado devido à sua alta toxicidade renal. Formulações lipídicas foram desenvolvidas no intuito de diminuir os danos deletérios ao paciente, porém, a utilização de anfotericina B é, ainda, recomendada apenas para casos de infecções fúngicas sistêmicas graves e que não responderam, anteriormente, às outras formas de tratamento (MURRAY et al, 2006; PATTERSON et al., 2016). O mecanismo de ação da anfotericina B se dá pela ligação com o ergosterol, que resulta na criação de poros na membrana fúngica e, em consequência, ocorre extravasamento de substâncias intracelulares, levando à morte celular. O fármaco age, também, a nível intracelular gerando um estresse oxidativo danoso à célula fúngica. São raros os relatos de resistência associados aos polienos, entretanto, acredita-se que mutações em genes que codificam enzimas importantes nas rotas bioquímicas responsáveis pela produção do ergosterol estejam associadas a este mecanismo de defesa fúngico (CAROLUS et al., 2020).

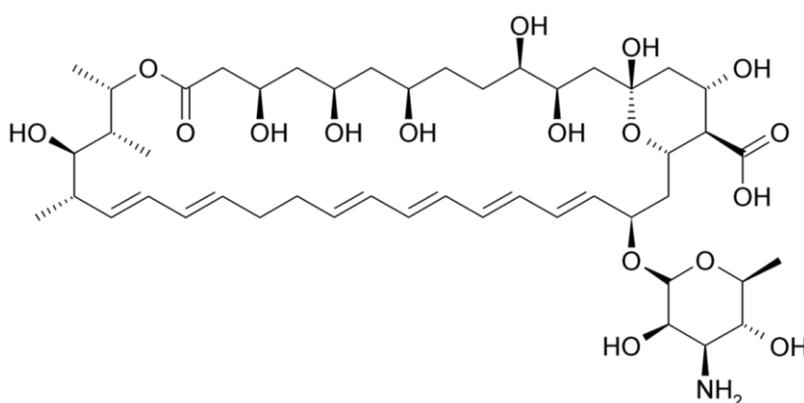


Figura 05. Estrutura da anfotericina B
Fonte: FALCI; PASQUALOTTO, 2015

1.4 Mecanismos de resistência aos azóis em *Aspergillus*

O primeiro relato sobre resistência aos azóis, com exceção do fluconazol, em isolados de *Aspergillus*, foi feito por Denning e colaboradores em 1997 e, desde então e cada vez mais, cepas resistentes de *A. fumigatus* foram identificadas nos Estados Unidos, América do Sul, Japão e Europa, tornando importante investigar sua dimensão e mecanismos de resistência subjacentes (DENNING et al., 1997; MONTESINOS et al., 2017; ALVAREZ-MORENO et al., 2017; ONISHI et al., 2017; ARIKAN-AKDAGLI, 2012).

Os mecanismos descritos, em cepas de *Aspergillus* resistentes aos azólicos, podem ser assim resumidos: i) super expressão da proteína alvo dos fármacos, a 14- α -demetilase, ii) diminuição da ligação entre o fármaco e enzima alvo, impedindo a devida ação farmacológica, e iii) aumento da expressão de bombas de efluxo, expelindo o fármaco quando intracelular (BEAUVAIS, 2001; STRZELCZYK et al, 2013; HAGIWARA et al., 2016).

A elucidação dos mecanismos de resistência aos antifúngicos veio através da utilização de métodos genéticos. Para os fármacos azólicos, na maioria das vezes, os mecanismos estão relacionados à ocorrência de mutações no gene *cyp51A*, um dos homólogos que codificam a enzima-alvo 14- α -demetilase. A ocorrência de cepas mutantes pode estar associada à pressão seletiva, após exposição a um fármaco azólico, indicando que o fungo é capaz de se adaptar, rapidamente, quando exposto a doses elevadas desses antifúngicos ou, ainda, desenvolver estratégias para sobreviver sob baixas doses (ARENDRUP et al., 2010; HOWARD et al., 2009).

No entanto, isolados resistentes aos fármacos azólicos foram encontrados em pacientes sem uso prévio desses fármacos, indicando não ser o tratamento a única forma de pressão seletiva para emergência de resistência. A via de desenvolvimento de resistência, nesses casos, pode ser explicada por exposição ambiental a compostos azólicos, pressão seletiva de cepas mutantes e subsequente inalação de seus conídios. A exposição ambiental ocorre através do uso de produtos agrícolas que pertencem à mesma classe química dos fármacos azólicos e, portanto, com atividade fungicida idêntica pelo mecanismo de ação inibitória da 14- α -demetilase (VAN DER LINDEN et al., 2011; VERWEIJ et al., 2009). Nesse cenário, uma cepa ambiental mutante, selecionada por uso de fungicidas agrícolas, deverá, em teoria, ser resistente a compostos químicos similares. De fato, essa ocorrência, denominada resistência cruzada, foi observada na Europa por Snelders e colaboradores (2021) os quais isolaram *A. fumigatus* resistente de amostras respiratórias de pacientes que nunca haviam utilizado azólicos como tratamento. Os pesquisadores concluíram que a resistência dos isolados era devido à ocorrência da mutação TR34/L98H, caracterizada por repetições (*tanden repeats-TR*) ou inserções de pares de bases no gene *cyp51A*. Tal mutação, até então, descrita somente em isolados ambientais, resulta na substituição de aminoácidos da proteína-alvo dos azóis, diminuindo o acoplamento fármaco-sítio enzimático (SNELDERS et al., 2012; ALVAREZ-MORENO et al., 2017).

Outro importante mecanismo de resistência aos azóis, descrito em cepas de *Aspergillus*, é a superexpressão de proteínas de membrana com função de transporte, as já citadas bombas de efluxo, que foi verificada em isolados que não apresentavam qualquer tipo de mutação em

cyp51A, mas que, fenotipicamente, mostraram-se resistentes. A forma que os isolados encontraram para se livrar de produtos tóxicos, produzidos durante seu metabolismo, e outras substância estranhas às células, como fármacos, foi a expressão aumentada de tais bombas, para levar à eliminação dos azóis utilizados durante tratamento (CHOWDHARY et al., 2017; HAGIWARA et al., 2016; HAGIWARA et al., 2017).

A determinação fenotípica de resistência aos azóis e outros antimicrobianos é realizada por testes de sensibilidade *in vitro*, em que uma suspensão padronizada de esporos fúngicos é desafiada a crescer frente a uma, ou mais, concentrações conhecidas de um antifúngico.

1.5 Testes de sensibilidade a antifúngicos

Os testes de sensibilidade a antifúngicos foram desenvolvidos com objetivo de direcionar de tratamentos medicamentosos adequados para promoção de bons resultados para o paciente. Através de tais testes é possível a indicação do fármaco mais ativo *in vitro*, entre azóis, polienos e equinocandinas, além da identificação de ocorrência de cepa resistente a um ou mais desses medicamentos (LOCKHART et al., 2011).

Os ensaios para tal finalidade que, atualmente, são referência seguem diretrizes internacionais para procedimentos com técnicas de difusão em ágar com discos e microdiluição em caldo, além de um teste de triagem em ágar. O teste de disco difusão é feito com um disco de papel, infundido em uma concentração conhecida de antifúngico, colocado sobre uma placa de ágar, previamente, inoculada com suspensão fúngica; segue-se leitura do halo de inibição formado pela difusão do antifúngico no ágar, realizada após o crescimento fúngico. Os ensaios com fitas se baseiam no mesmo princípio do disco difusão, porém, cada fita apresenta concentrações diversas de cada antifúngico. O ponto onde uma elipse de inibição de crescimento fúngico intercepta a fita é considerado o valor da concentração inibitória mínima (CIM). A interpretação dos resultados de CIM, indicando se o isolado é sensível ou resistente segundo métodos em ágar, é obtida em tabelas disponíveis em diretrizes internacionais (GUPTA, 2015).

Os testes de triagem de resistência, por sua vez, surgiram da necessidade da identificação mais rápida da resistência aos fármacos azólicos, após a descoberta de taxas significativas de falha clínica em casos de aspergilose (média de 30%) em hospitais na Europa, associadas à ocorrência de cepas mutantes (GUINEA et al., 2019). No teste de triagem, uma placa dividida em quatro poços com capacidade de 1 mL é preenchida com ágar, sendo: um

poço para controle positivo de crescimento e os outros três contendo uma concentração conhecida de um de 3 fármacos azólicos, a saber: ITZ (4mg/L), VOR (2mg/L) e POS (0,5mg/L). A placa é, então, inoculada com suspensão padronizada de esporos fúngicos e a leitura de crescimento de colônias é realizada em, até 48h de incubação. Se houver crescimento nos poços contendo antifúngico o isolado deve ser considerado resistente ao mesmo e submetido ao teste para determinação da CIM.

O teste de microdiluição é realizado em placas de microtitulação, onde são dispensados antifúngicos em concentrações distintas frente às suspensões padronizadas de esporos. Após incubação adequada, o resultado da reação de inibição de crescimento é lido e interpretado segundo método utilizado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (ARENDRUP et al., 2020).

Para a determinação da CIM, o método de microdiluição em caldo é considerado o de referência. Entretanto a microdiluição não é utilizada, rotineiramente, em laboratórios de pequeno porte, devido à sua complexidade técnica, destinando-se a centros de referência, ensino e pesquisa. Para os laboratórios menores, indica-se método de difusão em ágar, que pode ser adquirido no comércio internacional, ou método de triagem. Órgãos internacionais como o CLSI e EUCAST divulgam, periodicamente, documentos atualizados contendo descrição detalhada das metodologias, fármacos utilizados e formas de controle de qualidade. As metodologias produzem resultados similares e são consideradas equivalentes (ARENDRUP et al., 2020). A forma de interpretação de valores de CIM obtidos por métodos de referência consta de tabelas que indicam valores de corte para interpretação clínica (breakpoints) e, na sua ausência, pontos de corte epidemiológicos (epidemiologic cutoff values, ECVs ou ECOFFs). Desse modo, pode-se avaliar e monitorar o perfil de sensibilidade aos fármacos antifúngicos utilizados no manejo de pacientes com infecções fúngicas, para melhor orientação terapêutica.

