

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

FRANCINE DE SALES DORNELES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE
ASPERGILLUS OBTIDOS DE SOLOS, EXPOSTOS E
ISENTOS DE AZÓLICOS, NO ESTADO DE MATO
GROSSO DO SUL**

CAMPO GRANDE

2022

FRANCINE DE SALES DORNELES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE
ASPERGILLUS OBTIDOS DE SOLOS, EXPOSTOS E
ISENTOS DE AZÓLICOS, NO ESTADO DE MATO
GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Doenças Infecciosas e Parasitárias
da Faculdade de Medicina na
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, para obtenção do
Título de Mestre em Doenças
Infecciosas e Parasitárias

Área de concentração: I – Aspectos laboratoriais e epidemiológicos das
infecções fúngicas, bacterianas e virais

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcia de Souza Carvalho Melhem

CAMPO GRANDE

2022

À minha mãe, que desde o início me apoiou a ingressar no mestrado e continuar estudando

“O conhecimento serve para encantar pessoas, não para humilhá-las.”

Mario Sérgio Cortella

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à minha família, pelo amor, incentivo nos estudos, em especial à minha tia Norma Lourdes, por me emprestar seu carro para as viagens de coleta.

A minha orientadora Dr^a Marcia S. C. Melhem pela sua paciência, ensinamentos, atenção e também por acreditar na minha capacidade profissional, sempre incentivando.

Ao professor James Venturini, por me apoiar e disponibilizar toda a infraestrutura do Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LABDIP-UFMS) para a realização da pesquisa.

Ao colega Gabriel Manzi Oliboni, mestrando do PPG em Ciências da Coordenação de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, pela inestimável colaboração na recuperação, purificação, preparo dos isolados e extração de DNA para sequenciamento genético.

Ao biólogo Rogério Antonio de Oliveira, pela excelente e intensa colaboração na análise dos dados.

À Dra. Juliana Possato Fernandes Takahashi, biomédica do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelas competentes orientações e supervisão da fase pré-analítica molecular dos isolados fúngicos.

Ao Dr. Lucas Xavier Bonfietti, diretor do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo total apoio ao projeto.

À Miriam Randó de Araujo, bióloga do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pela incondicional colaboração no registro e conferência dos isolados.

À Equipe do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de

Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (LEMDI- UNICAMP), por me receberem bem, pelo carinho, companheirismo, ajuda na realização do projeto e por todo conhecimento compartilhado. Em particular, aos colegas Carlos Alberto Passinho Campos, Cibele Tararam, Larissa Levi e aos Drs. Maria Luiza Moretti e Dr. Plínio Trabasso.

À biomédica Dálity Keffelen Rodrigues, pela ajuda para finalização dos experimentos no LabDIP.

Aos meus colegas do laboratório LabDIP–FAMED-UFMS, pelo apoio, amizade e ajuda na realização do projeto.

À Profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang por proporcionar toda a infraestrutura para as análises morfológicas no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS.

À Nayara Moreno do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS, por todo apoio laboratorial e convívio.

Ao colega do PPG-DIP, Murillo Palhares, pela participação na organização dos fluxos de procedimentos necessários ao desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias pelo trabalho realizado.

Ao Leonardo Castro dos Santos, por me acompanhar nas viagens pelo Estado de Mato Grosso do Sul, nas coletas de amostras do projeto.

À JICA, pelo apoio financeiro necessário para aquisição de insumos e infraestrutura do LEMDI-UNICAMP, fundamentais para desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Akira Watanabe da Universidade de Chiba, pelas preciosas sugestões e encaminhamentos do projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro para estágio no LEMDI-FCM-UNICAMP e pela bolsa de mestrado concedida.

Ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa ofertada à orientadora.

À FAPESP, pelo apoio na infraestrutura concedida ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, para realização de procedimentos laboratoriais

RESUMO

A ocorrência de falha terapêutica com fármacos da classe dos azóis, em pacientes com aspergilose invasiva, é um desafio na prática médica. Fatores predisponentes do hospedeiro e resistência antifúngica da cepa infectante são atores importantes nesse cenário. A resistência em *Aspergillus*, fungo ubíquo na natureza, é atribuída às duas vias de exposição: clínica, por tratamentos longos, ou ambiental, por contato prévio com fungicidas triazólicos utilizados na agricultura para controle de fungos fitopatógenos. Mutações idênticas, responsáveis pela resistência a azóis, ocorrem em cepas ambientais e clínicas, reforçando uma hipótese: resistência cruzada entre fármacos e agrotóxicos triazólicos. O estudo, descritivo e prospectivo, investigou frequência de resistência a triazólicos, em espécies ambientais de *Aspergillus* no estado de Mato Grosso do Sul e correlação entre exposição ambiental a fungicidas. Lavouras (n=9), caracterizando o ambiente pulverizado, e agroflorestas (n=3), representando o ambiente isento de pulverização, localizadas em sete municípios do estado. Amostras de solo (n=61) foram processadas e semeadas em meio DRBC e proporcionaram isolamento de 131 colônias de *Aspergillus*, classificadas por análise morfologia, em quatro seções, Fumigati (50%), Nigri (18%), Terrei (16%) e Flavi (16%). A identificação de espécie por sequenciamento do gene *benA* foi realizada em 68 isolados, proporcionando a verificação de 10 espécies: *A. fumigatus* (50%), *A. terreus* (10%), *A. niger* (10%), *A. flavus* (9%), *A. alabamensis* (6%), *A. tubingensis* (4%), *A. tamaritii* (3%), *A. caelatus* (2%), *A. parasiticus* (3%) e *A. brasiliensis* (3%). Assensibilidade dos isolados a 3 fármacos, itraconazol (ITC), voriconazol (VCZ), posaconazol (POS) e a 2 fungicidas triazólicos, tebuconazol (TEB) e difenoconazol (DIF) foi determinada pelo valor de MIC, segundo procedimentos e pontos de corte, epidemiológico e clínico, do comitê EUCAST. Isolados resistentes, ou não selvagens (NWT), a azóis foram encontrados em alta frequência (92,6%) e em todas as espécies, com destaque para multirresistência a ITC, VCZ e POS em três isolados de *A. fumigatus*. Solo de lavouras teve origem de maior resistência (37%), em relação ao de agroflorestas (29%). *A. fumigatus* resistente a azóis foram recuperados com maior frequência de lavouras, em relação às agroflorestas. A existência da rota da resistência ambiental nos agentes de

aspergilose foi comprovada no estado de MS. No entanto, sua relação do uso de fungicidas azólicos de uso agrícola não foi evidenciada, mantendo em aberta a questão do impacto de fungicidas na pressão seletiva de resistência em *Aspergillus*.

Palavras-chaves: triazol, fungicida, antifúngico, fungo, resistência, aspergilose

ABSTRACT

The occurrence of therapeutic failure with drugs of the azole class, in patients with invasive aspergillosis, is a challenge in medical practice. Host predisposing factors and antifungal resistance of the infecting strain are important actors in this scenario. Resistance in *Aspergillus*, a ubiquitous fungus in nature, is attributed to two exposure routes: clinical, by long-term treatments, or environmental, by previous contact with triazole fungicides used in agriculture to control phytopathogenic fungi. Resistance mutations, responsible for resistance to azoles, activities in environmental and clinical strains, reinforcing a hypothesis: resistance between drugs and pesticides. The study, descriptive and prospective, investigated the frequency of resistance to triazoles in environmental species of *Aspergillus* in the state of Mato Grosso do Sul and environmental exposure to fungicides. Crops (n=9), characterizing the sprayed environment, and agroforests (n=3), representing the spraying environment, located in seven municipalities in the state were sampled by opportunity criterion. Soil samples (n=61) were processed and seeded in DRBC medium and provided isolation of 131 *Aspergillus* colonies, classified by morphological analysis, in four sections, Fumigati (50%), Nigri (18%), Terrei (16%) and Flavi (16%). *A. species* by benA gene sequencing was performed in identification of 68 isolates, a. identification of 10 species: *A. fumigatus* (50%), *A. terreus* (10%), *A. niger* (10%), *A. flavus* (9%), *A. alabamensis* (6%), *A. tubingensis* (4 %), *A. tamarii* (3%), *A. caelatus* (2%), *A. parasiticus* (3%) and *A. brasiliensis* (3%). The sensitivity of the isolates to 3 drugs, itraconazole (ITC), voriconazole (VCZ), posaconazole (POS) and 2 triazole fungicides, tebuconazole (TEB) and difenoconazole (DIF) was determined by the MIC value, according to procedures and cut-off points, epidemiological and clinical, of the EUCAST committee. Resistant isolates, or non-wild (NWT), azoles were found in high frequency (92.6%) and in all species, with emphasis on multi-resistance to ITC, VCZ and POS in three isolates of *A. fumigatus*. Soil from traditional crops was the source of greater resistance (37%), in relation to agroforestry (29%). *A. fumigatus* resistant to azoles were recovered more frequently from crops than from agroforests. The existence of an environmental resistance route in aspergillosis agents has been proven in the state of MS. However, their relationship to the use of azole fungicides for

agricultural use was not evidenced, leaving open the question of the impact of fungicides on the selective pressure of resistance in *Asperillus*.

Keywords: triazole, fungicide, antifungal, fungus, resistance, aspergillosis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: Aspergilose bronco pulmonar alérgica

AI: Aspergilose invasiva

IPA: Aspergilose invasiva pulmonar

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

APC: Aspergilose pulmonar crônica

ATCC: *American type culture collection*

DFZ: Difeconazol

ECOFF: *Epidemiologic Cutoff Value*, ponto de corte epidemiológico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ITC: Itraconazol

ITS: *Intergenic Transcribed Spacer*

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*, concentração inibitória mínima

NWT: *non wild-type*, não selvagem

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase

POS: Posaconazol

q-PCR: PCR em tempo real

WT: *Wild-type*, selvagem

DRBC: *Dicloran Rose Bengal*, dicloram rosa bengala

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração da organização e planejamento de agrofloresta.....28
- Figura 2. Mapa do estado do Mato Grosso do Sul, com marcação dos municípios amostrados para isolamento de *Aspergillus* do solo, onde: vermelho, municípios com lavouras pulverizadas e azuis, municípios com agroflorestas. As setas pontilhadas ampliam os nomes dos municípios.....29
- Figura 3. Ilustração da divisão de uma lavoura e a escolha aleatória das quadras para realização das coletas de solo30
- Figura 4 Ilustração da coleta de amostra de solo para isolamento de *Aspergillus*. A. Esquema de coleta de solo. B. Sacos estéreis para coleta.....31
- Figura 5. Placa de 96 poços para teste de sensibilidade, ilustrando o controle positivo, início da diluição (maior concentração), fim da diluição (menor concentração), controle negativo e duas cepas padrão.....35
- Figura 6. Colônias, com centro escuro e bordas claras e franjadas, características de *Aspergillus*, desenvolvidas em meio dicloram rosa bengala, a partir de amostra de solo de fazenda, Município de Coxim, MS (2020).....38
- Figura 7 . Frequência de seções de *Aspergillus* observada em 68 amostras de solo de lavouras e agroflorestas, estado de Mato Grosso do Sul (2020-2021).....39
- Figura 8 . Frequência de espécies de 68 isolados de *Aspergillus*, recuperados de solos de agroflorestas e lavouras de sete municípios de Mato Grosso do Sul (2020-2021).....40
- Figura 9. Frequência de espécies, determinadas por sequenciamento do gene β -*tubulina*, de 68 isolados de *Aspergillus* obtidos de solo de lavouras e

agroflorestas, Mato Grosso do Sul (2020-2021).....40

Figura 10 Frequência de espécies de 68 isolados de *Aspergillus*, recuperados de solos de agroflorestas e lavouras, sete municípios de Mato Grosso do Sul (2020-2021).....41

Figura 11 Frequência de espécies de 68 isolados de *Aspergillus*, recuperados de solos de agroflorestas e lavouras, sete municípios de Mato Grosso do Sul (2020-2021).....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies resistentes a três fármacos azólicos em 68 isolados amostras de solo de agroflorestas e lavouras, Mato Grosso do Sul (2020-2021).....	42
Tabela 2 Espécies não selvagens a três fármacos azólicos, em 68 isolados de amostras de solo de agroflorestas e lavouras, Mato Grosso do Sul (2020-2021).....	43
Tabela 3 Frequência de isolados resistentes ou não selvagens (EUCAST) de quatro espécies mais relevantes de <i>Aspergillus</i> , segundo origem do solo, Mato Grosso do Sul (2020-2021).....	43
Tabela 4 Correlação de Pearson do ambiente não pulverizado, frente a três antifúngicos e dois fungicidas.....	44
Tabela 5 Correlação de Pearson do ambiente pulverizado, frente a três antifúngicos e dois fungicidas.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação de DNA do gene da <i>β-tubulina</i> 2A/2B.....	33
Quadro 2. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene <i>β-tubulina</i>	34
Quadro 3. Ocorrência de 20 fenótipos, resistentes ou não selvagens* a azóis, em 26 isolados de <i>Aspergillus</i> provenientes de solo de agroflorestas (MS, 2020-2021).....	46
Quadro 4. Ocorrência de 16 fenótipos, resistentes ou não selvagens* a azóis, em 37 isolados de <i>Aspergillus</i> provenientes de solo de lavouras (MS, 2020-2021).....	47
Quadro 5. Ocorrência de 4 fenótipos de <i>Aspergillus</i> , sensíveis aos fármacos azólicos, em 4 isolados de solo de agroflorestas e 1 isolado de solo de lavoura (MS, 2020-2021).....	47

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Aspectos clínico-epidemiológicos da aspergilose	18
1.2 Mutações em cepas clínicas e ambientais.....	21
1.3 Agrotóxicos	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Local, período e desenho da pesquisa	28
3.2 Amostras de solo	29
3.3 Coleta, processamento de amostras de solo e identificação dos isolados	30
3.3.1 Classificação em seção	31
3.3.2 Identificação de espécie.....	32
3.3.3 Extração de DNA genômico	32
3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase	33
3.3.5 Eletroforese em gel de agarose	33
3.3.6 Reação de sequenciamento	34
3.3.7 Precipitação do DNA com etanol	34
3.3.8 Análise de resultados de sequenciamento	35
3.4 Determinação da sensibilidade a compostos triazólicos	35
3.4.1 Interpretação dos valores de MIC	36
3.4.2 Glossário de termos usados para interpretação da sensibilidade antifúngica.....	Er
ro! Indicador não definido.	
4. RESULTADOS	38
4.1 Coletas e recuperação de isolados	38
4.2. Identificação morfológica	39
4.3 Identificação molecular.....	41
4.4 Sensibilidade a antifúngicos	42
4.5 Sensibilidade a fungicidas	47
4.6 Fungicidas utilizados nas lavouras	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS	66
ANEXO 1	75
APÊNDICE 1	75
APÊNDICE 2	76

1.INTRODUÇÃO

A indústria do agronegócio no Brasil e, em particular, no estado de Mato Grosso do Sul, movimentou a economia do país. No entanto, para otimizar a produção de alimentos para a população em constante crescimento, o uso de pesticidas agrícolas tem sido amplo e irrestrito. O tratamento das sementes, folhas e frutos inclui fungicidas da classe química dos azóis. A problemática que se apresenta é que triazóis representam os principais medicamentos empregados no manejo de micoses invasivas, como aquelas produzidas por fungos filamentosos ubíquos, como *Aspergillus fumigatus*. Dados epidemiológicos demonstram existência em todos os continentes, com exceção da Antártica, de cepas resistentes aos triazóis nessa espécie, devido às mutações genéticas. Esse mecanismo de resistência foi descrito em pacientes de aspergilose sob longa terapia com triazóis e, também, em outros virgens de tratamento, o que sugere a existência de uma via ambiental de resistência através da exposição agrícola a fungicidas azólicos. Desse modo, a rota ambiental poderia ser a responsável pela falha terapêutica em pacientes não tratados previamente com triazóis. O dimensionamento real da resistência ambiental em *A. fumigatus* e outros agentes de aspergilose faz-se necessária considerando-se um viés na interpretação da literatura relacionada à amostragem: regiões e ambientes que foram extensivamente amostrados são mais prováveis de apresentarem maior taxa de resistência a azóis, apesar da possibilidade de resistência poder ser mais prevalente em áreas subamostradas ou nunca investigadas. O aumento da vigilância para identificar reservatórios ambientais de resistência, ao lado do uso racional de medicamentos azólicos, é necessário para preservar essa classe de antifúngicos protegendo cultivos e restaurando a saúde em casos de aspergilose.

1.1 Aspectos clínico-epidemiológicos da aspergilose

Aspergilose é uma doença causada por espécies do gênero *Aspergillus* por via inalatória após inalação de esporos presentes em bioaerossóis no ar atmosférico. As espécies estão, amplamente, dispersas em vegetação, em particular, em estágio de decomposição que propicia sua multiplicação pelo material de compostagem. Desse modo, trabalhadores agrícolas estão mais

sujeitos a inalar grandes volumes de conídios capazes de causar infecção (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Além disso, ambientes úmidos e sem ventilação, ou climatizados, promovem acúmulo de conídios e crescimento de colônias dentro de habitações, estabelecimentos comerciais e hospitalares (MOUSTAFA, 2019).

A aspergilose apresenta-se sob diversas formas clínicas, doenças alérgicas, como sinusite, rinite, formas cutâneas como otite e formas mais graves como aspergilose invasiva pulmonar (IPA), aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) aspergilose pulmonar crônica (MARR; PATTERSON; DENNING, 2002). A infecção primária pulmonar pode ser local ou se disseminar via hematogênica. As respostas imunológicas e outros fatores do hospedeiro pode determinar as manifestações clínicas da aspergilose. A forma crônica compreende as manifestações inflamatórias e aspergilomas, massas denominadas “bolas fúngicas”, mais frequentes em pacientes com cavidades pré-existentes como aqueles com tuberculose. A incidência da doença crônica era, em 2017, estimada em 3 milhões de pacientes, anualmente, mas se reconhece que o número de casos novos é subestimado e, portanto, os dados são imprecisos (LATGÉ; CHAMILOS, 2019; BONGOMIN et al., 2017).

A aspergilose invasiva é a forma mais grave da doença, que atinge pacientes imunocomprometidos, em particular, aqueles sob tratamentos imunossupressivos ou sob transplantes e outros procedimentos cirúrgicos, estimada em afetar 250 000 pacientes, globalmente, e com incidência crescente (LATGÉ et al., 2019). O aumento é atribuído ao incremento de pacientes neutropênicos pelo uso de tratamentos imunossupressivos para doenças hematológicas, transplante de células hematopoiéticas e órgãos sólidos (LATGÉ, 1999).

No Brasil as micoses sistêmicas não são doenças de notificação compulsória, portanto, não há dados epidemiológicos sobre a real incidência, prevalência e mortalidade atribuída à aspergilose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Na atualidade, observa-se alteração epidemiológica na aspergilose em pacientes neutropênicos, para não neutropênicos, como os hospitalizados por infecções virais graves, tais como influenza e Covid. Dentre os casos não

responsivos ao tratamento, a mortalidade é de 50% a 100% (SALMANTON-GARCÍA et al., 2021; (MEIS et al., 2016; JENKS; HOENIGL, 2018).

Óbitos por aspergilose invasiva em pacientes sem histórico de terapia antifúngica prévia, mas com alta resistência a tratamento com azóis, estão relacionadas à presença de mutações gênicas associadas à resistência, em especial em *A. fumigatus* (VAN DER LINDEN et al., 2011; CHOWDAHRY A., 2012; LOCKHART et al., 2011; MORIO F. et al., 2012; PFALLER M., 2011). A espécie *A. fumigatus* é a mais frequente em relatos de resistência aos triazóis (SNELDERS et al. 2009). O clássico relato sobre resistência dessa espécie, de Denning e colaboradores (1997), descreveu dois pacientes com aspergilose invasiva (AI) que foram tratados com anfotericina B, sendo um deles, homem de 40 anos com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana- HIV, apresentou resistência clínica após 3 meses de tratamento. A terapia foi substituída por itraconazol (ITC), o que resultou em melhora clínica por, apenas, um curto período de tempo, seguido na falha de adesão ao tratamento e culminando com óbito um ano depois.

Aspergilose invasiva é tratada, primariamente, com antifúngicos triazólicos, mas há três classes de antifúngicos que podem ser utilizadas: polienos, triazóis e equinocandinas (GROLL; KOLVE, 2004). A preferência pelos azóis no tratamento da aspergilose é devido à sua atividade, ainda que menos potente, mas com menos reações adversas, se comparada à anfotericina B. Porém, os azóis possuem a desvantagem da ocorrência da resistência cruzada entre compostos dessa classe química, ademais, o excesso de sua utilização tem provocado o aparecimento de resistência adquirida (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; GOODMAN; GILMAN, 1996; WILLIAMS; LEMKE, 2002).

Os principais fármacos antifúngicos, usados na aspergilose, depletam (anfotericina B) ou interrompem a biossíntese (triazóis) do ergosterol, lipídeo que confere rigidez à membrana celular fúngica. A perda de ergosterol leva à desestruturação e ruptura da membrana, com perda de íons e, conseqüente morte celular (ação fungicida dose- dependente). A inibição da biossíntese do ergosterol impede a reprodução celular (ação fungistática) provocando o acúmulo de lipídios precursores tóxicos para a célula (ação fungicida tempo- dependente). Este mecanismo de ação, exercido pelos fármacos azólicos, tem

fundamento na sua ligação com a enzima esterol-14- α -demetilase, codificada pelo gene *cyp51* alelos A, B (fungos filamentosos) ou *erg11* (leveduras) (HAGIWARA et al. 2016).

1.2 Mutações em cepas clínicas e ambientais

Na atualidade, diversas espécies de *Aspergillus* apresentam mecanismos de resistência a um, ou mais fármacos, da mesma classe química (resistência cruzada) ou classes distintas (multirresistência), consistindo em preocupação mundial (SANGLARD; ODDS 2002). A resistência pode se dar por diversos motivos, e o principal relato na clínica são os longos tratamentos, com exposição constante aos fármacos azólicos (HAGIWARA et al. 2016). Além da resistência adquirida ao longo da terapia com azóis, em *A. fumigatus* foi estabelecida uma conexão com o meio ambiente, principalmente, solo exposto a compostos triazólicos destinados ao controle de fungos fitopatógenos. Um estudo com amostras de solos, contaminados e não contaminados com fungicidas, resultou em recuperação de *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. terreus*, como fungos com baixa sensibilidade a herbicidas e fungicidas (BORDJIBA et al., 2001).

O encontro de cepas ambientais azol-resistentes de *A. fumigatus*, em várias regiões do mundo, indica a existência de uma segunda rota de resistência, além da já conhecida terapia prolongada em casos de aspergilose. Essa rota está associada à fatores ambientais, em particular, ao uso de fungicidas triazólicos na agricultura e exportação de flores (VAN DER LINDEN et al., 2015). Outras formas de uso e dispersão de azóis em meio ambiente devem ser levadas em consideração, como o cetoconazol e fluconazol em xampus e o uso veterinário, mas não têm comparação ao uso agrícola que é imensamente mais abrangente e em escala mundial (BOWYER; DENNING, 2014).

Estudos comprovam que a aplicação dos herbicidas ocasiona maior contagem de fungos no solo, muitos produtos químicos podem ser utilizados pelos fungos como nutriente e fonte de energia, porém, o excesso dessas substâncias causa preocupação ambiental, sobretudo, por conta dos efeitos a microbiota local e, com os azóis, não seria diferente (ARAÚJO; MONTEIRO; ABARKELI, 2003; WARDLE E PARKINSON, 1990^{ab}). O trabalho de Colla e colaboradores (2008), descreveu fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, com alta taxa de crescimento em meios com elevadas doses de

atrazine, herbicida seletivo para cultura de milho, sugerindo tais gêneros como biorremediadores para solos contaminados com triazóis. O estudo relata que os microrganismos, quando ocasionados ao estresse de compostos químicos, tornaram-se adaptados aos compostos poluentes de meioambiente.

Entre os compostos químicos utilizados na agricultura, os fungicidas são os mais frequentes, podendo selecionar isolados resistentes ao fungicidas e outros compostos da mesma classe, como os fármacos (YANG et al., 2012). Os fungicidas azólicos utilizados na agricultura possuem a intenção de controlar fungos fitopatógenos, sendo, também, extensivamente utilizados na conservação de madeiras. Os fungos, saprófitas de solo e vegetais sendo expostos de forma acidental a fungicidas triazólicos, podem expressar mecanismos de resistência aplicáveis a qualquer composto dessa classe química como uma estratégia de adaptação e sobrevivência (ZHANG et al., 2017).

Enquanto, em determinadas regiões há disponibilidade de poucos triazóis para manejo adequado da aspergilose, na agricultura a oferta de formulações fungicidas triazólicas é bem alta. Cerca de 25 fungicidas azólicos são autorizados e utilizados, mundialmente, para controle de doenças em plantas, tendo alguns deles forte semelhança química com o ITC, POS e VCZ (BOWYER; DENNING, 2014). Os fungicidas azólicos são os principais em venda no mundo na indústria agrícola, com finalidade de controlar fungos filamentosos como os agentes da ferrugem de grãos, frutas, legumes e plantas ornamentais; leveduras em cereais, larvas de frutas, videiras e tomates (SNELDERS, E. et al., 2009; CHOWDHARY, A. et al., 2013). A agricultura utiliza toneladas de azóis por ano. No Reino Unido a exposição de fungos aos fungicidas é considerado baixa por metro quadrado, porém, pequenas áreas podem ter probabilidade maior em selecionar cepas com mutações gênicas associadas à resistência a triazóis (BOWYER; DENNING, 2014).