De acordo com as considerações anteriores, a colonização do trato respiratório por *Aspergillus*, mesmo que nem sempre traga prejuízo ao hospedeiro, no sentido de evoluir para aspergilose pulmonar, representa uma condição de risco para a doença, seja para formas alérgicas, crônicas ou invasivas (KOSMIDIS; DENNING, 2015; DENNING et al., 2014). Pacientes colonizados por *Aspergillus* e em atendimento hospitalar podem apresentar diferentes fatores de risco para o desenvolvimento da aspergilose. Ao contrário de pacientes neutropênicos ou com doenças predisponentes, indivíduos em boa condição de saúde os conídios são

facilmente eliminados, através de mecanismos da resposta imune inata e adaptativa, da ação de células *natural killers* (NK) e neutrófilos (HOHL; FELDMESSER, 2007).

Ainda, como exposto, o perfil de sensibilidade antifúngica de um isolado fúngico presta-se à extrapolação laboratorial-clínica de como seria a resposta terapêutica ao fármaco avaliado. Assim, o conjunto de dados obtidos de uma população de isolados, de mesma espécie, pode servir como subsídio à avaliação de risco do desenvolvimento de infecção refratária a tratamento e predição do melhor manejo terapêutico. Quanto maior o número de isolados avaliados, provenientes de distintas fontes clínicas e ambientais, em determinada região geográfica, mais robusto será o banco de dados constituído para traçar a epidemiologia molecular regional de determinado agente etiológico.

Nesse contexto, estudos que ajudem a maior compreensão do estado de colonização, não somente do ponto de vista do hospedeiro, mas também, sob a ótica do agente infeccioso, explicitando suas características moleculares e seu potencial de resistência, representam um avanço no conhecimento do processo de adoecimento na aspergilose.

A caracterização de fenótipos de resistência, em espécies de *Aspergillus* de origem clínica, no estado de Mato Grosso do Sul ainda não está elucidada e todo esforço nesse sentido deve ser valorizado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar as seções, espécies e fenótipos de resistência em *Aspergillus*, recuperados de amostras respiratórias de pacientes atendidos em um hospital público universitário no estado de Mato Grosso do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever a distribuição das seções e espécies de *Aspergillus*, e
- Determinar a frequência de resistência a fármacos azólicos e à anfotericina B segundo espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de trabalho

O presente trabalho foi realizado em 4 laboratórios, como segue: Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LabDIP) da Faculdade de Medicina (FAMED), Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, Alimentos e Nutrição (FACFAN), ambos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), *campus* de Campo Grande/MS, Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL), São Paulo e Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas (LEMDI) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

3.2 Isolados de *Aspergillus*

Noventa e quatro isolados de *Aspergillus*, provenientes de amostras respiratórias de pacientes sem aspergilose, atendidos, entre janeiro 2016 e abril de 2021, em um hospital público, terciário e de ensino, situado na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, foram utilizados neste projeto de pesquisa. A recuperação dos isolados foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do hospital, após semeadura em meios de rotina, como ágar Sabouraud dextrose e/ou ágar batata com cloranfenicol, e incubação sob temperatura de 37°C.

3.3 Manutenção dos isolados

Os isolados foram transportados do LAC à FACFAN para início das análises morfológicas e, desde aí, para o LabDIP, onde foram repicados em meios de ágar Sabouraud dextrose, ágar batata e ágar Czapeck para conclusão da análise morfológica e testes de sensibilidade a antifúngicos.

Das colônias originais obtidas no LAC foram realizadas replicatas, em ágar batata para formação de suspensões em água destilada estéril, para inserção dos isolados na Coleção de Culturas do LabDIP. Os dados de origem, data de obtenção e identificação de espécie de cada isolado foram inseridos no banco ELab do LabDIP, para sua codificação e rastreabilidade. Os tubos, devidamente identificados e contendo as suspensões fúngicas, segundo método de

Castellani (LACAZ et al, 2002), foram armazenados à temperatura ambiente, em armários destinados a essa finalidade.

3.4 Identificação fenotípica

Os isolados foram avaliados por análise morfológica em ágar batata e em ágar Czapeck durante seu crescimento, por até 7 dias à temperatura de 35° C, com mensuração do diâmetro, textura e cor das colônias. Para identificação presuntiva de seção, tanto a morfologia da colônia, quanto a micromorfologia, observada em microscópio ótico comum por técnica de cultivo em lâmina, foram analisadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2004) (Anexo 02).

3.5 Identificação molecular

Os isolados, classificados em seção, foram transportados até o Núcleo de Micologia do IAL onde foram submetidos à extração, purificação e semi quantificação de DNA.

O *kit* de extração de DNA utilizado foi o Bio Gene (Bioclin, Br) seguindo as orientações do fabricante, com algumas modificações no método, em que, durante a etapa de extração, foi acrescentado 15 µL a 20 µL de proteinase K e o tempo de incubação foi de uma hora.

A seguir, o DNA fúngico foi enviado ao LEMDI, para sequenciamento do gene da beta tubulina para identificação da espécie (Glass & Donaldson, 1995). Os *primers* utilizados para identificação molecular de espécies de *Aspergillus* foram:

β -tubulina 2A GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT

β -tubulina 2B ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC

Os produtos da reação de PCR foram sequenciados com a utilização dos iniciadores *foward* e *reverse*, utilizando -se *Big Dye™ Terminator v.3.1* (Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, foram preparadas reações contendo 1 µL de *Big Dye Terminator*, 1 µL de tampão, 1 µL do iniciador *foward* ou *reverse* (cada *primer* em tubo diferente) a 1,6 mM, 2 µL do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10 µL. A reação de sequenciamento foi realizada no termociclador Pro Flex PCR System da Applied Biosystems.

Após a reação de sequenciamento, os produtos das reações de sequenciamento da β -tubulina passaram por precipitação e lavagem com etanol. Na primeira etapa, em cada amostra, foram adicionados 2,5 μ L de EDTA (125mM) e 30 μ L de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 3000 g, a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 30 μ L de etanol 70% às amostras que foram, então, centrifugadas a 3000 g, à temperatura de 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, a seguir, descartado e as amostras passaram por secagem a vácuo. Após a precipitação e lavagem com etanol, foram acrescentados 10 μ L de formamida HI-DI às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas sob gelo, durante 2 minutos, e aplicadas na placa de sequenciamento inserida, a seguir, no sequenciador.

A análise das sequências obtidas para β -tubulina foi realizada no programa *Sequencher* 5.2.4. por comparação às sequências disponíveis no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information website* (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com a utilização do *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*.

3.6 Teste de triagem para resistência aos azólicos

Esta etapa foi realizada no LabDIP, FAMED, para triar isolados resistentes ao ITZ, de acordo com método EUCAST (GUINEA *et al.* 2019). Para tanto, placas descartáveis estéreis e plásticas, contendo 4 ou 6 poços (Figura 06 e 07), foram preenchidas com 1 mL de ágar RPMI 1640, contendo 2% de glicose, tamponado com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS) e acrescido de ITZ na concentração de 4mg/L. Em cada placa foi utilizado um poço para controle positivo de crescimento, contendo o mesmo ágar sem antifúngico.

De cada isolado fúngico, crescido em ágar batata sob 35°C por até 4 dias, foi feita suspensão de esporos em solução salina, contendo Tween® 20, a 0,1%, em turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, para obtenção de concentração, aproximada, de $1-5 \times 10^6$ cels/mL. Da suspensão foram aspirados 25 μ L, duas vezes, e depositados em cada poço, sobre o ágar contendo ITZ e ágar para controle de crescimento (Figuras 06 e 07), seguindo a placa para incubação a 37°C. A leitura de cada placa foi validada após 48h com observação de crescimento de colônias de cada isolado no ágar para controle positivo. O resultado do teste de triagem de resistência ao ITZ foi dado como positivo ou negativo, de acordo com crescimento ou não no ágar contendo o fármaco.

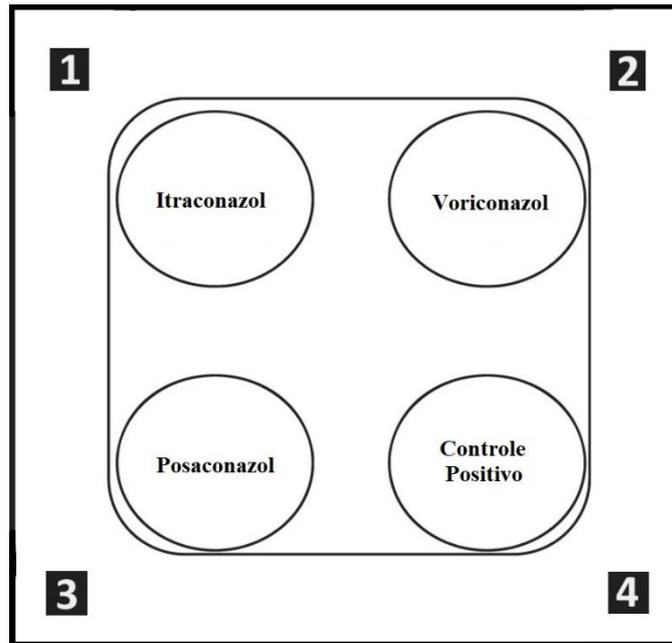


Figura 06. Desenho da placa para teste de triagem de resistência a azóis em isolados de *Aspergillus* spp.
 Fonte: Adaptado de GUINEA et al., 2019