As pulverizações ambientais com fungicidas azólicos parecem proporcionar seleção de cepas ambientais contendo mutações no gene *cyp51* e em sua região promotora, em especial, TR34/L98H, como descrito na China e Índia (CHOWDHARY, 2012; LOCKHART et al., 2011; MORIO F. et al., 2012;

PFALLER M., 2011). Na Holanda, um estudo descreveu resistência clínica em casos de AI e fez relação da resistência à mutação idêntica vista em amostras ambientais. No estudo a mutação TR46/Y121F/T289A foi observada em 15 pacientes, no qual 8 foram diagnosticados com AI resistente ao VCZ. Destes 8 casos, apenas 2 haviam recebido tratamento antifúngico ou tiveram contato com algum azol, anterior ao estudo. Após 12 semanas de tratamento, 4 deles faleceram e outros 2 tiveram infecções persistentes. Os pacientes falecidos utilizaram VCZ, antifúngico para o qual o estudo prova que houve altos índices de resistência. Obtiveram 140 isolados ambientais, as mutações TR34/L98H e TR46/121F/T289A foram encontradas em 90% (126/140) e 10% (14/140), respectivamente. A mutação TR34/L98H, já havia sido registrada na Holanda, tanto em ambiente clínico como ambiental, considerando-se então a TR46/Y121F/T289A uma nova e terceira mutação como mecanismo de resistência. A nova mutação incluía 3 alterações genômicas, as quais a terapia prolongada com azóis dificilmente seria a única causa. A mutação TR46/Y121F/T289A estava relacionada à alta resistência ao VCZ nos pacientes e ocorreu, também, no meio ambiente, indicando seleção de cepas resistentes por meio de fungicidas (VAN DER LINDEN, Jan. W. M. et al. 2013).

ZHANG e colaboradores (2017) relataram cepas de *Aspergillus* mutantes e resistentes em pacientes que nunca receberam tratamento com triazóis, e foi sugerida infecção por inalação de cepa ambiental exposta a fungicidas triazólicos que adquiriu resistência cruzada a fármacos da mesma classe. Como exemplos de resistência cruzada, espécies de *Colletotrichum* expostas a azóis na agricultura, podem ter relevância clínica e apresentar multirresistência e/ou resistência cruzada a antifúngicos azólicos (SERFLING, A.; WOHLRAB, J.; DEISING, H. B. 2007).

A hipótese de resistência cruzada em cepas clínicas é reforçada pelos casos de AI, virgens de tratamento e, portanto, com maior probabilidade de resistência por aquisição da infecção por cepa já resistente no meio ambiente e não por mutações decorrentes de tratamentos de longa duração (CHOWDHARY et al. 2013). Em LAVERGNE et al. (2015) um paciente do sexo masculino de 23 anos, com fibrose cística, diagnosticado com aspergilose alérgica broncopulmonar (ABPA), havia histórico de exposição a compostos azólicos. O

tratamento foi iniciado com VCZ e o isolado, em teste de sensibilidade, mostrou alto índice de resistência ao antifúngico administrado. O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado e revelou mutações TR46/Y121F/T289A, provocando a substituição de VCZ por POS e caspofungina. As cepas armazenadas de anos anteriores do mesmo paciente apresentaram resistência ao itraconazol e VCZ e o sequenciamento de *cyp51* indicou que paciente já havia sido colonizado por isolados mutantes TR46/Y121F/T289A e todos eram resistentes. A partir dessas informações, estudos ambientais com amostras de solos foram realizados pela equipe, não se obtendo isolados com mutação (LAVERGNE et al., 2015).

A mesma mutação TR46/Y121F/T289A foi observada em amostras de solos na Índia, podendo haver ligação de resistência clínica com resistência ambiental. Nesse país, cepas de *A. fumigatus* provenientes de solo de campos de cultivo de beringela, mostarda, batata e plantas medicinais como feno-gredo, apresentaram resistência a fungicidas azólicos e aos fármacos VCZ e ITC. A realização de PCR em tempo real (q-PCR) permitiu mostrar mutações L98H e TR46/Y121F/T289A (STEINMANN et al., 2015).

A busca por cepas mutantes resistentes, tornou-se presente, globalmente. VanDer Linden e colaboradores (2015) investigaram a resistência a azóis em *A. fumigatus*, a nível internacional, em um estudo multicêntrico. Diversos países europeus participaram da pesquisa. Os antifúngicos testados foram ITC, VCZ e POS. De 46 pacientes com aspergilose, 41,3% apresentavam alguma mutação relacionada a fungicidas triazólicos, sendo elas TR34/L98H ou TR46/Y121F/T289A. A alta resistência clínica foi comprovada quando, de 17 centros de pesquisa, a maioria das cepas (64,7%) demonstrou isolados com mutações, prevalecendo instituições de países europeus.

Na América do Sul, poucos estudos foram realizados e na Colômbia foram encontradas cepas ambientais de *A. fumigatus* resistentes a azóis. Solo coletado em canteiros de flores, campos e jardins públicos revelaram existência de *A. fumigatus* em 19,8% de 86 amostras, apenas 9,3% dos isolados se desenvolveram sem dificuldades em ágar suplementado com ITC ou VCZ, indicando sua resistência a azóis. Os isolados de *A. fumigatus* possuíam mutações, sendo 80,9% TR46/Y121F/T289A, e apenas, 9,5% continham TR53,

4,76% apresentavam TR34/L98H e 4,76% resistentes. Todos os isolados contendo mutação TR46/Y121F/T289A se desenvolveram em ágar contendo VCZ e ITC, enquanto aqueles com TR53 ou TR34/L98H, além da cepa selvagem para *cyp51A*, desenvolveram-se apenas na placa com ITC, sendo inibidos nas placas com VCZ (ALVAREZ-MORENO et al., 2017).

A alta resistência de *A. fumigatus* aos azóis, refletida em altos valores de concentração inibitória mínima (MIC) determinadas *in vitro* ao ITC, VCZ e POS, tem ganho espaço nas pautas de saúde pública (BOWYER; DENNING, 2014). No Brasil muitas pesquisas são realizadas na identificação molecular de *Aspergillus* como pragas agrícolas, demonstrando ser um fungo realmente importante e preocupante em diversos cultivos, mas não há pesquisas sobre resistência e mutações, pois o objetivo se limita a identificação e testar o nível das toxinas, produzidas por esses fungos no solo, que podem ocasionar dano às sementes (BALINI et al.2015).

1.3 Agrotóxicos

O uso de agrotóxicos tem aumentado em todo o mundo e seu uso frequente e excessivo provoca diversos efeitos nos microrganismos e auxiliam na contaminação ambiental. Importante, ainda, ressaltar que recuperar um ambiente pulverizado com azóis pode requerer um longo período de tempo, pois tais compostos podem permanecer ativos em diversos nichos por vários meses (CHOWDHARY et al., 2013) podendo, ainda, permanecer em resíduos vegetais durante o processo de compostagem (SNELDERS et al., 2009). Muitos agrotóxicos agem de forma seletiva, mas podem de forma indireta acarretar alterações e pressão seletiva na microbiota do solo (WARDLE; PARKINSON, 1990^{ab}).

No Brasil, ao contrário de muitos países, ao volume vendido de antifúngicos é desconhecido, ou não está disponível em base de dados mundiais, mas o país possui a terceira maior área agrícola, depois dos Estados Unidos e China, chegando a 236.879.000 ha, como subsídio para dar uma visão da problemática dos agrotóxicos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED, 2020 ^{a, b})

Na possibilidade de ocorrência de pressão seletiva de cepas ambientais

resistentes aos azóis, torna-se interessante incremento de investigações para essa triagem em ambientes em que são utilizados fungicidas para correlação com dados oriundos de estudos em ambientes com total isenção, ou baixa contaminação, por triazólicos (SANGLARD, 2016).

Devido à alta frequência da seção Fumigati, não somente no cenário clínico, mas também em meio ambiente, e da resistência aos medicamentos azólicos, são necessários estudos com identificação precisa dos isolados de *Aspergillus* de diversas fontes bióticas e abióticas e determinar a sensibilidade *in vitro* para dimensionar a problemática da resistência nos membros desse importante gênero na clínica de doenças infecciosas. Estudos ambientais com agentes de infecções fúngicas invasivas e seu perfil de resistência antifúngica têm papel importante na elucidação da patogênese de espécies de *Aspergillus* e unem conhecimentos emergentes e os futuros desafios terapêuticos sobre esse patógeno oportunista.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar espécies de *Aspergillus* presentes em solos, pulverizados e não pulverizados com fungicidas, e caracterizar sua sensibilidade a compostos triazólicos, no estado de Mato Grosso do Sul, entre 2020 e 2021.

2.2 Objetivos Específicos

- I) Classificar as seções e identificar as espécies de *Aspergillus* presentes em solos de plantios expostos e não expostos a fungicidas azólicos;
- II) Investigar a sensibilidade dos isolados aos fármacos: itraconazol, voriconazol e posaconazol;
- III) Identificar sensibilidade dos isolados a fungicidas azólicos: tebuconazol e difeconazol;
- IV) Analisar ocorrência de resistência cruzada entre os fármacos azólicos e fungicidas;
- V) Investigar os tipos de fungicidas usados nas lavouras onde foram obtidas as amostras do estudo e correlacionar resistência e exposição prévia a fungicida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, período e desenho da pesquisa

Os fungos foram isolados do solo de dois ambientes distintos: plantio pulverizado com fungicidas triazólicos (lavoura) e plantio sem pulverização (agrofloresta), representando um ambiente contaminado com azólicos e outro isento.

Agrofloresta, também denominada de sistema agroflorestal (SAF), é uma técnica de plantio familiar que reuni vantagens ambientais e econômicas, contribuindo com a segurança alimentar e economia dos agricultores e consumidores. O que caracteriza uma agrofloresta e a diferencia principalmente do monocultivo normalmente adquirido nas grandes produções agrícolas é a diversidade de cultivos numa mesma área de plantio. Na mesma área pode haver plantas frutíferas, madeireiras, graníferas ornamentais, medicinais e ferragens. A cultura é semeada conforme o espaçamento e a necessidade de luz, fertilidade e porte, levando em conta o tipo de copa de cada cultura de forma combinadas (Figura 1.). Neste ambiente a reciclagem de nutrientes no solo é mais eficiente e rápida pela queda de folhas e ramos, favorecendo a atuação de microorganismos no solo, além de ser um ambiente que não há a intenção na utilização de fungicidas, agrotóxicos e herbicidas (ARMANDO; BUENO; ALVES; CAVALCANTE, 2002).

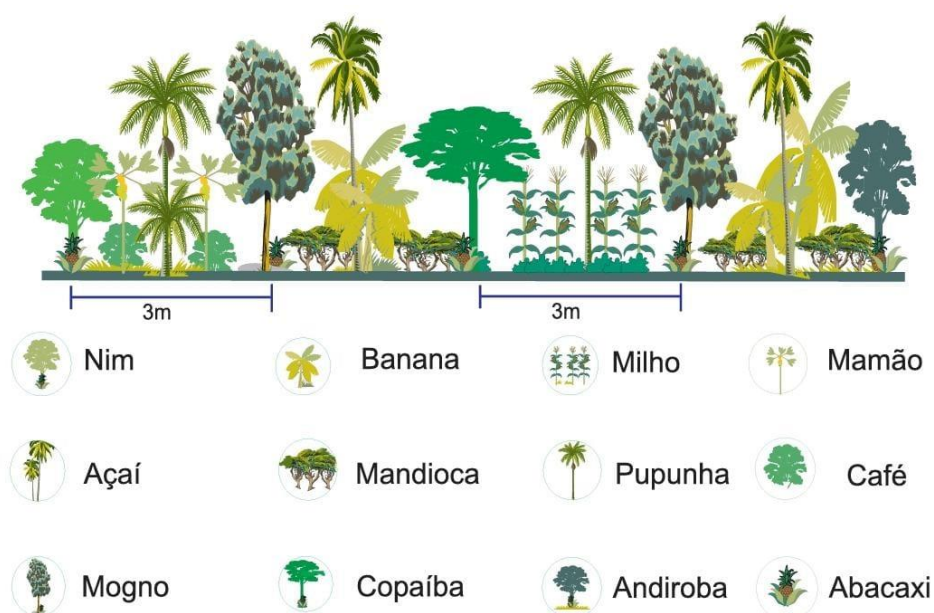


Figura 1. Ilustração da organização e planejamento de agrofloresta (ARMANDO; BUENO; ALVES; CAVALCANTE, 2002).

3.2 Amostras de solo

Onze coletas com 61 amostras de solo, foram realizadas no período de 2020 a 2021, em sete municípios do estado de Mato Grosso do Sul (Figura 2). Aos agricultores foi indagado o tipo de fungicida utilizado nas lavouras.

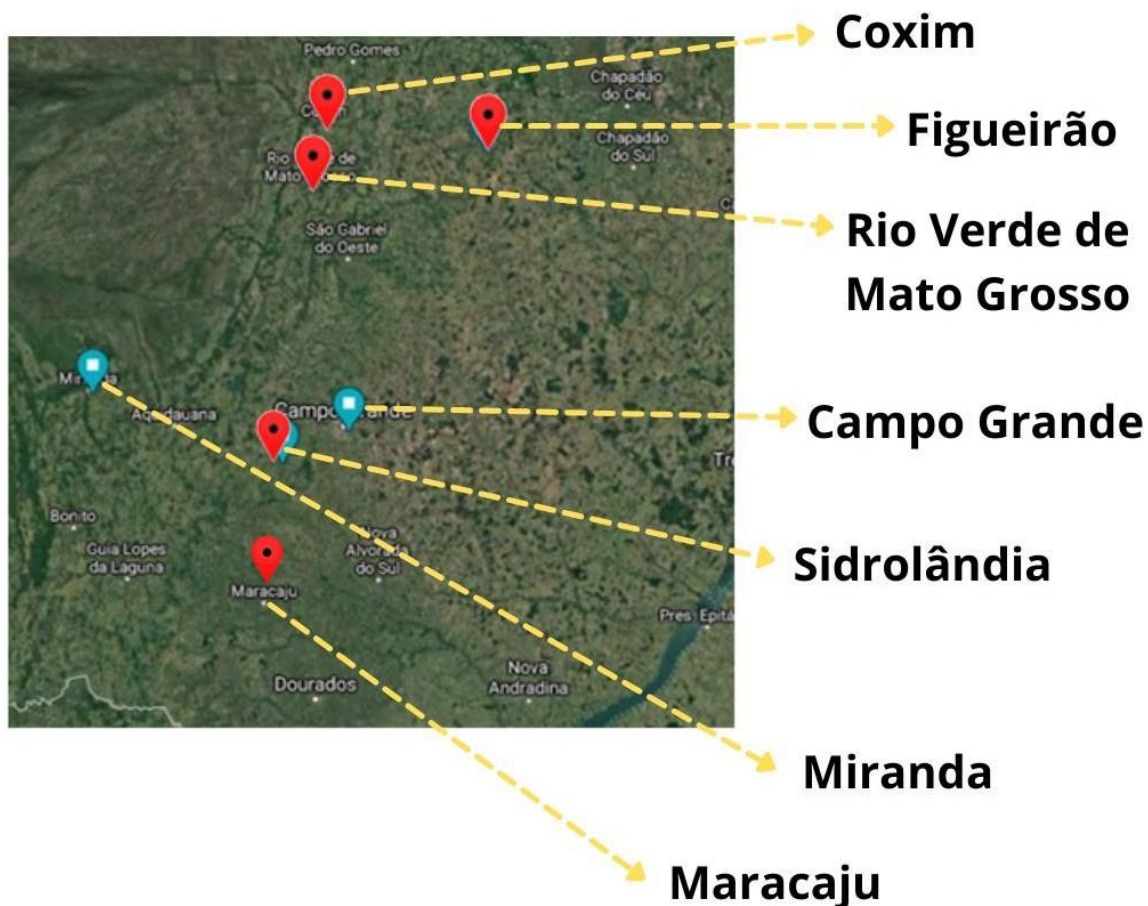


Figura 2. Mapa do estado do Mato Grosso do Sul, com marcação dos municípios amostrados para isolamento de *Aspergillus* do solo, onde: vermelho, municípios com lavouras pulverizadas e azuis, municípios com agroflorestas. As setas pontilhadas ampliam os nomes dos municípios. Fonte: Google Maps, com modificações realizadas no CANVA online, por Francine Dorneles

As coletas foram realizadas em três agroflorestas e nove lavouras. As agroflorestas eram localizadas nos municípios de Miranda (1), Sidrolândia (1) e Campo Grande (1) e as lavouras nos municípios de Rio Verde de Mato Grosso (3), Sidrolândia (3), Coxim (1), Figueirão (1) e Maracajú (1).

Em todos os municípios foram realizadas coletas de solo de três áreas diferentes do mesmo terreno. O terreno era dividido em quadras pelos proprietários. Para as coletas as quadras foram escolhidas de forma aleatória (Figura 2).

Município 1
Fazenda 1
Data: 13/08/2021
Quadras de 1 a 9 (Q)

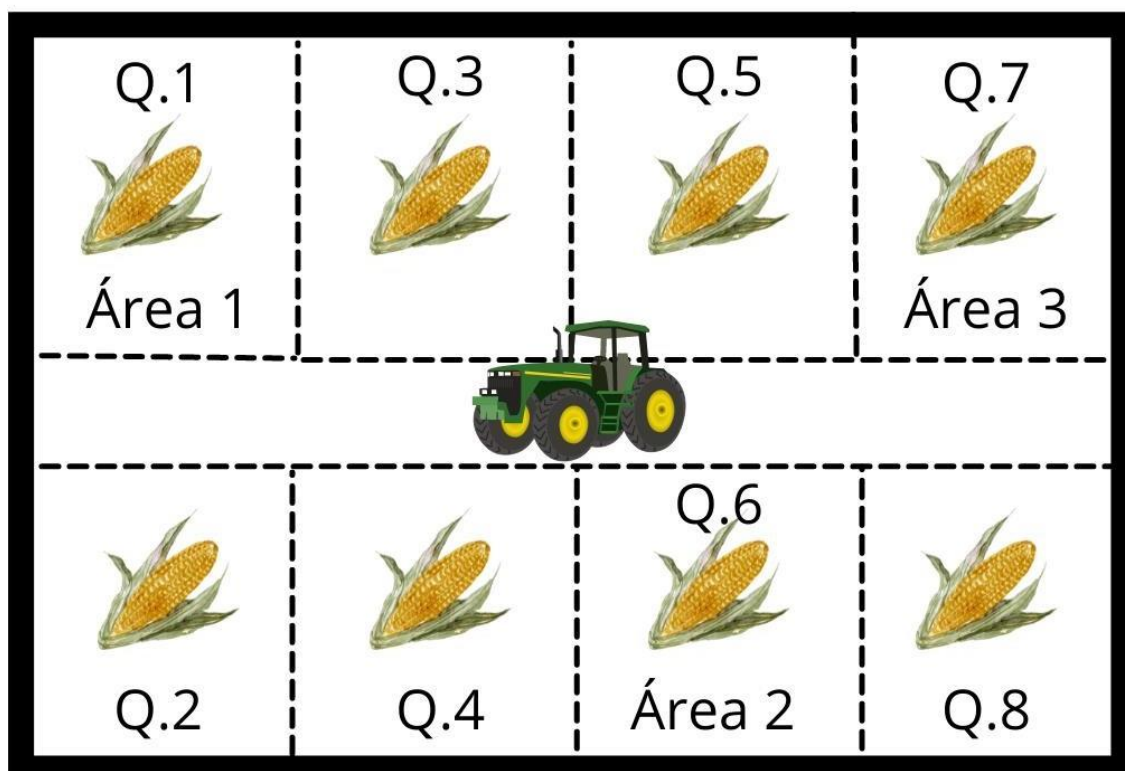


Figura 3. Ilustração da divisão de uma lavoura e a escolha aleatória das quadras para realização das coletas de solo. Fonte: Ilustração realizada no CANVA online, por Francine Dorneles.

3.3 Coleta, processamento de amostras de solo e identificação dos isolados

Foram coletados e armazenados em sacos plásticos estéreis (Nasco Whirl-Park®), aproximadamente, 100g de solo, em profundidade de 15 cm (Figuras 3A e 3B) em 3 áreas distintas da mesma horta/plantio de forma aleatória (Figura 3). Cinco gramas de cada amostra foram suspensos em 20 mL de solução salina estéril (0,85%), agitada por 2 minutos e deixada à sedimentação por 5 minutos. Do sobrenadante, foi retirado 4 mL e transferido para tubo cônico onde foi adicionado 1mL de solução de penicilina cristalina 1.200.000 UI (4,5

mg/mL) e estreptomicina (10mg/mL) (SILVA et al., 2015). Cem microlitros dessa suspensão foram semeados em 5 placas de Petri, contendo ágar *Dicloran Rosa Bengala* (DRBC) seguido de incubação a 35°C por até 7 dias.



Figura 4 Ilustração da coleta de amostra de solo para isolamento de *Aspergillus*. A. Esquema de coleta de solo. B. Sacos estéreis para coleta. Fonte: A. ilustração realizada no CANVA online, por Francine Dorneles. B. arquivo pessoal.

3.3.1 Classificação em seção

Todas as colônias, com características de *Aspergillus*, foram retiradas das placas contendo amostras de solo, assim que apresentaram crescimento. Porção de cada colônia foi analisada sob microscópio ótico e aquelas com micromorfologia de *Aspergillus* foram semeadas em ágar Sabouraud, incubado a 35°C, para procedimentos de identificação e determinação da sensibilidade.

A classificação em seção foi com base em tempo de crescimento, coloração dos fungos, além das características das colônias frente e verso na placa de petri para uma pré seleção para isolamento, após o isolamento era observado a morfologia da colônia, por técnica de colônia gigante em ágar Czapeck e análise das estruturas microscópicas em ágar batata (LACAZ; PORTO; HEINS-VACCARI; MELO, 1998; HOUBRAKEN et al., 2020)

Esta fase do estudo foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição

da UFMS.

Os fungos que cresceram nas mesmas placas foram separados em fenótipos, pois, quando realizado o teste de sensibilidade observou-se alta similaridade entre aqueles recuperados de mesma amostra de solo. Por exemplo, uma colônia encontrada em uma palca de petri com características indicativas de *Fumigati* e na segunda placa da mesma região apresentou uma colônia com as mesmas características, ambas foram consideradas para o TSA fenótipo 1.

3.3.2 Identificação de espécie

Os isolados foram identificados em espécie por sequenciamento do gene *benA* que codifica a β -*tubulina*. Todos os sequenciados foram comparados ao banco de dados de referência do *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).

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.3.3 Extração de DNA genômico

Colônias, com crescimento de 72h em ágar batata, foram utilizadas como fonte de conídios, removidos com auxílio de *swab*, para preparo de suspensão para extração de DNA genômico (Kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral, Bioclin- QuiBasa). A extração foi realizada seguindo o protocolo do fabricante, com algumas modificações, como o acréscimo de proteinase K e maior tempo de incubação, utilizando 15 μ L a 20 μ L de proteinase K, dependendo da coloração da colônia, escura a preto ou amarelada, seguida de incubação *overnight*. Para colônias de coloração esverdeada foi utilizado 15 μ L de proteinase K, seguida de incubação por 60min.

Esta fase foi desenvolvida no Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação do DNA extraído foi realizada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) convencional, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da β -*tubulina*, 2A GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT e β -*tubulina* 2B ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (GLASS; DONALDSON, 1995).

Esta fase foi desenvolvida no Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Quadro 1. Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação de DNA do gene da β -*tubulina* 2A/2B.

Parâmetro	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30s	
Anelamento	58	30s	40
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	1 min	1
Refrigeração	4		∞

3.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, a 100V por 25 minutos. Para a corrida foi utilizado 1 μ L de *Novel Juice* (GeneDirex) para cada 3 μ L de amostra e, como referência de peso molecular, foi utilizado 5 μ L de DNA *Ladder* e utilizado o marcador *Novel Juice* conforme as orientações do fabricante. Os fragmentos foram observados sob iluminação ultravioleta, através do equipamento transluminador *Amersham Imager 600* (GE Healthcare).

Esta fase foi desenvolvida no Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

3.3.6 Reação de sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados, enzimaticamente, com a utilização da enzima *ExoSap-IT Express* (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os produtos da PCR foram sequenciados para *benA* com utilização dos iniciadores *forward* e *reverse*, utilizando o *Big DyeTM Terminator v.3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para o sequenciamento, foram preparadas reações contendo *Big Dye Terminator*, solução tampão, iniciador *forward* ou *reverse* (cada *primer* em um tubo distinto), produto de PCR purificado e água milli-Q. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *PRO FLEX PCR System* (Applied Biosystems).