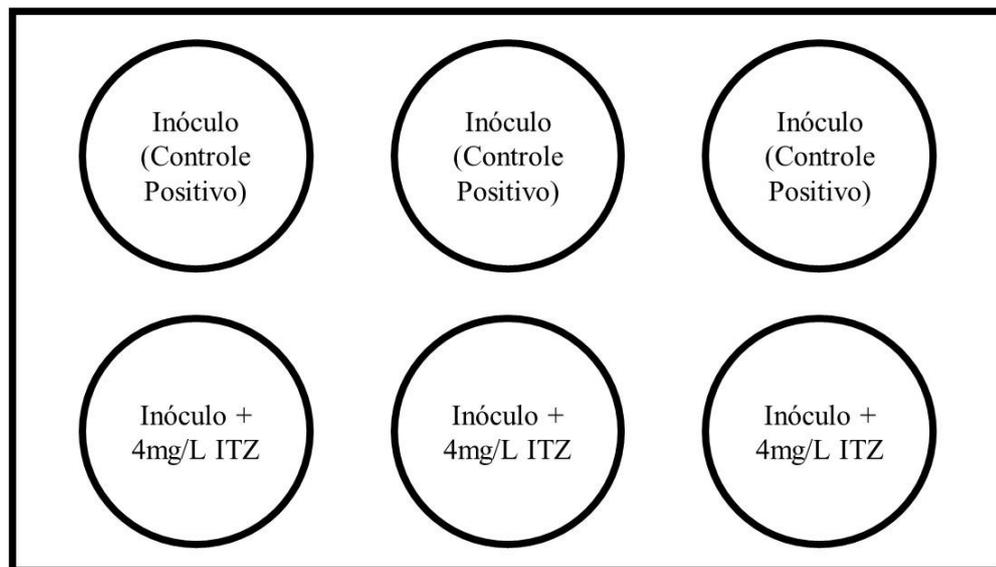


Figura 07. Ilustração do teste de triagem para resistência a itraconazol (ITZ) em placa contendo 6 poços

3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação da sensibilidade *in vitro* dos isolados, frente aos antifúngicos ITC, VRC e POS, foi realizada de acordo com o documento EUCAST EDEF. 9.3.2 (ARENDRUP et al., 2020) pelo método de microdiluição em caldo. O meio de cultura utilizado para preparo do

inóculo e diluição dos antifúngicos foi RPMI 1640, com glutamina e sem bicarbonato de sódio, com 2% de glicose, tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS), pH 7, esterilizado em membrana filtrante 0,2 µm (Millipore Ltda, Br).

3.7.1 Preparo de antifúngicos

Os antifúngicos ITZ, VOR, POS e AMB foram adquiridos sob forma de pó de grau analítico e sua potência foi considerada para preparo das soluções-mãe (1600 mg/L) em dimetil sulfóxido de sódio, distribuídas em volume de 2 mL e mantidas em *freezer* sob temperatura de -80°C. Cada frasco de solução mãe foi destinado ao preparo de soluções de uso, contendo 10 concentrações preparadas por diluição à razão 2, para sua distribuição em placas de microtitulação de 96 orifícios, estéreis, com tampa e fundo plano. Na coluna 2 de cada placa foram dispensados 100 µL da maior concentração de antifúngico (16 mg/L) e assim, sucessivamente, foram distribuídos 100µL das concentrações decrescentes até a menor (0,06 mg/L) ser dispensada na coluna 11. As placas assim preparadas foram seladas, tampadas, inseridas em saco plástico vedado e etiquetado, mantidas em freezer -80°C, por até 6 meses, para uso no teste de sensibilidade.

3.7.2 Preparo de inóculos

Para o preparo de inóculo de cada isolado fúngico, foi utilizada cultura de 72h a 35°C, em ágar Sabouraud dextrose (ASD), sem cloranfenicol. O inóculo foi preparado em tubo, contendo 5mL de solução de salina 0,9%, contendo Tween® 20, no qual foi eluído um *swab* contendo esporos retirados de cada cultura fúngica. A padronização da suspensão do inóculo foi realizada por contagem dos conídios no retículo central de uma câmara de Neubauer de modo a preparar concentração de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. A seguir foi realizada diluição 1:100 da suspensão, em meio líquido RPMI 1640, para preparo de inóculo em concentração de $1-5 \times 10^4$ UFC/mL .

3.7.3 Ensaios

No dia de cada teste de sensibilidade, as placas contendo antifúngicos foram descongeladas e adicionadas do meio de RPMI 1640 em todas as fileiras (A-H) da coluna 1

(200µL), destinada ao controle negativo ou de esterilidade e da coluna 12 (100µL), designada para controle positivo de crescimento. Na 12ª, assim como nas colunas 2 a 11 foram adicionados 100µL de 6 inóculos, correspondendo cada um a uma fileira (A-F). As 2 fileiras restantes (G e H) receberam 100µL de inóculos de 2 cepas padrão, respectivamente: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, como controle de qualidade conforme recomendado pelo EUCAST.

A concentração final dos inóculos nos orifícios contendo antifúngico (colunas 2-11) ou meio de cultura (coluna 12) foi de de 0,5–2,5 x 10⁴ UFC/mL. As concentrações finais de cada antifúngico foram diluídas à razão de 1:2, pela adição dos inóculos, perfazendo gradiente de 8 mg/L (coluna 2) a 0,03 mg/L (coluna 11). As placas, assim preparadas, foram incubadas à temperatura de 35°C, sendo a leitura da reação de inibição realizada após 24h e 48h de incubação.

Antes da leitura dos resultados, comprovou-se a esterilidade do meio, pela ausência de turvação na coluna 1, verificou-se o crescimento de cada isolado no poço destinado ao controle positivo com auxílio de um espelho (Figura 08). A seguir, procede-se ao controle de qualidade, com as 2 cepas padrão, verificando resultados de CIM conforme aqueles valores estabelecidos pelo documento EUCAST EDEF. 9.3.2. A seguir, tendo o ensaio assim validado, observou-se a turvação dos poços contendo antifúngicos e naquele em que houve inibição total do crescimento fúngico (ausência de turvação) correspondeu à CIM do antifúngico frente ao isolado.

3.7.4 Interpretação de resultados de CIM

Os valores de CIM foram interpretados para classificar cada isolado em uma categoria de sensibilidade. Foram adotados os pontos de corte clínicos (Tabela 01) e, na falta destes, os pontos de corte epidemiológicos (Tabela 02), disponíveis no documento EUCAST EDEF. 9.3.2. Na ausência de ambos os parâmetros, clínico e epidemiológico, os valores absolutos de CIM foram analisados individualmente para cada isolado ou agregados pela espécie/seção, comparativamente, aos disponíveis na literatura.

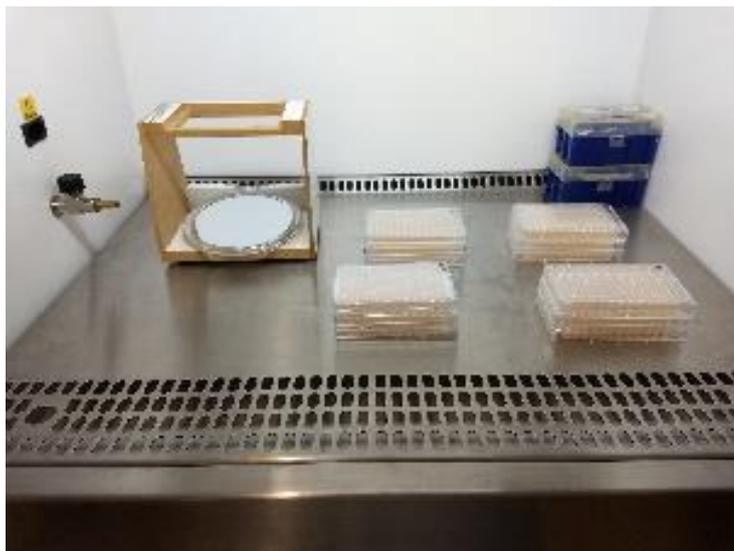


Figura 08. Ilustração de placas de microtitulação para teste de suscetibilidade antifúngica e acessório utilizado para leitura da reação de inibição de crescimento para determinação da concentração inibitória mínima.

Tabela 01. Pontos de corte clínicos para cinco espécies de *Aspergillus* e quatro antifúngicos para interpretação clínica de valores de CIM obtidas segundo metodologia EUCAST EDEF. 9.3.2, 2020

Antifúngico	Espécie	Breakpoint CIM (mg/L)	
		S ≤	R >
Voriconazol	<i>A. fumigatus</i>	1	1
Itraconazol	<i>A. flavus</i>	1	1
	<i>A. fumigatus</i>	1	1
	<i>A. nidulans</i>	1	1
	<i>A. terreus</i>	1	1
Posaconazol	<i>A. fumigatus</i>	0,125	0,25
	<i>A. terreus</i>	0,125	0,25
Anfotericina B	<i>A. fumigatus</i>	1	1
	<i>A. niger</i>	1	1

Tabela 02. Pontos de corte epidemiológicos para cinco espécies de *Aspergillus* e quatro antifúngicos para interpretação de valores de CIM obtidas segundo metodologia EUCAST EDEF. 9.4, 2022

Antifúngico	Espécie	ECOIFF CIM
		(mg/L)
Voriconazol	<i>A. flavus</i>	2
	<i>A. fumigatus</i>	1
	<i>A. niger</i>	2
	<i>A. terreus</i>	2
Itraconazol	<i>A. flavus</i>	1
	<i>A. fumigatus</i>	1
	<i>A. nidulans</i>	1
	<i>A. niger</i>	2
	<i>A. terreus</i>	0,5
Posaconazol	<i>A. flavus</i>	0,5
	<i>A. niger</i>	0,5
	<i>A. terreus</i>	0,25
	<i>A. nidulans</i>	0,25
Anfotericina B	<i>A. flavus</i>	4
	<i>A. niger</i>	0,5
	<i>A. fumigatus</i>	1

4. RESULTADOS

O projeto utilizou 94 isolados de *Aspergillus*, provenientes de amostras biológicas de trato respiratório, incluindo: escarro (n=43; 45,7%), secreção traqueal (n=41; 43,6%), lavado bronco alveolar (n=9; 9,7%) e fragmento pulmonar (n=1; 1,1%).