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Quadro 2. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene β -*tubulina*

Parâmetro	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	10 s	
Anelamento	55	5 s	30
Extensão	60	4 min	
Refrigeração	4		∞

3.3.7 Precipitação do DNA com etanol

Após a reação de sequenciamento, os produtos das reações de sequenciamento, passaram por precipitação 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, sob 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, sob temperatura de 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e as amostras passaram por secagem a vácuo. Após a precipitação e lavagem com etanol,

foram acrescentados 10 µL de formamida HI-DI às amostras, que foram incubadas em banho seco à 95°C por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo, durante 3 minutos, aplicadas na placa de sequenciamento e levadas ao sequenciador.

3.3.8 Análise de resultados de sequenciamento

As análises das sequências obtidas foram realizadas no programa *Sequencher* 5.2.4. e foram comparadas com as sequências de *benA* 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), buscando a porcentagem de similaridade com as espécies mais próximas, e conseqüentemente, a identificação molecular da espécie.

3.4 Determinação da sensibilidade a compostos triazólicos

Os testes de sensibilidade a VCZ, ITC e POS foram realizados de acordo como método, para determinação de MIC por diluição em caldo, para fungos filamentosos preconizado pelo Comitê Europeu de Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (EUCAST) no documento E.DEF.9.3.2 (EUCAST, 2020). Para validar os testes foram utilizadas 2 cepas-controle de qualidade: *Candida krusei* ATCC 6258, com ponto de corte clínico entre 0,03-0,125 mg/L para ITC, 0,03-0,25 mg/L para VCZ e 0,016-0,06 mg/L para POS e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, com ponto de corte clínico entre 0,03-0,125 mg/L para ITC, 0,03-0,25 mg/L para VCZ e 0,016-0,06 para POS, seguindo o documento de rotina nas estendidas infernais controle de qualidade para determinação de MIC nas diluições em ágar para leveduras, bolores e dermatófitos, conforme recomendado por EUCAST. Testes de sensibilidade a fungicidas azólicos: difenoconazol, tebuconazol foram realizados da mesma forma empregada para os fármacos triazólicos (Figura 5).

Todos os testes de sensibilidade foram realizados no Lab-DIP- FAMED-UFMS.

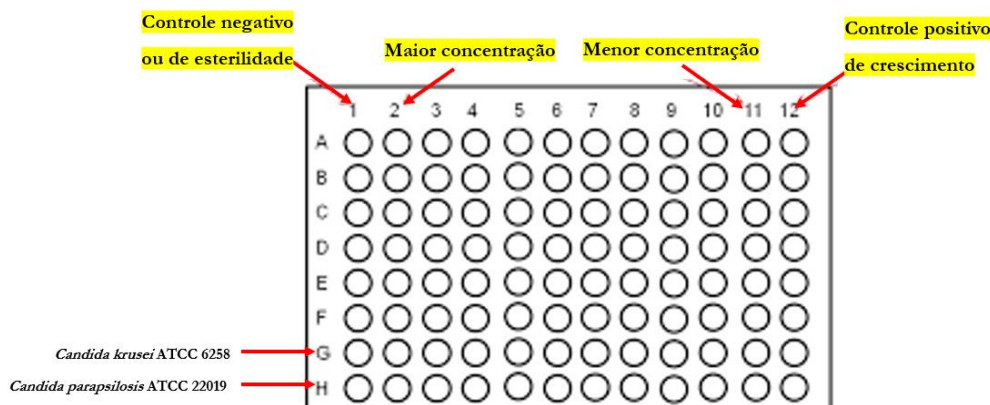


Figura 5. Placa de 96 poços para teste de sensibilidade, ilustrando o controle positivo, início da diluição (maior concentração), fim da diluição (menor concentração), controle negativo e duas cepas padrão.

3.4.1 Interpretação dos valores de MIC

A interpretação dos resultados de MIC de ITC, VCZ e POS foi feita com base nos valores de pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) e clínicos (*breakpoints*) propostos pelo comitê EUCAST disponível em <https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals> (Acesso em 20/02/2022) e descritos no Anexo 1. Na ausência de pontos de corte clínicos, ECOFFs foram utilizados, como parâmetro interpretativo de MIC, também disponibilizados no mesmo endereço eletrônico.

O ponto de corte clínico permite classificar o isolado em sensível ou resistente e o ECOFF categoriza em selvagem (*wild-type, WT*) ou não selvagem (*non-wild-type, NWT*), com possível mecanismo de resistência subjacente.

A resistência de *A. fumigatus* foi definida de acordo com os pontos de corte clínicos do EUCAST, ou seja, em concentrações >1 mg/L para ITC e VCZ >2 mg/L e >0,25 mg/L para POS.

Para *A. terreus*, os pontos de corte clínico para ITC >1 mg/L e >0,25 para POS, e para VCZ para o qual o valor de corte epidemiológico (ECOFF) de ≤ 1 mg/L foi usado como pontos de corte.

A resistência de *A. flavus* foi definida de acordo com os pontos de corte clínico em concentrações >1 mg/L para ITC. Para POS e VCZ foram utilizados ECOFFs de ≤ 0,5 mg/L e ≤ 2 mg/L, respectivamente.

Para *A. niger*, não há pontos de corte clínicos e, portanto, os isolados foram caracterizados apenas como selvagem ou não selvagem, de acordo com ECOFFs de ≤ 4 mg/L para ITC, ≤ 2 para VCZ e $\leq 0,5$ para POS.

Para as demais espécies, não há pontos de corte e, para fins deste estudo, foram adotados aqueles definidos para a espécie da mesma seção. Assim, para *A. brasiliensis* e *A. tubingensis* utilizou-se os ECOFFS definidos para *A. niger*, para *A. alabamensis*, *A. tamaritii*, *A. parasiticus* e *A. caelatus* aqueles definidos para *A. terreus*.

Para interpretação de MIC dos fungicidas foi calculado o ponto de corte epidemiológico, para cada um, com base no valor necessário para inibir 95% dos isolados (CLSI, 2016).

As frequências de isolados resistentes e isolados não sensíveis, dentro de cada espécie, dentro de cada ambiente (lavoura e agrofloresta) e dentro de cada local foram calculadas com base nos postos de corte, como descrito.

Outro cálculo de tais frequências foi realizado para fins exploratórios. Após a interpretação dos valores de MIC foram definidos fenótipos pela similaridade da sensibilidade antifúngica aos fármacos e fungicidas, segundo a espécie de *Aspergillus*. Valores de MICs similares, i.e., com variação de até 2 diluições na razão 2, permitiram agrupamento de indivíduos semelhantes formando um fenótipo. Quando isolados recuperados da mesma amostra de solo apresentavam um único fenótipo, estes eram considerados como um único indivíduo. Este agrupamento foi adotado para um segundo cálculo de frequência de resistência neste estudo.

4. RESULTADOS

4.1 Coletas e recuperação de isolados

Em todos os municípios foram realizadas as três coletas previstas, de solo de três áreas diferentes do mesmo terreno, exceto na agrofloresta de Sidrolândia em que foram realizadas sete coletas. Isto se deveu ao fato do terreno se encontrar em processo de preparo de plantio, expansão e acréscimo de adubo e fertilizantes, criando oportunidade para coleta de solo antes do adubo e depois de acrescentá-lo, além de amostra adicional obtida de terreno justa posto, sem modificações sob forma de desmatamento ou alteração do solo. De 61 amostras de solo, foram recuperados 131 isolados (Apêndice 1), dos quais, foram selecionados 68 isolados de solo, para identificação de espécie (Apêndice 2). Um exemplo do crescimento de múltiplas colônias de *Aspergillus*, a partir de amostras de solo, consta da Figura 6.

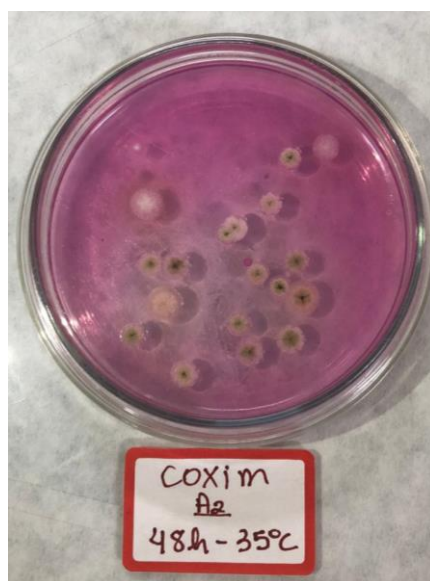


Figura 6. Colônias, com centro escuro e bordas claras e franjadas, características de *Aspergillus*, desenvolvidas em meio dicloram rosa bengala, a partir de amostra de solo de fazenda, Município de Coxim, MS (2020). Fonte: Francine S. Dorneles Arquivo pessoal.

4.2. Identificação morfológica

Nos 68 isolados foram observadas características morfológicas que permitiram classificação em quatro seções: Fumigati (50%), Nigri (18%), Terrei (16%) e Flavi (16%) (Figura 7). O ambiente pulverizado apresentou maior abundância de *Aspergillus*, 55% (37/68) (Figura 8). A distribuição dos isolados da seção Fumigati, 57% (21/37), foram maiores no ambiente pulverizado e da seção Nigri 26% (8/31), Flavi 19% (6/31) e Terrei 13% (4/31) maiores no ambiente orgânico (Figura 9).

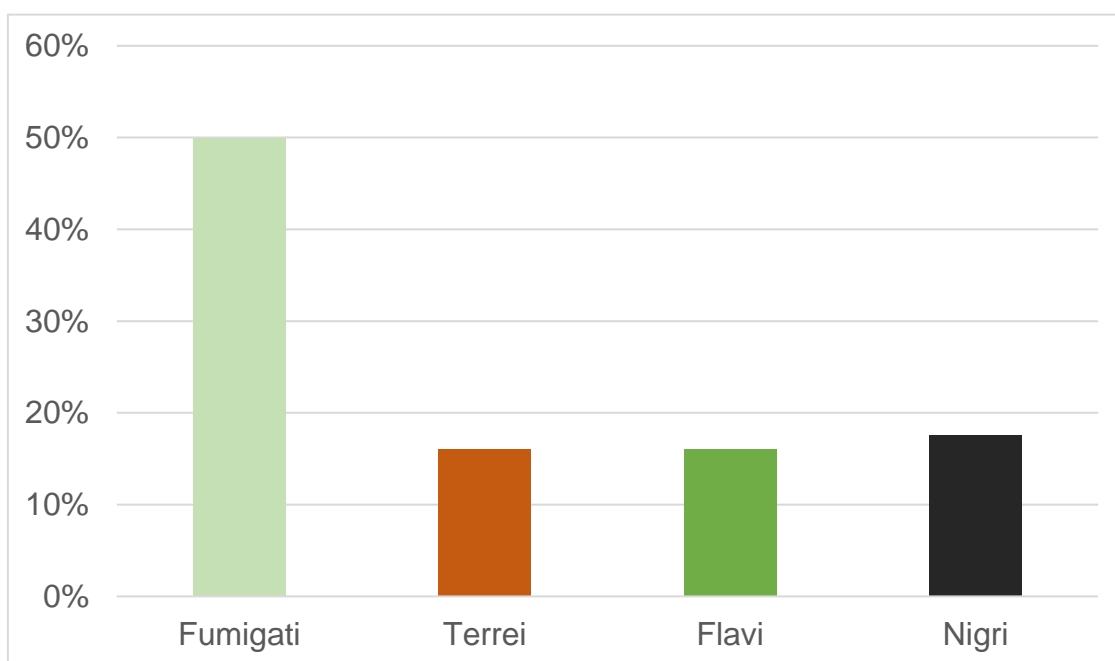


Figura 7 . Frequência de seções de *Aspergillus* observada em 68 isolados de solo de lavouras e agroflorestas, estado de Mato Grosso do Sul (2020-2021).

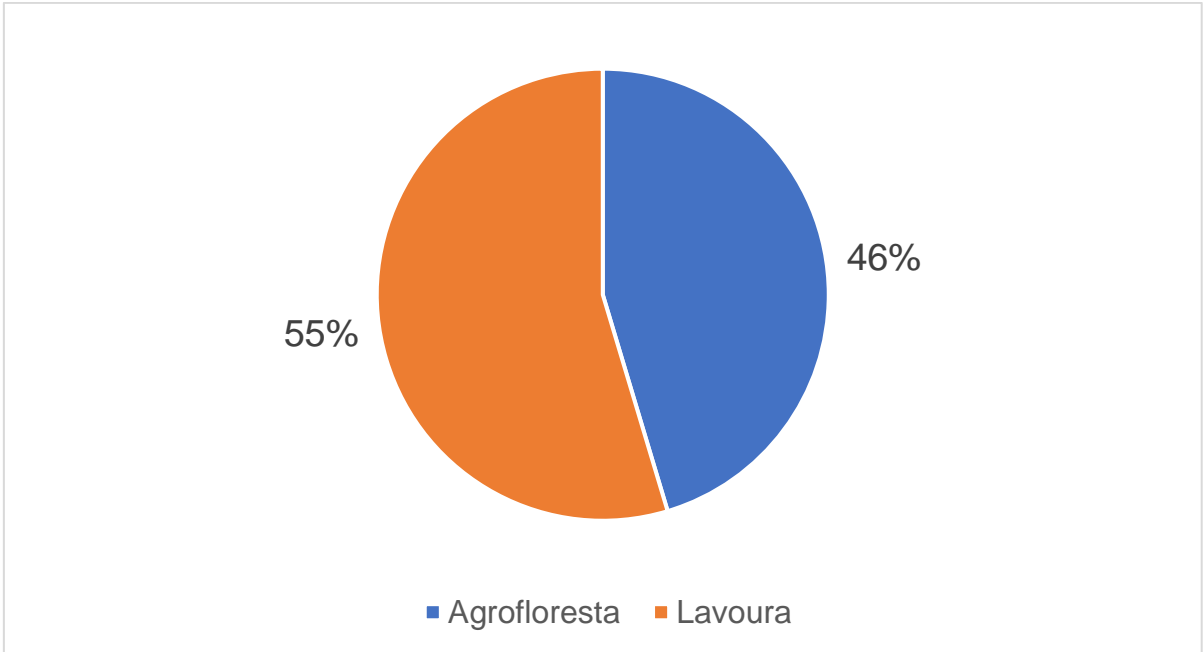


Figura 8. Abundância de *Aspergillus* em ambiente pulverizado (lavoura) e não pulverizado (agrofloresta).

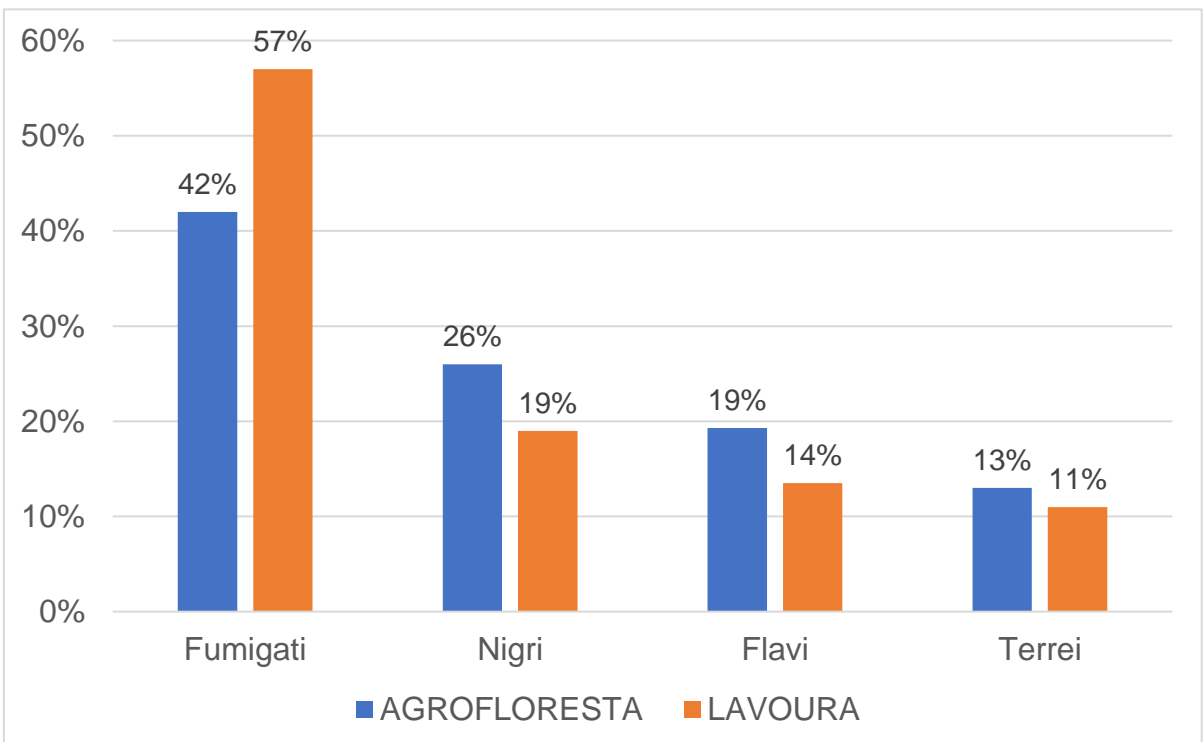


Figura 9. Frequência de seções de 68 isolados de *Aspergillus*, recuperados de solos de agroflorestas e lavouras de sete municípios de Mato Grosso do Sul (2020-2021).

4.3 Identificação molecular

Por meio do sequenciamento do gene β -*tubulina*, obteve-se identificação de 10 espécies, sendo: *A.fumigatus* (50%), da seção Fumigati, quatro espécies da seção Flavi, *A.flavus* (9%), *A.tamaritii* (3%), *A.caelatus* (1%) e *A.parasiticus* (3%), outras três espécies pertencentes a seção Nigri, *A.niger* (10%), *A.brasiliensis* (3%) e *A.tubingensis* (4%), pertencentes à seção Terrei, há duas espécies, *A.terreus* (10%) e *A.alabamensis* (6%) (Figura 10). A espécie de maior abundância foi *A. fumigatus*, obtida de ambos os ambientes (Figura 11).

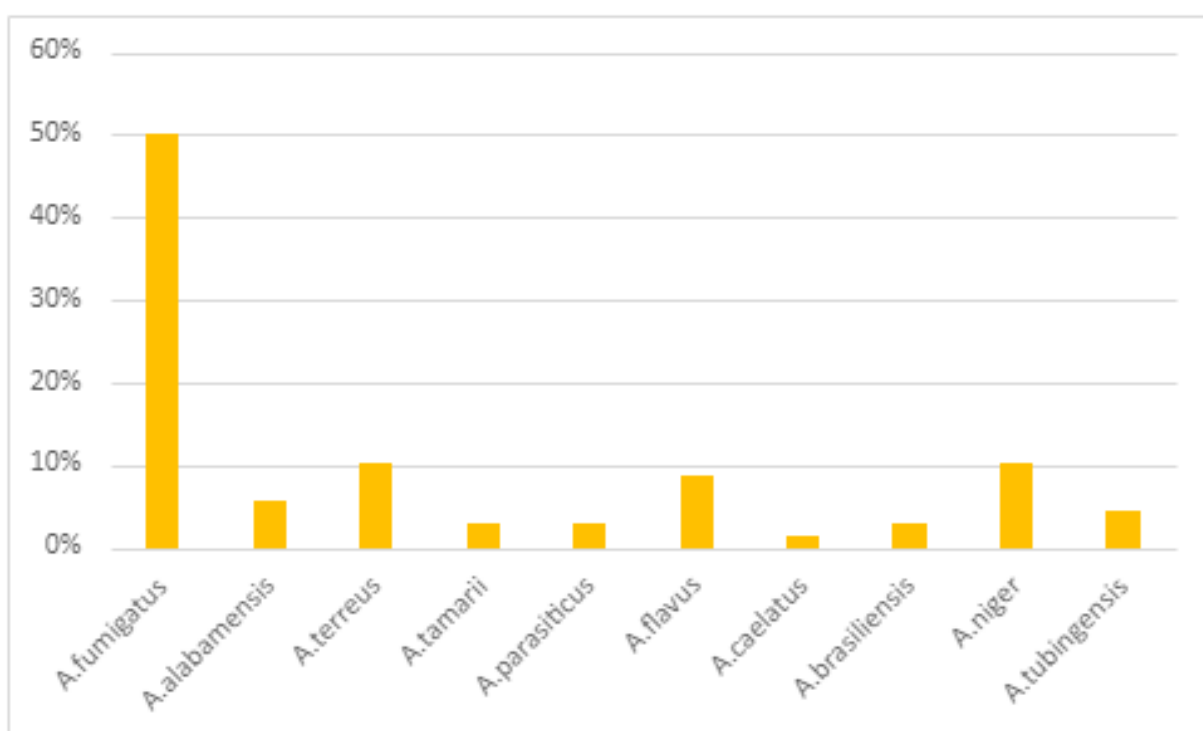


Figura 10. Frequência de espécies, determinadas por sequenciamento do gene β -*tubulina*, de 68 isolados de *Aspergillus* obtidos de solo de lavouras e agroflorestas, Mato Grosso do Sul (2020-2021)

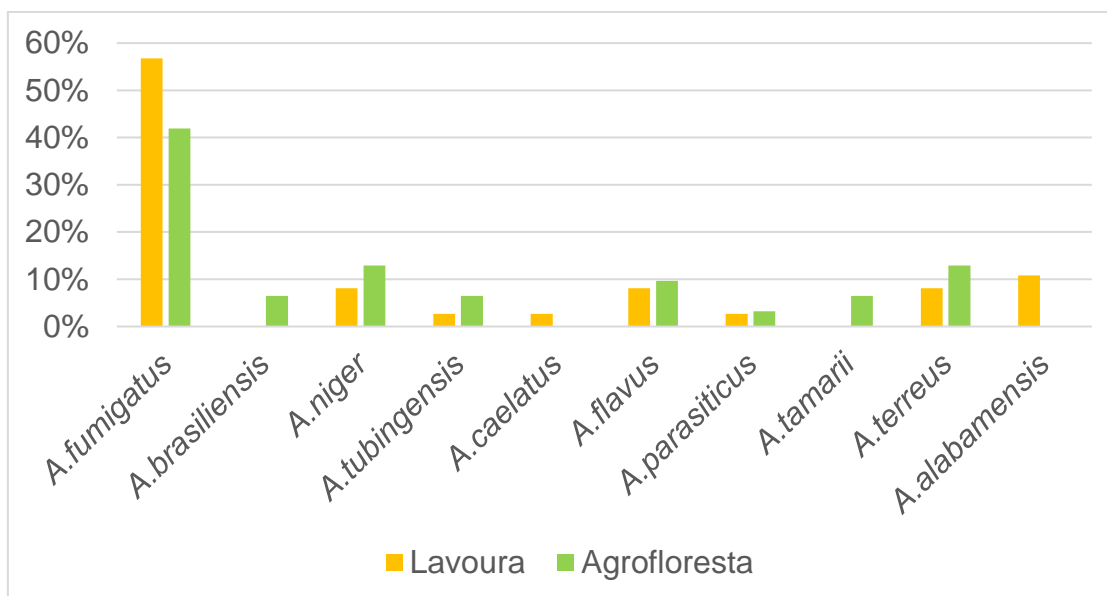


Figura 11. Frequência de espécies de 68 isolados de *Aspergillus*, recuperados de solos de agroflorestas e lavouras, sete municípios de Mato Grosso do Sul (2020-2021).

4.4 Sensibilidade a antifúngicos

Todos os 68 isolados foram analisados frente ao ITC, VCZ e POS. Isolados resistentes ou não selvagens foram encontrados em todas as espécies em taxas distintas, com destaque para resistência ao VCZ em *A. fumigatus* no ambiente pulverizado (Tabela 1). Ademais entre os ambientes, o ambiente pulverizado apresentou 37% de espécies resistentes (Tabela 1) e o ambiente não pulverizado apresentou 32% de espécies não selvagens (Tabela 2).

Tabela 1. Espécies resistentes a três fármacos azólicos em 68 isolados de amostras de solo de agroflorestas e lavouras, Mato Grosso do Sul (2020-2021).

N () Espécies	Agroflorestas (31)			Lavouras (37)		
	ITC	VCZ	POS	ITC	VCZ	POS
<i>A. fumigatus</i> (13/21)	15% (2/13)	69% (9/13)	77%(10/13)	48% (10/21)	71% (15/21)	52% (11/21)
<i>A. flavus</i> (3/3)	0%	0%	0%	33% (1/3)	0%	0%
<i>A. terreus</i> (4/3)	50% (2/4)	0%	50% (2/4)	33% (1/3)	0%	33% 1/3)
<i>A. parasiticus</i> (1/1)	100% (1/1)	0%	0%	100% (1/1)	0%	0%
<i>A. tamaritii</i> (2/0)	50% (1/2)	0%	0%	0%	0%	0%
<i>A. alabamensis</i> (0/4)	0%	0%	0%	0%	0%	25% (1/4)
Resistência		29%			37%	

Tabela 2. Espécies não selvagens a três fármacos azólicos, em 68 isolados de amostras de solo de agroflorestas e lavouras, Mato Grosso do Sul (2020-2021).