4.1 Seções de *Aspergillus*

Com a realização de análise de cor, tempo de crescimento e aspecto das colônias, associada à avaliação das estruturas microscópicas, em microscópio ótico comum e seguindo as descrições morfológicas de *Aspergillus*, existentes na literatura (Anexo 2) foram identificadas 5 seções: Fumigati (n=35; 37%), Flavi (n=31; 33%), Nigri (n=25; 27%), Usti (n=2; 2%) e Terrei (n=1; 1%), conforme Tabela 03 e Figura 09.

Tabela 03. Seções de 94 isolados de *Aspergillus*, obtidos de amostras respiratórias humanas, 2017-2021

Seção	N (%)	IC 95%
Fumigati	35 (37,2%)	28,1%-47,3%
Flavi	31 (32,9%)	24,3% - 43,0%
Nigri	25 (26,6%)	18,7%- 36,3%
Usti	2 (2,1%)	0,6% - 7,4%
Terrei	1 (1,1%)	0,2% - 5,8%
Total		94

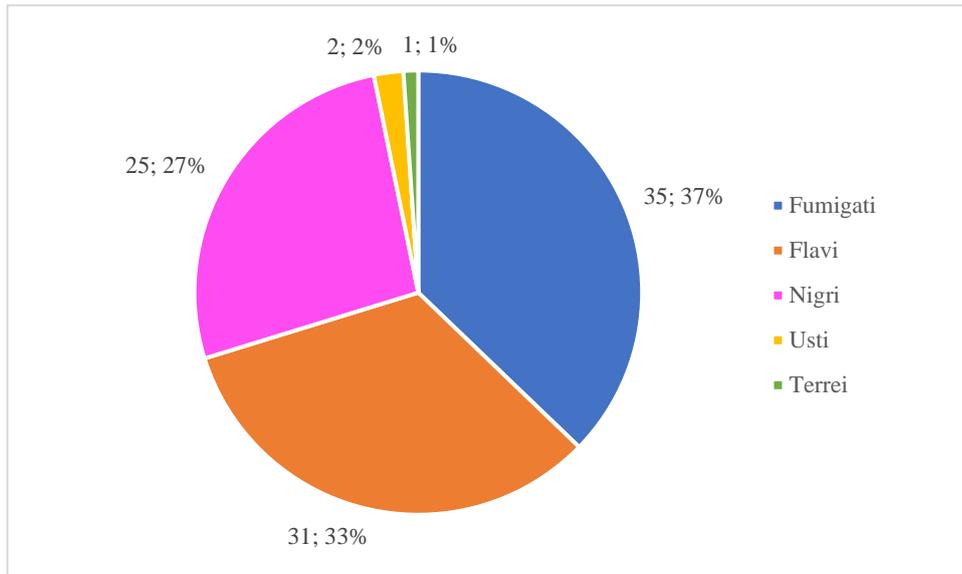


Figura 09. Representação numérica e percentual de 5 seções em 94 isolados de *Aspergillus*, obtidas de trato respiratório humano, 2016-2021

4.2 Espécies de *Aspergillus*

Na Tabela 04 constam os dados de identificação presuntiva de Seção, pela análise fenotípica com base nas características morfológicas de 36 (38,3%) isolados, para os quais foi possível identificação de espécie isolados, através de sequenciamento gênico de β -tubulina (Tabela 04). As cores representam a característica das colônias e evidenciam a concordância, ou não, verificada entre a identificação fenotípica (Seção) e a genotípica (espécie). Em 22 (61,1%) isolados (negrito) a identificação fenotípica foi correta.

Tabela 04. Identificação de espécie de 36 isolados de *Aspergillus*, de trato respiratório de pacientes 2017 e 2021, Hospital Público Terciário de Ensino, Campo Grande, MS

Isolado	Método	
	Fenotípico	Genotípico
2564E	Flavi	<i>A. sydowii</i>
799E	Fumigati	<i>A. sydowii</i>
1134ST1	Terrei	<i>A. fumigatus</i>
2820LB	Nigri	<i>A. sydowii</i>
2853E	Flavi	<i>A. fumigatus</i>
883E	Nigri	<i>A. sydowi</i>
1213E	Nigri	<i>A. niger</i>
1142ST	Flavi	<i>A. sydowii</i>
1335E	Flavi	<i>A. fumigatus</i>
666 E	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
1090 E	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
1080 E	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
1692 E	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
2915 E	Flavi	<i>A. fumigatus</i>
50 LB	Flavi	<i>A. flavus</i>
2785 E	Flavi	<i>A. flavus</i>
224 LA	Nigri	<i>A. niger</i>
725 ST	Flavi	<i>A. sydowii</i>
1625 E	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
1807 ST	Flavi	<i>A. flavus</i>
71 ST	Fumigati	<i>A. aureolus</i>
2827 E	Fumigati	<i>A. tubingensis</i>
126 ST	Nigri	<i>A. japonicus</i>
1905 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
1737 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
1661 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
1530 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
2092 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
2404 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
2116 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
2472 ST	Flavi	<i>A. fumigatus</i>
2462 ST	Fumigati	<i>A. fumigatus</i>
2325 ST	Flavi	<i>A. flavus</i>
1492 FP	Usti	<i>A. sydowii</i>
994 E	Flavi	<i>A. nomius</i>
142 E	Nigri	<i>A. brasiliensis</i>

4.3 Fenótipos de resistência ao itraconazol por método de triagem

O teste de triagem para resistência, em ágar contendo 4mg/L de itraconazol, foi realizado em todos os 94 isolados. Dentre eles, somente um único (1,06%; 1/94) isolado de *Aspergillus*, pertencente à Seção Flavi, apresentou resultado positivo para crescimento dentro das 48h do teste, em incubação sob 37°C (Figuras 10 e 11).

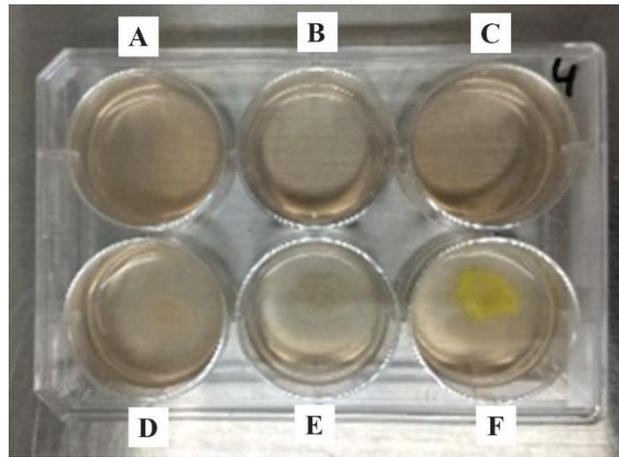


Figura 10. Ilustração de 3 testes de triagem para resistência ao itraconazol, com resultados negativos. A, B, C: ausência de crescimento nos poços contendo ágar suplementado com 4 mg/L de itraconazol; D, E, F: crescimento de colônias em poços controle, sem antifúngico (isolados 1266 E, 1737 ST e 994 E respectivamente).

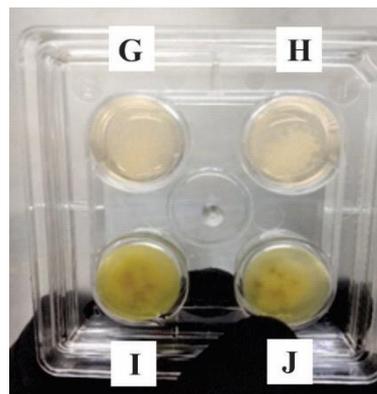


Figura 11. Ilustração de teste de triagem para resistência ao itraconazol com resultado positivo. G e H: colônias resistentes a 4 mg/L de itraconazol ; I e J: colônias nos poços controle, sem antifúngico (Isolado 2266 ST).

4.4 Concentração inibitória mínima dos antifúngicos (CIM)

Um exemplo de testes de concentração inibitória, realizado em placas de microtitulação com ITZ, VCZ, POS e AMB, está ilustrado na Figura 12.

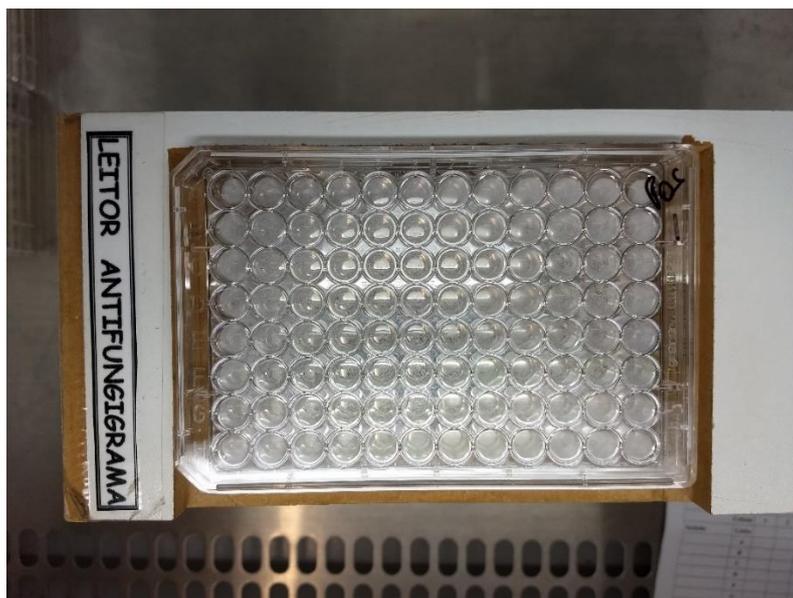


Figura 12. Exemplo de uma placa de teste para determinação de CIM para o antifúngico posaconazol

Os intervalos de valores de CIM foram de 0,3 a 1mg/L para ITZ, de 0,03 a 1mg/L para VCZ, 0,015 a 1mg/L para POS e de 0,06 a 2mg/L para AMB frente aos 35 isolados da seção Fumigati. Para os 31 isolados da seção Flavi, foram observados CIM entre 0,015 e 8mg/L de ITZ, 0,03 a 1mg/L de VCZ, 0,015 a 2mg/L de POS e 0,06 a 2mg/L de AMB. Para 25 isolados da seção Nigri, os resultados indicaram CIM entre 0,06 e 1mg/L de ITZ, 0,03 a 1mg/L de VCZ, 0,3 a 1mg/L de POS e 0,06 a 2mg/L de AMB. Os resultados indicaram CIM entre 0,25 e 1mg/L de ITZ, 0,06mg/L de VCZ, 0,12 a 0,5mg/L de POS e 0,12 a 1mg/L de AMB para os 2 isolados da Seção Usti e CIM de 0,12mg/L para ITZ, 0,5mg/L de VCZ, 0,12mg/L de POS e 0,25mg/L de AMB para o único representante da seção Terrei.

Segundo pontos de corte clínicos, preconizados pelo EUCAST, 11,7% (11/94) dos isolados foram classificados como resistentes, sendo 9,6% (9/94) da seção Fumigati, 1% (1/94)

da seção Flavi e 1% (1/94) da seção Nigri (Tabela 5). Isolados não-selvagens foram encontrados em 7,5% (8/94), sendo 5,6% (6/94) pertencentes a seção Nigri e 1,8% (2/94) a seção Flavi.

A Tabela 05, leva em consideração que um único isolado apresentou resistência para mais de um fármaco.

Os dados de sensibilidade a ITZ, VCZ, POS e AMB, agrupados em intervalos de CIM, valores de CIM necessários para inibir 50% (CIM₅₀) e 90% (CIM₉₀) dos 94 isolados constam nas Tabelas 6, 7 e 8 e estão mostrados segundo a seção de *Aspergillus*.

Tabela 05. Sensibilidade a 4 antifúngicos de 94 isolados de *Aspergillus*, obtidos de trato respiratório humano, 2017-2021

Seção	Antifúngico	N° de isolados em MIC (mg/L) de									
		≤ 0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
Fumigati (n=35)	Itraconazol		5	1	8	2	15	4			
	Voriconazol		1	5	11	10	7	1			
	Posaconazol	3	1	4	11	7	6	3			
	Anfotericina B			1	6	3	9	12	4		
Flavi (n=31)	Itraconazol	2	5	7	3	3	8	2			1
	Voriconazol		1	4	6	12	5	3			
	Posaconazol	2	1	4	3	8	11	1	1		
	Anfotericina B			2	4	6	8	7	4		
Nigri (n=25)	Itraconazol			5	5	6	4	5			
	Voriconazol		2	8	2	5	5	3			
	Posaconazol		1	2	5	5	9	3			
	Anfotericina B			5	6	3	4	6	1		
Usti (n=2)	Itraconazol					1		1			
	Voriconazol			2							
	Posaconazol				1		1				
	Anfotericina B				1			1			
Terri (n=1)	Itraconazol				1						
	Voriconazol						1				
	Posaconazol				1						
	Anfotericina B					1					

Células em amarelo: valores de CIM que classificam os isolados como resistentes para o respectivo fármaco;

Células em azul: valores de CIM que classificam os isolados como não-selvagens, com possível mecanismo de resistência subjacente.

Tabela 06. Intervalo de valores de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ de 4 antifúngicos em 35 isolados da seção Fumigati, obtidos de secreção respiratória, 2017-2021

Antifúngico	CIM (mg/L)		
	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀
ITZ	0,03 - 1	0,5	1
VOR	0,03 - 1	0,25	0,5
POS	0,015 - 1	0,12	1
AMB	0,06 - 2	0,5	2

ITZ, itraconazol; VCZ, voriconazol; POS, posaconazol, AMB, anfotericina B

Tabela 07. Intervalo de valores de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ de 4 antifúngicos frente a 31 isolados da seção Flavi, obtidos de secreção respiratória, 2017-2021

Antifúngico	CIM (mg/L)		
	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀
ITZ	0,015 - 8	0,12	0,5
VOR	0,03 - 1	0,25	0,5
POS	0,015 - 2	0,25	0,5
AMB	0,06 - 2	0,5	1

ITZ, itraconazol; VCZ, voriconazol; POS, posaconazol, AMB, anfotericina B

Tabela 08. Intervalo de valores de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ de 4 antifúngicos frente a 21 isolados da seção Nigri, obtidos de secreção respiratória, 2017-2021

Antifúngico	CIM (mg/L)		
	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀
ITZ	0,06 - 1	0,25	1
VOR	0,03 - 1	0,25	1
POS	0,03 - 1	0,25	1
AMB	0,06 - 2	0,25	1

ITZ, itraconazol; VCZ, voriconazol; POS, posaconazol, AMB, anfotericina B

5. DISCUSSÃO

O aparecimento e incidência de micoses invasivas cresceram devido ao aumento de número de pacientes imunocomprometidos, receptores de células hematopoiéticas, pacientes com câncer, transplantados, idosos e prematuros. Apesar da ampla gama de tratamento antifúngico, poucas escolhas são realmente efetivas, e, neste cenário, a aspergilose está associada à altas taxas de morbidade e mortalidade, em especial *A. fumigatus* (NUCCI et al., 2010; NEGRI et al., 2017).

A identificação fenotípica foi insatisfatória, em pouco mais da metade dos isolados demonstrando a necessidade de realizar sempre o sequenciamento gênico de um ou mais genes, para determinação acurada da espécie, no gênero *Aspergillus*. Espécies de *Aspergillus* da seção Fumigati acometem de maneira oportunística pacientes suscetíveis e *A. fumigatus*, uma das três mais prevalentes encontrada neste estudo, segundo a identificação fenotípica realizada, é considerada a principal como agente etiológico da aspergilose pulmonar invasiva. A depender do estágio da doença e condição do paciente, pode ocasionar mortalidade de 40% a 80% (NEGRI et al., 2017).

Outras três espécies foram classificadas, segundo os testes de sequenciamento gênico. As espécies *A. sydowii* e *A. aureolus* possuem a capacidade de produzir a micotoxina esterigmagnocistina que causa carcinoma hepático e até hepatotoxicidade fatal, ou seja, em condições de crescimento ideal pode agravar o quadro de um paciente quando associado a outras doenças e/ou em casos de imunossupressão levar a óbito (TABATA, 2011; RANK et al., 2011).

A colonização prévia é considerada um fator de risco para desenvolvimento da micose invasiva e a alta frequência dessa seção, em relação às demais verificadas nas amostras respiratórias humanas, pode representar um estágio anterior à doença pulmonar. As amostras biológicas que geraram os 94 isolados foram coletadas, dentro da rotina hospitalar, para diagnóstico de pneumopatias, sendo que, em estudo paralelo, não foi relatada presença de aspergilose nessa população (dados não mostrados). Desse modo, todos os 94 isolados de *Aspergillus* foram associados a um estado de colonização do trato respiratório.

Colonização por *Aspergillus* da seção Fumigati foi descrita em pacientes com fibrose cística (KING et al, 2016; WARRIS et al, 2019) sendo *A. fumigatus* a espécie prevalente.

Bases de dados robustas, alimentadas com grandes quantidades de informação de experimentos realizados *in vitro*, conseguem atribuir a valores de CIM uma interpretação

clínica (*breakpoint*) de isolado “sensível”, “intermediário” ou “resistente”. Além de valores de CIM são considerados outros parâmetros relacionados ao fármaco, como farmacodinâmica e farmacocinética, resultados de experimentação animal e estudos clínicos. A classificação sensível é dada quando existe grandes chances de sucesso terapêutico se utilizada uma dose usual terapêutica de determinado antifúngico; de outro modo, se for necessário o ajuste da dose, ou tempo de exposição terapêutica para grande chance de sucesso na terapêutica, o isolado é classificado como intermediário (I) e quando há falha, ou ineficiência, mesmo com ajustes de dose e exposição ao medicamento, o isolado é classificado como resistente a ele (ARENDRUP et al., 2020).

A classificação de isolados resistentes ou sensíveis só podem ser determinados quando possuem valores estabelecidos de *breakpoints* clínicos de um fármaco frente a cada espécie.

O teste de triagem para ITZ apresentou o mesmo desempenho condizente com o CIM, pois demonstrou apenas um isolado (Seção Flavi) com concentração maior a 4mg/L, com resistência ao fármaco.

O presente estudo mostra destaque para 35 (37%) dos 94 isolados serem da Seção Fumigati, em que grande parte se mostrou pouco sensível aos azóis, com resistência *in vitro* altíssima frente a POS (9/35; 25%). Na literatura consultada, há casos de resistência, mas tal nível de resistência não foi, ainda, relatada (ARIKAN-AKDAGLI, 2012; HOWARD et al, 2009; JING, 2021). Isso induz que, em algum momento e provavelmente os isolados tiveram contato direto, ou indiretamente, com qualquer outro composto dessa classe química, sofrendo pressão seletiva para resistência. Fatores como tratamento profilático ou até mesmo a utilização de substâncias com princípios físico-químico ou farmacológicos semelhantes, podem ter induzido ou até mesmo selecionado subpopulações com mecanismo de resistência ativa. A presença de fungicidas azólicos em meio ambiente agrícola é considerada uma via de seleção de isolados ambientais resistentes a essa classe química (JING et al., 2021; TOYOTOME et al., 2020).

Na seção Fumigati, ainda, foi notável a resistência à AMB (4/35; 11,4%), confirmando achados anteriores em isolados clínicos (BADDLEY et al., 2009) Sabendo-se que muitos pacientes de aspergilose são tratados com AMB, tal dado deve ser considerado relevante frente a situação de falha terapêutica com o polieno.