N ()	Agroflorestas (31)			Lavouras (37)		
	ITC	VCZ	POS	ITC	VCZ	POS
<i>A.niger</i> (4/3)	75% (3/4)	50% (2/4)	50%(2/4)	33% (1/3)	67% (2/3)	33% (1/3)
<i>A.flavus</i> (3/3)	0%	67% (2/3)	67% (2/3)	0%	67% (2/3)	67% (2/3)
<i>A.terreus</i> (4/3)	0%	75% (3/4)	0%	0%	100% (3/3)	0%
<i>A.parasiticus</i> (1/1)	100% (1/1)	100% (1/1)	0%	0%	100% (1/1)	100% (1/1)
<i>A.tubingensis</i> (2/1)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	0%	100% (1/1)	0%
<i>A.tamaritii</i> (2/0)	50% (1/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	0%	0%	0%
<i>A.brasiliensis</i> (2/0)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	0%	0%	0%
<i>A.alabamensis</i> (0/4)	0%	0%	0%	0%	100% (4/4)	0%
<i>A.caelatus</i> (0/1)	0%	0%	0%	0%	100% (1/1)	100% (1/1)
Resistência		32%			18%	

Tabela 3. Frequência de isolados resistentes ou não selvagens (EUCAST) de quatro espécies mais relevantes de *Aspergillus*, segundo e origem do solo, Mato Grosso do Sul (2020/2021).

Espécie	Origem (n)	Resistentes/Não selvagens					
		ITC		VCZ		POS	
		n	%	n	%	N	%
<i>A.fumigatus</i>	Lavouras (21)	10	47,6	15	71,4	11	52,3
	agroflorestas (18)	2	11,1	9	50,0	10	55,5
	total (34)	12	35,3	24	70,5	21	61,7
<i>A.niger</i>	Lavouras (3)	1	33,3	2	66,6	1	33,3
	agroflorestas (4)	3	75,0	2	50,0	2	50,0
	total (7)	4	57,1	4	57,1	3	42,8
<i>A.flavus</i>	Lavouras (3)	1	33,3	2	66,6	2	66,6
	agroflorestas (3)	0	0	2	66,6	2	66,6
	total (6)	1	16,6	4	66,6	4	66,6
<i>A.terreus</i>	Lavouras (3)	1	33,3	3	100	1	33,3
	agroflorestas (4)	2	50,0	3	75,0	2	50,0
	total (7)	3	42,8	6	85,7	3	42,8

Sessenta e três (92,6%; 63/68) isolados resistentes, e/ou não selvagens, foram encontrados, incluindo 37 (58,7%; 37/63) provenientes de lavouras e 27 de agroflorestas (42,8%; 27/63). Dentre os oriundos de lavouras, cinco (13,5%; 5/37) foram multirresistentes aos três fármacos, 45,9% (17/37) a dois fármacos e 37,8% (14/37) sem multirresistência. Nos isolados de agroflorestas, multirresistência aos três fármacos foi verificada em 26,9% (7/26), a dois fármacos em 11,5% (3/26) e resistência única em 23,1% (6/26) dos isolados. Dentre os cinco isolados sensíveis, um (20%) era de lavoura e os demais de agroflorestas.

A característica dos resultados de TSA conterem números não exatos, como, >8 e >16, as operações que envolvam médias não se aplicam, a menos que seja em caráter exploratório e por aproximação. Assim os cálculos de correlações, se fossem realizados sem os sinais "><", sabendo que estes números estão dentro do campo de valores de resistência e *non-wild-type*, poderiam ser tabulados para explorar alguma tendência. Os cálculos foram realizados com $p < 0,05$, mas são uma aproximação conceitual, não resultados exatos. "8" e ">8" foram tratados como um mesmo número.

Nesse caso há uma sugestão de correlação média, no desempenho de TEB e DIF na Lavoura orgânica, ademais, apresentam correlação baixa.

Quando analisados o perfil de sensibilidade de cada isolado, a fármacos e fungicidas azólicos, observou-se alta similaridade entre aqueles recuperados de mesma amostra de solo, que por isso foram agrupados em um único fenótipo. Analisando-se os 63 isolados menos sensíveis, ou seja, resistentes ou não selvagens a um ou mais fármaco, foram encontrados 20 fenótipos (F1 a F20), dentre os 26 recuperados de agroflorestas (Quadro 3) e foram observados 16 fenótipos nos 37 obtidos de lavouras (Quadro 4). No conjunto dos 5 isolados sensíveis, todos *A. fumigatus*, 3 fenótipos foram identificados em 4 isolados de agroflorestas (F25 a f 31) e 1 (F32 a F35) fenótipo único no isolado de lavoura (Quadro 5). Como *A. fumigatus*, foram identificados 27 isolados, sendo 23 (85,2%) resistente ou não selvagem para os fármacos avaliados. Considerando isolados recuperados da mesma amostra de solo e apresentando o mesmo fenótipo como um único indivíduo, ou seja, excluindo-se as repetições, têm-se

uma nova frequência de 58 isolados recuperados de solo neste estudo. Tomando-se como base esse cálculo alternativo, dentro das quatro espécies mais relevantes na clínica médica, 41 (80,4%) isolados foram resistentes ou não selvagens a um ou mais fármacos antifúngicos. Inclui-se nesse cálculo 23 (56,1%; 23/41) isolados de *A. fumigatus*, sendo 6 (26,1%; 6/23) de agroflorestas e 17 (73,9%; 17/23) de fazendas. Para os outros 18 (43,9%; 18/41) isolados resistentes ou não selvagens verificou-se 6 (33,4%; 6/18) isolados de *A. terreus*, com 3 de agroflorestas e 3 de fazendas, do mesmo modo como visto para 6 isolados de *A. niger* e 6 isolados de *A. flavus*. Incluindo-se todas as espécies, corresponde um total de 58 isolados, incluindo 54 (93,1%; 54/58) resistentes ou não sensíveis e 4 (6,9%; 4/58) isolados sensíveis. Isolados resistentes ou não selvagens foram recuperados das agroflorestas (40,7%; 22/54) e das fazendas (59,3%; 32/54). Isolados sensíveis aos fármacos azólicos foram recuperados de agroflorestas (75%; 3/4) e de uma lavoura 25%; 1/4).

Quadro 3. Ocorrência de 20 fenótipos, resistentes ou não selvagens* a azóis, em 26 isolados de *Aspergillus* provenientes de solo de agroflorestas (MS, 2020-2021)

Quant.	Nº	Espécie	MIC (mg/L)					Solo	Município	Fenótipo
			ITC	VCZ	POS	TEB	DIF			
1		<i>A. fumigatus</i>	0,25	1	0,5	16	>16	6	Campo Grande	F1
2	67		0,5	8	>8	>16	>16	1		F2
3	81		1	>8	>8	16	>16			F2
4	41		0,5	8	1	1	4			F3
5	45		8	4	1	1	1			F3
6	88		0,25	4	1	1	4			F3
7	16		0,5	8	0,5	16	16			F4
8	150		0,5	>8	2	8	16			F5
9	149	<i>A. terreus</i>	>8	>8	4	>16	>16			F6
10	144		2	1	2	>16	>16	F7		
11	154		1	>8	0,06	16	16	F8		
12	159	1	>8	0,12	>16	>16	F8			
13	79	<i>A. niger</i>	>8	1	1	16	>16	F9		
14	14		8	1	0,06	16	>16	F10		
15	2		8	>8	1	4	16	F11		
16	160	1	>8	0,06	16	>16	F12			
17	114	<i>A. tubingensis</i>	>8	4	4	8	16	F13		
18	28		>8	8	0,5	>16	4	F14		
19	170	<i>A. parasiticus</i>	4	>8	0,25	>16	>16	F15		
20	121	<i>A. fumigatus</i>	0,5	>8	2	1	4	F3		
21	29	<i>A. brasiliensis</i>	4	8	8	>16	>16	F16		
22	94		8	4	4	16	>16	F16		
23	7	<i>A. tamaritii</i>	4	8	0,5	16	>16	F17		
24	13	<i>A. flavus</i>	1	>8	2	>16	>16	F18		
25	86		0,5	0,25	1	8	16	F19		
26	59		1	4	0,12	8	>16	7	F20	

F, fenótipo; ITC, itraconazol; VCZ, voriconazol; POS, posaconazol; TEB, tebuconazol; DIF, difeconazol. Células em vermelho, indica resistência e em amarelo classificação de não selvagem.

Quadro 4. Ocorrência de 16 fenótipos, resistentes ou não selvagens* a azóis, em 37 isolados de *Aspergillus* provenientes de solo de lavouras (MS, 2020-2021)

Quant.	N	Espécie	MIC (mg/L)					Solo	Município	Fenótipo
			ITC	VCZ	POS	TEB	DIF			
1	105	<i>A.fumigatus</i>	>8	>8	>8	>16	>16	4	Rio Verde de Mato Grosso	F32
2	25		1	>8	>8	>16	>16			F2
3	142		0,25	8	8	1	4	3		F3
4	11		8	1	0,03	1	>16	5		F21
5	11		8	1	0,03	1	>16			F21
6	169		2	>8	0,06	4	1	11		Sidrolândia
7	3	<i>A.flavus</i>	1	8	0,25	8	>16	3	Rio Verde de Mato Grosso	F20
8	19		2	0,12	2	16	>16			F21
9	141	<i>A. caelatus</i>	1	>8	>8	8	16			F22
10	92	<i>A.alabamensis</i>	0,25	2	1	2	16			4
11	1	<i>A.fumigatus</i>	8	8	0,25	4	8	9	Sidrolândia	F24
12	6		8	1	0,25	16	16			F25
13	5		8	1	0,25	1	2	8		F26
14	4		1	2	0,25	8	8			F27
15	83		0,25	4	8	8	16	F2		
16	146		0,5	>8	4	1	8	7		F3
17	95	<i>A.flavus</i>	0,12	>8	>8	1	8	9	F28	
18	145	<i>A. terreus</i>	8	4	0,5	>16	>16	8	F29	
19	33	<i>A.niger</i>	2	8	0,5	8	>16		F30	
20	176		4	1	0,12	8	>16		11	F31
21	35	<i>A.parasiticus</i>	2	8	0,5	8	>16	7	F15	
22	73	<i>A.fumigatus</i>	>8	4	4	>16	>16	13	Coxim	F32
23	75		0,5	0,25	0,5	1	8			F33
24	116		0,5	0,5	1	1	4			F33
25	168	<i>A.terreus</i>	0,5	4		16	16			F8
26	157	<i>A.tubingensis</i>	1	>8	0,12	8	16		F32	
27	84	<i>A.fumigatus</i>	>8	2	2	>16	>16	15	Figueirão	F32

28	65		0,12	8	>8	1	4			F15
29	69		0,5	8	4	>16	>16			F2
30	152	<i>A.alabamensis</i>	0,25	8	0,015	16	16			F34
31	156		0,5	4	0,03	8	8			F34
32	155	<i>A. terreus</i>	0,25	>8	0,03	>16	8			F8
33	158	<i>A.niger</i>	2	>8	0,12	8	>16			F12
34	174	<i>A.fumigatus</i>	1	>8	0,06	16	16	10	Maracaju	F35
35	173		2	>8	0,06	1	4			F36
36	175		2	8	0,06	1	4			F36
37	164	<i>A.alabamensis</i>	0,5	4	0,06	8	16			F34

F, fenótipo; ITC, itraconazol, VCZ, voriconazol; POS, posaconazol; TEB, tebuconazol; DIF, difeconazol. Células em vermelho, indica resistência e em amarelo classificação de não selvagem

Quadro 5. Ocorrência de 4 fenótipos de *Aspergillus*, sensíveis aos fármacos azólicos, em 4 isolados de solo de agroflorestas e 1 isolado de solo de lavoura (MS, 2020-2021)

n	N	Espécie	MIC (mg/L)					Solo	Municípios	Fenótipo
			ITC	VCZ	POS	TEB	DIF			
1	76	<i>A. fumigatus</i>	0,5	0,5	0,25	4	4	6	Campo grande	F37
2	77		0,25	0,25	0,25	2	4	6		F37
3	10	<i>A. tamarii</i>	0,5	0,25	0,015	16	>16	6	Miranda	F38
4	32	<i>A. fumigatus</i>	0,015	0,03	0,03	8	8	1	Campo grande	F39
5	36		1	0,12	0,25	8	8	3	Rio Verde Mato Grosso	F40

F, fenótipo; ITC, itraconazol, VCZ, voriconazol; POS, posaconazol; TEB, tebuconazol; DIF, difeconazol.

4.5 Sensibilidade a fungicidas

Os 68 isolados foram avaliados frente a TEB e DIF (Quadros 4, 5 e 6). Para interpretação de MIC dos fungicidas foi feita uma tentativa de definir um ponto de corte epidemiológico para diferenciar isolados selvagens de não selvagens. Para ambos os fungicidas, o valor de ECOFF ficou em >16 mg/L, ou

seja, acima da maior concentração analisada. Desse modo, não foi possível definir o ECOFF e a interpretação foi realizada por duas categorias: menos sensível ($MIC > 16\text{mg/L}$) e mais sensível ($MIC \leq 16\text{ mg/L}$) para TEB ou DIF.