Dentre os 31 isolados da seção Flavi, foi verificada resistência ao ITZ, ainda que em baixa frequência (1/31;3,2%). Essa taxa, em relação a estudos prévios, foi alta, considerando

isolados clínicos, pois esta seção normalmente não está associada a graus de resistência (ROMERO et al., 2019).

No caso da seção Nigri, apenas para AMB há ponto de corte clínico, o que permite evidenciar a baixa ocorrência (1/21; 4,8%) de resistência a esse potente fármaco.

Os resultados da sensibilidade do único isolado da seção Terrei, frente aos azóis e, principalmente, à AMB contrastam com o conceito de resistência intrínseca ao polieno em membros dessa seção. Tão logo, a espécie seja identificada pelo sequenciamento gênico, poder-se-á verificar, se o isolado for *A. terreus*, a raridade do achado laboratorial.

O EUCAST definiu valores de corte clínicos, conhecidos como *breakpoints*, na utilização de antifúngicos azólicos e anfotericina B, somente para algumas espécies de *Aspergillus*. Quando não existem *breakpoints*, para interpretação clínica dos resultados de CIM, é possível utilizar pontos de corte epidemiológicos (ECOFFs) definidos para cada espécie frente aos distintos fármacos. A definição dos valores de ECOFFs vem da compilação e análise estatística de inúmeros dados de CIM, disponíveis para cada espécie frente a cada antifúngico, gerando curvas de distribuição normal. O limite superior da curva, para um par espécie-antifúngico, permite separar um isolado selvagem de um não-selvagem. Em teoria, os isolados selvagens não apresentam nenhum mecanismo de resistência, incluindo mutação, pois nunca foram expostos aos fármacos, enquanto os isolados não-selvagens podem apresentar mecanismos de resistência subjacentes (LOCKHART, 2020; ARENDRUP et al., 2020).

Uma parcela considerável de isolados de Fumigati, ainda que não resistente, foi classificada como não selvagem a um ou mais fármacos, incluindo VCZ, medicamento de escolha na terapêutica de casos de aspergilose. Tais isolados não selvagens podem possuir mecanismos de resistência que podem ser expressos em situações de estresse fúngico, como a verificada na vigência de terapia azólica, levando ao aumento de valores de CIM e alterando sua classificação para resistente. Essa situação hipotética ilustra a importância do estudo da sensibilidade de isolados clínicos dessa seção de grande importância na clínica de micoses invasivas.

Porcentagem relativamente alta de isolados não selvagens (2/31; 6,5%) a POS, em relação a VCZ, foram identificados na seção Flavi, mostrando a possibilidade de mecanismos de resistência subjacentes ao mais novo azol e alertando para necessidade de monitoramento da dimensão dessa problemática e sua relação com casos clínicos submetidos a tratamento com esse medicamento.

No caso da seção Usti, representada neste estudo por 2 isolados, não há valores interpretativos, sejam clínicos ou epidemiológicos, de acordo com o EUCAST, portanto no presente momento, não é possível estabelecer se os isolados identificados são resistentes ou sensíveis ou intermediários aos azóis e AMB.

Seria de grande valia o sequenciamento genético para confirmação de espécie e busca de mecanismos de resistência, seja por mutação no *cyp51A* ou aumento de bombas de efluxo, em todos os isolados não selvagens. Esses procedimentos contribuiriam para implementação de novos e validação dos pontos de corte epidemiológicos já propostos, além de proporcionarem elucidação das estratégias de escape antifúngico por diversos membros das 5 seções observadas neste estudo.

Comparado com outros estudos, o número de isolados de *Aspergillus* não-selvagens com potencial para conter algum mecanismo de resistência a azóis foi superior neste estudo, frente a cepas resistentes identificadas e analisadas em diversos países, principalmente no continente europeu e asiático (MEIS et al., 2016).

O aparecimento de cepas de *Aspergillus* resistentes ou não-selvagens no estado de Mato Grosso do Sul, motiva à implantação de políticas de vigilância e implementação de pesquisas sobre a problema atípica da resistência nos agentes de importante micose invasiva em pacientes suscetíveis. Por se tratar de patógenos presentes no dia a dia da população e por estar associado à altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados, faz-se necessária a observação da alteração do estado de colonização para desenvolvimento de doença pulmonar.

6. CONCLUSÕES

A análise fenotípica permitiu indicar *Aspergillus* das seções Fumigati, Flavi e Nigri, como prevalentes na colonização do trato respiratório de pacientes, com sintomatologia pulmonar, justamente, as mais implicadas em casos de aspergilose.

Dentre as espécies de *Aspergillus*, confirmadas por método genotípico em 36 isolados, *A. fumigatus* (52,9%) foi a mais frequente e que representa o agente etiológico de maior importância clínica. Sendo a colonização prévia, um fator de risco para desenvolvimento da infecção, a presença de agentes com forte caráter oportunista nessa condição pode conferir maior valor clínico a esse cenário.

As seções de *Aspergillus*, com exceção de Usti e Terrei para a qual não há valores para interpretação da sensibilidade antifúngica, apresentaram isolados resistentes ou não selvagens para um ou mais dos antifúngicos analisados.

A alta resistência ao posaconazol e à anfotericina B observada em isolados da seção Fumigati, além da resistência à anfotericina B em isolados de Nigri, merecem destaque pois atentam para eventual falha terapêutica em casos infectados por agentes etiológicos dessas seções.

O presente trabalho demonstrou a menor sensibilidade a antifúngicos de isolados da região de Mato Grosso do Sul, em relação àquela descrita para isolados recuperados de amostras clínicas respiratórias de pacientes atendidos em outras regiões do país, motivando outros estudos que busquem hipóteses causais para essa ocorrência..

7. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**, 2004. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em: 9 out. 2021
- ADAM, K. et al. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **J. Agric. Food Chem**, v. 46, n. 5, p. 1739–1745, 4 nov. 1998.
- ARENDRUP, M. C. et al. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.2. p. 23, 2020.
- ALVAREZ-MORENO, C. et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45631, maio 2017.
- ARIKAN-AKDAGLI, S. Azole resistance in *Aspergillus*: global status in Europe and Asia: Azole resistance in *Aspergillus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1272, n. 1, p. 9–14, dez. 2012.
- ARENDRUP, M. C. et al. Development of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy Associated with Change in Virulence. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10080, 9 abr. 2010.
- BADDLEY, J. W. et al. Patterns of Susceptibility of *Aspergillus* Isolates Recovered from Patients Enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3271–3275, out. 2009.
- BEAUVAIS, A.; LATGÉ, J.-P. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 1, p. 38–49, fev. 2001.
- BEISSWENGER, C.; HESS, C.; BALS, R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon-signalling in respiratory epithelial cells. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 2, p. 411–418, 1 fev. 2012.
- BENNET, J. W. An overview of the Genus *Aspergillus*. **Caister**, 2016.
- BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. NOVIDADES EM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS: UMA REVISÃO. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, 31 dez. 2004.
- BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.
- CAROLUS, H. et al. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 27 nov. 2020.

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, 15 ago. 2017.

DENARDI, L. B. et al. Evaluation of the efficacy of a posaconazole and anidulafungin combination in a murine model of pulmonary aspergillosis due to infection with *Aspergillus fumigatus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 1, p. 40–43, jan. 2018.

DENNING, D. W. et al. Fungal allergy in asthma—state of the art and research needs. **Clinical and Translational Allergy**, v. 4, n. 1, p. 14, dez. 2014.

DENNING, D. W. Invasive Aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 781–805, 1998.

DENNING, D. W. et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1364–1368, jun. 1997.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. **Version 3**, 2022. <http://www.eucast.org>.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, **Version 10.0**, 2020. <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65–82, 2015.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Extrólites of *Aspergillus fumigatus* and Other Pathogenic Species in *Aspergillus* Section *Fumigati*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 7 jan. 2016.

FURLANI, Regina Prado Zanes. **Ocratoxina A em café brasileiro**. 1998. 61f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254712>>

GAGO, S.; DENNING, D. W.; BOWYER, P. Pathophysiological aspects of *Aspergillus* colonization in disease. **Medical Mycology**, v. 57, n. Supplement_2, p. S219–S227, 1 abr. 2019.

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, abr. 1995.

GUAZZELLI, L. S. et al. Bola fúngica por *Aspergillus fumigatus* em cavidade pleural. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. 1, p. 125–132, fev. 2012.

GUINEA, J. et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well

azole-containing agar plates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 6, p. 681–687, jun. 2019.

GUPTA, P. Comparative Evaluation of Disc Diffusion and E-test with Broth Micro-dilution in Susceptibility testing of Amphotericin B, Voriconazole and Caspofungin against Clinical *Aspergillus* isolates. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2015.

HAGIWARA, D. et al. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 21 set. 2016.

HAGIWARA, D. et al. A Novel Zn²-Cys⁶ Transcription Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of *Aspergillus fumigatus* by Co-regulating *cyp51A* and *cdr1B* Expressions. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006096, 4 jan. 2017.

HEBERT, M. F. et al. Concomitant Tacrolimus and Micafungin Pharmacokinetics in Healthy Volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 9, p. 1018–1024, set. 2005.

HEDAYATI, M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1677–1692, 1 jun. 2007.

HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: Principles of Pathogenesis and Host Defense. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 11, p. 1953–1963, nov. 2007.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1–51, set. 2011.

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, mar. 2020.

HOWARD, S. J. et al. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1068–1076, jul. 2009.

JING, R. et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* strains isolated from patients with otomycosis in northern China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1–9, mar. 2021.

KING, J.; BRUNEL, S. F.; WARRIS, A. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. **Journal of Infection**, v. 72, p. S50–S55, jul. 2016.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraal voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Thorax**, v. 70, n. 3, p. 270–277, 1 mar. 2015.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **European Respiratory Review**, v. 20, n. 121, p. 156–174, 1 set. 2011.

LACAZ C.S. et al. **Tratado de Micologia médica**. Rev Inst Med trop S Paulo. 2002;44(5):297-8.

LAW, N. et al. Lack of association of *Aspergillus* colonization with the development of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients: An international cohort study. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 38, n. 9, p. 963–971, set. 2019.

LOCKHART, S. R. et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates from the ARTEMIS Global Surveillance Study Is Primarily Due to the TR/L98H Mutation in the *cyp51A* Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4465–4468, set. 2011.

LOCKHART, S. R.; BEER, K.; TODA, M. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*: What You Need To Know. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 42, n. 1, p. 1–6, jan. 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. **Open Access**, v. 7, n. e018109, p. 10, 2017.

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, 5 dez. 2016.

MICHAILIDES, T.; THOMIDIS, T. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rots of peaches in Greece. **Plant Pathology**, v. 56, n. 2, p. 352–352, abr. 2007.

MICHELI, P. A. Nova plantarum genera. **Florentiae: Typis Bernardi Paperinii**, v. 24, 234 p., 1729.

MONTESINOS, I. et al. Culture-Based Methods and Molecular Tools for Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Detection in a Belgian University Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2391–2399, ago. 2017.

MURRAY, P. R.; ROSSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia: Médica** 5ª edição, Elsevier Editora Ltda, 2006.

NEGRI, C. E. et al. Triazole Resistance Is Still Not Emerging in *Aspergillus fumigatus* Isolates Causing Invasive Aspergillosis in Brazilian Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, nov. 2017.

NICOLLE, M. C. et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. **haematologica**, v. 11, n. 96, p. 1685–1691, 2011.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, set. 2010.

O’GORMAN, C. M. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 151–157, out. 2011.

- OHARA, S. et al. Clinical characteristics of patients with *Aspergillus* species isolation from respiratory samples: Comparison of chronic pulmonary aspergillosis and colonization. **Respiratory Investigation**, v. 54, n. 2, p. 92–97, mar. 2016.
- ONISHI, K. et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* Containing a 34-bp Tandem Repeat in *cyp51A* Promoter is Isolated from the Environment in Japan. **Medical Mycology Journal**, v. 58, n. 2, p. E67–E70, 2017.
- PACHECO, A. M. et al. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, p. 5, 2010.
- 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, 15 ago. 2016.
- 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, 15 maio 2006.
- PILANIYA, V. et al. Acute invasive pulmonary aspergillosis, shortly after occupational exposure to polluted muddy water, in a previously healthy subject. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 473–477, out. 2015.
- RANK, C. et al. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. **Fungal Biology**, v. 115, n. 4–5, p. 406–420, abr. 2011.
- ROMERO, M. et al. Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Aspergillus* spp.: When Local Epidemiology Breaks the Norm. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 41, 21 maio 2019.
- ROSENBERG, M. Clinical and Immunologic Criteria for the Diagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 4, p. 405, 1 abr. 1977.
- SAMARAKOON, P.; SOUBANI, A. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. **Chronic Respiratory Disease**, v. 5, n. 1, p. 19–27, fev. 2008.
- SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, v. 47, n. s1, p. S13–S20, jan. 2009.
- SNELDERS, E. et al. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e31801, 1 mar. 2012.
- STRZELCZYK, J. K. et al. Nucleotide substitutions in the *Candida albicans* ERG11 gene of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, 16 dez. 2013.
- STYNEN, D. et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2237–2245, jun. 1992.

TABATA, S. Mycotoxins: Aflatoxins and Related Compounds. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, n. Second Edition, p. 801–811, 2011.

TOYOTOME, T. et al. Prospective survey of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens and their antifungal susceptibility: A five-year single-center study in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 2, p. 321–323, fev. 2020.

WEIGT, S. S. et al. Colonization With Small Conidia *Aspergillus* Species Is Associated With Bronchiolitis Obliterans Syndrome: A Two-Center Validation Study: *Aspergillus* Conidia Size and Risk of BOS. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 4, p. 919–927, abr. 2013.

WALSH, T. J.; HAYDEN, R. T.; LARONE, D. H. **Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2018.

WANGIKAR, P. B. et al. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 607–615, abr. 2005.

WHITE, P. L.; POSSO, R. B.; BARNES, R. A. Analytical and Clinical Evaluation of the PathoNostics AsperGenius Assay for Detection of Invasive Aspergillosis and Resistance to Azole Antifungal Drugs Directly from Plasma Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2356–2366, ago. 2017.

VAN DER LINDEN, J. W. M. et al. Clinical Implications of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007–2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1846–1854, out. 2011.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature reviews microbiology**, n. advance online publication, p. 1–14, 2017.

VERWEIJ, P. E. et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 789–795, dez. 2009.

YU, J. et al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, n. 4, p. 194–202, dez. 2005.

WARRIS, A.; BERCUSSON, A.; ARMSTRONG-JAMES, D. *Aspergillus* colonization and antifungal immunity in cystic fibrosis patients. **Medical Mycology**, v. 57, n. Supplement_2, p. S118–S126, 1 abr. 2019.

ZMEILI, O. S.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. **QJM**, v. 100, n. 6, p. 317–334, 4 maio 2007.

APÊNDICE A – Isolados utilizados para estudo

Nº	Ano	Nº Isolado	Amostra	Nome	Sexo	Idade (Anos)	Leito	SIL	Data Coleta	Gênero	Seção	Col. Gigante (d)(cm)
1	2016	1934 LB	Lavado broncoalveolar	G.C.	M	55	Ambulatório	564902	15/09/2016	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	5
2	2017	2820 LB	Lavado broncoalveolar	M.C.	F	58	Ambulatório	594341	16/01/2017	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	3
3	2017	883 E	Escarro	O.G.F.	M	50	Ambulatório	656620	10/08/2017	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	3
4	2017	1692 E	Escarro	M.M.	M	43	Ambulatório	557833	20/09/2017	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	5
5	2017	2266 ST	Secreção traqueal	O.P.N.	F	83	Unidade Coronariana/RCPO	673412	04/10/2017	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	1.5
6	2017	8165 ST	Secreção traqueal	A.S.T.	M	57	Pronto Socorro Adulto	654465	18/11/2017	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	4
7	2017	2915 E	Escarro	T.M.M.	F	23	Ambulatório	690620	29/12/2017	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
8	2018	145 ST	Secreção traqueal	F.S.M.	M	35	CTI Adulto	696586	19/01/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
9	2018	224 LA	Lavado alveolar	S.P.	F	37	Clínica Cirurgica I	698899	31/01/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	6
10	2018	2853 E	Escarro	M.C.F.	F	60	Ambulatório	689297	08/03/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	3
11	2018	695 E	Escarro	A.B.	M	67	Hospital Dia	712457	28/03/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
12	2018	725 ST	Secreção traqueal	V.F.N.	F	30	Pronto Socorro Adulto	713083	31/03/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	5
13	2018	799 E	Escarro	A.B.	M	68	Hospital Dia	715812	11/04/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
14	2018	2564 E	Escarro	D.J.S.	M	46	Hospital Dia	585069	23/04/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	3

15	2018	1142 ST	Secreção traqueal	A.A.N.	F	24	CTI Adulto	727306	25/05/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	2
16	2018	994 E	Escarro	R.C.S.	F	48	Pronto Socorro Adulto	721191	25/07/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	4
17	2018	1625 E	Escarro	N.J.A.	M	59	Pronto Socorro Adulto	743288	19/10/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	5
18	2018	1661 ST	Secreção traqueal	J. S.E.	M	37	Pronto Socorro Adulto	744634	24/10/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
19	2018	1806 ST	Secreção traqueal	J.G.S.	M	25	CTI Adulto	750734	16/11/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
20	2018	1807 ST	Secreção traqueal	J.G.S.	M	26	CTI Adulto	750734	16/11/2018	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	6
21	2019	71 ST	Secreção traqueal	M.A.L.	M	81	Pronto Socorro Adulto	787494	12/01/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
22	2019	2368 ST	Secreção traqueal	J.E.S.	M	86	CTI Adulto	769792	31/01/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	3.5
23	2019	2424 E	Escarro	A.P.C.	M	39	Pronto Socorro Adulto	771312	06/02/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
24	2019	346 ST	Secreção traqueal	P.M.C.	M	62	Pronto Socorro Adulto	797782	12/02/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>glaucus</i>	2
25	2019	475 E	Escarro	A.P.C.	M	39	Hospital Dia	802956	28/02/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
26	2019	475 E	Escarro	A.P.C.	M	39	Hospital Dia	802956	28/02/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	3
27	2019	503 ST	Secreção traqueal	J.S.O.	M	13	CTI Adulto	804318	06/03/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	5

28	2019	570 ST	Secreção traqueal	P.B.F.	M	77	CTI Adulto	807306	14/03/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	6
29	2019	657 E	Escarro	R.R.	F	36	Hospital Dia	810797	25/03/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
30	2019	666 E	Escarro	M.A.I.	F	58	Pronto Socorro Adulto	811141	26/03/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	5
31	2019	687 ST	Secreção traqueal	M.F.O.	F	79	Ambulatório	812075	28/03/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
32	2019	681 LBA	Lavado broncoalveolar	S.Q.C.	F	64	Ambulatório	811917	28/03/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	5
33	2019	681 LBA	Lavado broncoalveolar	S.Q.C.	F	64	Ambulatório	811917	28/03/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
34	2018	763 E	Escarro	M.S.	F	45	Hospital Dia	714703	06/04/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
35	2019	698 ST	Secreção traqueal	E.B.F.	F	74	CTI Adulto	812467	12/04/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	6
36	2019	1080 E	Escarro	G.R.D.	M	41	Hospital Dia	828870	20/05/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
37	2019	1090 E	Escarro	S.C.O.	F	43	Hospital Dia	829419	21/05/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	1.5
38	2019	1224 E	Escarro	L.D.S.	F	43	Pronto Socorro Adulto	834443	06/06/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
39	2019	1266 E	Escarro	M.J.O.S.	F	62	Hospital Dia	836100	11/06/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
40	2019	1283 E1	Escarro	R.S.F.	M	69	Clínica Médica	836573	12/06/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
41	2019	1283 E2	Escarro	R.S.F.	M	69	Clínica Médica	836573	12/06/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
42	2019	1317 CB	Lavado broncoalveolar	P.P.A.	M	75	Ambulatório	837665	17/06/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
43	2019	1335 E	Escarro	M.V.S.A.	M	32	Hospital Dia	838098	18/06/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
44	2019	1982 E	Escarro	A.P.C.	M	40	Hospital Dia	843098	04/07/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	>7

45	2019	1492 FP	Fragmento pulmonar	E.P.S.	M	58	Clínica Cirurgica II	843333	04/07/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>calidous tus</i>	2.5
46	2019	1504 ST	Secreção traqueal	E.A.S.A.	F	14	Pronto Socorro Adulto	843877	06/07/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
47	2019	1576 ST	Secreção traqueal	M.C.C.	F	44	CTI Adulto	846348	15/07/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
48	2019	1778 LB	Lavado broncoalveolar	N.C.S.	M	61	Ambulatório	854480	08/08/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
49	2019	1134 ST1	Secreção traqueal	A.A.S.	F	36	CTI Adulto	831175	19/08/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>terreus</i>	>7
50	2019	1134 ST2	Secreção traqueal	A.A.S.	F	36	CTI Adulto	831175	19/08/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
51	2019	1213 E	Escarro	R.S.F.	M	69	Hospital Dia	834074	28/08/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
52	2019	2565 ST	Secreção traqueal	M.L.E.	F	65	Pronto Socorro Adulto	884765	12/11/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
53	2019	2637 E	Escarro	T.M.M.	F	25	Ambulatório	886488	18/11/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	>7
54	2019	2721 ST	Secreção traqueal	S.M.S.	M	52	Ambulatório	891853	04/12/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
55	2019	2742 E	Escarro	N.J.A.	M	60	Clínica Médica	892649	06/12/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	4
56	2019	2779 E	Escarro	J.M.Q.	M	49	Hospital Dia	893937	11/12/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
57	2019	2785 E	Escarro	J.M.Q.	M	49	Hospital Dia	894353	12/12/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	4
58	2019	2827 E	Escarro	J.C.S.	M	54	Hospital Dia	896585	19/12/2019	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	5
59	2020	50 LB	Lavado broncoalveolar	W.M.A.	M	53	Hospital Dia	902258	13/01/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	3
60	2020	50 LB	Lavado broncoalveolar	W.M.A.	M	53	Hospital Dia	902258	13/01/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	4

61	2020	126 ST	Secreção traqueal	P.M.	M	72	Pronto Socorro Adulto	904874	21/01/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
62	2020	142 E	Escarro	J.M.	M	37	Hospital Dia	905479	22/01/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
63	2020	257 E	Escarro	O.G.F.	M	52	Ambulatório	910800	07/02/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
64	2020	459 E	Escarro	M.S.R.	F	39	Hospital Dia	919937	06/03/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	7
65	2020	495 E	Escarro	N.F.S.	M	39	Hospital Dia	921741	12/03/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
66	2020	495 E	Escarro	N.F.S.	M	39	Hospital Dia	921741	12/03/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	6
67	2020	967 ST	Secreção traqueal	P.M.S.	F	82	CTI Adulto	937183	29/05/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	5
68	2020	1035 ST	Secreção traqueal	G.F.L.	M	40	Unidade Coronariana/RCPO	940619	14/06/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	5
69	2020	1355 E	Escarro	B.M.M.	M	73	Hospital Dia	950890	31/07/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7
70	2020	1414 ST	Secreção traqueal	F.P.M.	M	73	CTI Adulto	952721	09/08/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	6
71	2020	1530 ST	Secreção traqueal	G.T.L.	M	49	CTI Adulto	956288	24/08/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
72	2020	1627 ST	Secreção traqueal	J.A.E.S.	M	35	Pronto Socorro Adulto	959216	05/09/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
73	2020	1737 ST	Secreção traqueal	S.M.R.	M	53	Pronto Socorro Adulto	963193	23/09/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
74	2020	1813 E	Escarro	T.M.M.	F	26	Ambulatório	965588	30/09/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
75	2020	1824 ST	Secreção traqueal	G.L.C.	M	84	CTI Adulto	966053	02/10/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
76	2020	1905 ST	Secreção traqueal	J.C.C.L.	M	41	Pronto Socorro Adulto	968456	12/10/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4

77	2020	2021 E	Escarro	T.M.M.	F	26	Ambulatório	972364	27/10/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	2
78	2020	2092 ST	Secreção traqueal	J.M.S.	M	46	Pronto Socorro Adulto	974740	05/11/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
79	2020	2116 ST	Secreção traqueal	J.M.S.	M	46	Pronto Socorro Adulto	975734	09/11/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
80	2019	2565 ST	Secreção traqueal	M.L.E.	F	65	Pronto Socorro Adulto	884765	12/11/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
81	2020	2166 E	Escarro	V.A.R.	F	58	Enfermaria DIP	978013	16/11/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
82	2020	2320 ST	Secreção traqueal	W.R.A.	M	45	CTI Adulto	985531	07/12/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	3
83	2020	2325 ST	Secreção traqueal	J.N.S.	M	85	Pronto Socorro Adulto	985601	07/12/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	6
84	2019	2785 E	Escarro	J.M.Q.	M	49	Hospital Dia	894353	12/12/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	6
85	2020	2462 ST	Secreção traqueal	P.E.M.	F	65	CTI Adulto	989907	13/12/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	5
86	2020	2404 ST	Secreção traqueal	W.R.A.	M	45	CTI Adulto	987954	15/12/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	2
87	2020	2456 E	Escarro	M.S.S.	M	29	Pronto Socorro Adulto	989757	23/12/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	5
88	2020	2472 ST	Secreção traqueal	W.R.A.	M	45	CTI Adulto	990071	24/12/2020	<i>Aspergillus</i>	<i>flavi</i>	6
89	2021	15 E	Escarro	T.M.M.	F	26	APAE	993660	11/01/2021	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigati</i>	4
90	2021	386 E	Escarro	S.B.L.	F	76	Ambulatório	007207	01/03/2021	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	6
91	2021	385 E	Escarro	S.B.L.	F	76	Ambulatório	007206	02/03/2021	<i>Aspergillus</i>	<i>nigri</i>	>7

92	2021	683 AT	Secreção traqueal	R.A.	M	78	CTI Covid PAM	017250	05/04/2021	<i>Aspergillus flavi</i>	5
93	2021	724 ST	Secreção traqueal	A.C.S.	M	44	CTI Covid PAM	018625	09/04/2021	<i>Aspergillus flavi</i>	4

ANEXO 1

Toxinas e espécies produtoras

Espécie	Toxinas
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxinas-B1, B2, G1, G2; ácido aspergílico e ácido hidroxiaspergílico; ácido oxálico
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflatoxinas-B1, B2, G1, G2
<i>Aspergillus clavatus</i>	ascladiol
<i>Aspergillus fumigatus</i>	gliotoxina
<i>Aspergillus chavalieri</i>	gliotoxina
<i>Aspergillus terreus</i>	gliotoxina; ácido terreico
<i>Aspergillus ustus</i>	austamide
<i>Aspergillus ochraceus</i>	ocratoxinas
<i>Aspergillus glaucus</i>	ácido oxálico

Fonte: ADAM et al. 1998; WANGIKAR, et al, 2005; FURLANI et al, 2001; KLICH, 2002; MICHAILIDES et al, 2007; YU et al, 2005

ANEXO 2 . Aspectos morfológicos de seções e subgêneros do gênero *Aspergillus*

SUBGÊNERO		SEÇÃO	MORFOLOGIA
Aspergillus	Unisseriado, xerofílico, conídio verde-cinza	Aspergillus	Teleomorfo Eurotium- Cleistotécio amarelo com parede composta por uma única camada de células pseudoparenquimatosas poligonais, ascósporos hialinos
		Restricti	Estritamente anamórfico, crescimento lento em todos os meios de cultivos
Ornati	Unisseriado, conídio verde-cinza, verde-amarelo ou marrom-oliva		
Nidulantes	Bisseriado, conídio com cores variadas	Nidulantes	Estipes curtas e muitas vezes marrons, conídio verde, células Hülle muitas vezes presente, muitas espécies com teleomorfo Emericella. Cleistotécio, cercado por células Hülle, ascósporos vermelhos a roxo
		Versicolores	Estipes hialina a marrom, conídio verde, verde-cinza ou verde-azul
		Usti	Estipes marrom, conídio vermelho, marrom a oliva
		Terrei	Estipes hialino, conídio castanho a marrom-laranja
		Flavipedes	Estipes hialino a marrom pálido, conídio branco a castanho
Circumdati	Unisseriado ou bisseriado, vesícula esférica piriforme	Wenti	Conídio castanho, marrom-amarelo ou marrom-oliva
		Flavi	Conídio verde-amarelo a marrom-oliva
		Nigri	Estipes parede lisa, conídio preto
		Circumdati	Predominantemente bisseriado, conídio amarelo, castanho ou ocráceo
		Candidi	Conídio branco ou quase branco
		Cremeri	Conídio marrom, amarelo ou verde-azul
		Sparsi	Conídio cinza pálido a castanho oliva
Stilbothamni	Espécies formando sinônimo		
Fumigati	Unisseriado, vesículas predominantemente piriformes, conídio verde-cinza, verde-azul a laranja	Fumigati	Conídio verde-cinza a verde-azul
		Cervini	Light-laranja a verde-laranja
Clavati	Unisseriado, vesícula predominantemente clavata, conídio verde-cinza	Clavati	Unisseriado, vesícula predominantemente clavata, conídio verde-cinza

Fonte: KLICH M. A., 2002