A taxa de isolados menos sensíveis a TEB foi de 23,5% (16/68) e a DIF foi de 44,1% (30/68), sendo 43,3% (13/30) menos sensíveis a ambos os fungicidas. Essas populações foram verificadas em agroflorestas (53,8%; 15/26) e em lavouras (37,8%; 14/37). Um (20%) isolado menos sensível a difenoconazol foi encontrado dentre os cinco sensíveis aos fármacos azólicos. Isolados pouco sensíveis aos fungicidas foram observados dentre os multirresistentes aos 3 fármacos azólicos, obtidos de fazendas (80%; 4/5) e de agroflorestas (57,1%; 4/7). (Quadro 5).

4.6 Fungicidas utilizados nas lavouras

Os agrotóxicos utilizados nas lavouras foram: ELATUS, CYPRESS 400 EC, BRAVONIL e FOXxpro. Destes, pertence ao grupo químico triazol o CYPRESS 400 EC, tendo em sua composição: difeconazol (250g/L), ciproconazol (150g/L) e outros ingredientes (740 g/L) (SYNGENTA, 2021). Os fungicidas foram utilizados em 3 lavouras de milho no município de Sidrolândia. Os outros municípios não disponibilizaram dados sobre os fungicidas utilizados.

5. DISCUSSÃO

O uso de fungicidas triazólicos tem aumentado em todo o mundo e seu uso frequente e excessivo provoca diversos efeitos nos microrganismos e auxiliam na contaminação ambiental. Muitos agrotóxicos agem de forma seletiva, mas podem de forma indireta acarretar alterações e pressão seletiva na microbiota do solo (WARDLE; PARKINSON, 1990ab). Algumas cepas de fungos, próprios desse *habitat*, possuem mecanismos de escape desses compostos e, desde o fim da década de 90 existe a hipótese da ocorrência de *A. fumigatus* resistente a azóis em meio ambiente, como uma ameaça à saúde pública (SNELDERS et al., 2009)

A pressão seletiva caracteriza-se por supressão de cepas mais sensíveis aos fungicidas azólicos e proliferação dos mais resistentes. A população de resistentes deve ser capaz de crescer *in vitro* sob altas concentrações desses compostos. A dificuldade de estabelecer esses valores vem da falta de dados disponíveis sobre a distribuição normal de valores de MIC de cada fungicida frente a cada espécie, permitindo o estabelecimento de pontos de corte epidemiológicos. Uma vez determinados os ECOFFs de cada fungicida, seria possível determinar quais isolados são não selvagens a cada um deles. Desse modo, poder-se-ia investigar a existência de isolados com real resistência cruzada entre fungicidas e fármacos azólicos, em uma demonstração indireta do impacto dos fungicidas no desenvolvimento de resistência aos fármacos. Dada a inexistência de ECOFF definido para cada fungicida frente a cada espécie fúngica, adotou-se para fins deste estudo a nomenclatura de menos sensível, como uma estratégia de interpretar os valores de MIC de TEB e de DIF.

A análise dos dados globais deste estudo, para os 68 isolados recuperados de solo leva às verificações intrigantes e inéditas, tanto para sensibilidade a fungicidas, quanto para fármacos azólicos. Para DIF (44,1%) a taxa de isolados menos sensíveis foi maior do que a TEB (23,5%) e, ainda mais preocupante, quase a metade deles foi menos sensível a ambos os fungicidas. Intrigante foi a observação de taxas similares nos dois ambientes: agroflorestas e lavouras, não podendo se inferir que foram pulverizações a causa principal

dessa ocorrência. Isolados com altos valores de MIC de DIF, mais do que TEB, foram anteriormente descritos (SNELDERS et al., 2012).

Agravando o quadro observado da resistência a fungicidas em isolados de solo do MS, em mais da metade de tais isolados era resistente e/ou não selvagem para ITC, VCZ e POS, simultaneamente. Investigações sobre genótipos de isolados de *A. fumigatus*, ambientais e clínicos, com perfil de resistência para fungicidas e fármacos azólicos, demonstraram que mutantes idênticos entre os dois grupos são frequentes, mas nem sempre isso é verificado, dependendo da configuração genética do genótipo (GARCIA-RUBIO et al., 2021). Os valores alertam para o risco de resistência cruzada com fármacos azólicos nesses isolados ambientais e possível resistência clínica ao tratamento, frente à possibilidade de inalação de conídios dessas populações.

A altíssima porcentagem de isolados resistentes, e/ou não selvagens para ITC, VCZ e/ou PCZ foi notável e inédita no Brasil. Justifica-se esse dado, pelo tipo de substrato do qual os isolados foram obtidos. A extensa revisão de Burks et al. (2021) mostra que, de 52 estudos ambientais que descreveram 1296 isolados de *A. fumigatus* resistentes a azóis, o solo representa o substrato com maior prevalência dessa ocorrência. Dos resistentes, 56,7% foram de solo, 16,5% de ar e 11,4% de detritos vegetais, além de compostagem (9,4%), resíduos particulados (3,2%), plantas (2,4%), água (3%) e sementes (0,1%). Em 31 estudos realizados em ambiente agrícola, o solo foi responsável pela maior parte (75%) dos isolados resistentes, seguido de detritos vegetais (12%), compostagem (9,4%), plantas (2,6%) e ar atmosférico (0,5%).

A ocorrência da resistência em solos orgânicos, ainda que, em menor taxa do que aquela verificada em solos de lavouras, aparentemente inesperada é, porém, muito descrita na literatura. Na grande revisão de Burks et al. (2021), em metade (58,4%) dos locais agrícolas amostrados havia relato de pulverização com fungicidas azólicos e, ainda assim, foram recuperados isolados resistentes aos fármacos azólicos.

A confirmação do tipo de fungicidas usados nas lavouras, apresentou um resultado frustrante dada à baixa adesão dos agricultores, em fornecer essa informação. Talvez por suspeita de notificação de irregularidades ou medo de

ser alvo de fiscalização sanitária após repasse dos dados, não são hipóteses descartadas para esse comportamento, pois há indicação nas próprias embalagens de pesticidas que eles devem ser repassados em caso de chuva, levando à falta de controle do uso desses produtos. Muitas combinações de compostos, ainda, são desaconselhadas por causar maior impacto ambiental, mas podem ser praticadas. Das únicas três lavouras para a qual existe o dado do fungicida, o qual se trata de mistura de dois azólicos, foram recuperados sete (33,3%) dos 21 isolados de *A. fumigatus* resistentes ou não selvagens provenientes de lavouras. A falta de dados sobre as demais lavouras impede qualquer conclusão sobre a relação de fungicida e resistência azólica.

Passando à avaliação dos dados, em relação às seções e espécies recuperadas, vê-se que a dispersão e adaptação dos membros do gênero *Aspergillus* ao meio ambiente, pode ser evidenciada neste estudo, vista a taxa de 88,5% de positividade nas amostras de solo, coletadas em distintos municípios e apresentando condições diversas de ações antrópicas. As espécies mais frequentemente recuperadas das amostras de lavouras e agroflorestas, *A. fumigatus*, *A. terrej*, *A. niger* e *A. flavus*, são aquelas mais relacionadas à aspergilose humana, evidenciando o risco de inalação de conídios a partir de aerossóis provenientes de solo. As infecções por espécies de *Aspergillus* são uma ameaça à saúde humana e, apesar de *A. fumigatus* ser o agente de maior ocorrência, dependendo da epidemiologia local, representantes da seção Terrei ou seção Flavi são o segundo ou terceiro mais importante (LASS-FLORL et al., 2021).

A variedade de espécies dessas seções foi notória, pois foram identificadas 10 espécies nos 68 isolados sequenciados de *Aspergillus*. Todas as espécies de *Aspergillus* recuperadas de solo, orgânico ou pulverizado com fungicidas, têm importância econômica e social, em diversas regiões do mundo, seja, em questão de fitopatogenicidade ou produção de aflatoxinas com impacto negativo na produção agrícola ou relacionada à aspergilose em humanos e outros animais. Há que se ressaltar, que, em relação à frequência das espécies da seção Nigri, a acurácia do sequenciamento do gene de *β -tubulina* nem sempre é suficiente para um resultado conclusivo, devendo o dado ser

complementado, muitas vezes, por análise de outros genes como o da calmodulina que tem para essa seção maior poder discriminatório, como já descrito (FRÍAS DE LEÓN et al., 2016). Tendo em vista o melhor desempenho do sequenciamento do gene *benA* que codifica a β -tubulina para identificação de espécies da seção Fumigati, comparada por exemplo com a seção Nigri, uma limitação deste estudo foi que a distribuição de espécies teve o viés de proporcionar mais isolados identificados dentro da seção Fumigati. Maior precisão da determinação da frequência será obtida quando concluída a identificação da espécie nos isolados que restam dos 131 inicialmente obtidos das amostras de solo.

A distribuição dos achados mostra prevalência da seção Fumigati em lavoura pulverizada, em comparação com as outras seções, Nigri, Flavi e Terrei, encontradas. O ambiente pulverizado das lavouras, em relação ao orgânico das agroflorestas, apresentou maior número de isolados com resistência a VCZ do que a POS e a ITC. Ainda assim, no ambiente pulverizado observou-se abundância maior de *A. fumigatus*. Além disso, essa, em relação às outras espécies, foi a que, sugere maior presença de resistentes a VCZ no ambiente pulverizado, quanto para POS. BEDIN DENARDI e colaboradores (2018) no Brasil, descreveram em lavoura tradicional um fenótipo de *A. fumigatus* resistente a posaconazol (MIC 0,5 mg/L). A maior abundância numérica de *A. fumigatus*, em ambiente pulverizado pode ter ocorrido devido ao melhor aproveitamento do fungo aos diversos compostos químicos, utilizados em determinadas regiões. Estudos comprovam que a aplicação dos herbicidas ocasiona maior contagem de fungos no solo, dado que, muitos produtos químicos podem ser utilizados pelos fungos como nutrientes e fontes de energia. O excesso dessas substâncias, no entanto, causa preocupação ambiental, principalmente, por conta dos efeitos à microbiota local (ARAÚJO; MONTEIRO; ABARKELI, 2003; WARDLE E PARKINSON, 1990_{ab}).

O trabalho de Colla e colaboradores (2008), descreveu fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, com alta taxa de crescimento em meios com elevadas doses de atrazine, herbicida seletivo para cultura de milho, sugerindo tais gêneros como biorremediadores para solos contaminados

com triazóis. O estudo relata que os microrganismos, quando ocasionados ao estresse de compostos químicos, tornaram-se adaptados aos compostos poluentes de meio ambiente. Devido à negação de fornecimento de informações sobre os herbicidas, fungicidas e outros agrotóxicos utilizados em seus cultivos, por parte de proprietários de 6 lavouras, apesar das diversas tentativas, supõe-se que havia misturas de produtos químicos nesses ambientes, o que pode contribuir com o desenvolvimento dessas espécies.

Estudo de revisão revelou que, em grande maioria, a resistência de *A. fumigatus* ocorre em ambiente agrícola, pois, o solo é considerado o ambiente principal de resistência desse fungo. Os cultivos variam bastante no ambiente de agricultura, grande parte dos isolados resistentes a azol foram de plantio de flores. Países da Europa e Leste Asiático aplicam mais fungicidas azólicos por hectare de agricultura, com destaque à Holanda, seguida da Alemanha e França, enquanto, Índia, África, Oriente Médio e América do Sul tiveram menores quantidades de fungicidas azólicos aplicados por hectare de terra. Os dados dos países com baixo uso de fungicidas são informações antigas e que não refletem com precisão os níveis atuais de aplicação de fungicidas azólicos. Dentre os países, o Irã relatou o terceiro maior número de isolados de *A. fumigatus* resistentes a azóis, depois da Holanda e França, mas com uma das menores quantidades de fungicidas azólicos pulverizados por hectare de terra agrícola. Houve apenas um estudo que mostrou resistência aos azóis em isolado proveniente de uma floresta (BURKS et al.,2021).

A presença ambiental de *A. fumigatus* com resistência ao ITC (MIC 2,0 mg/L), com risco teórico de inalação de esporos resistentes presentes em bioaerossóis, levando à ocorrência de cepas clínicas desse fenótipo, foi verificada neste estudo. Fenótipos clínicos resistentes a ITC são descritos em diversas regiões do globo. No Qatar, o atendimento de pacientes de diversas regiões do mundo, incluindo Sudeste Asiático, Oriente Médio, África do Sul e Estados Unidos, resultou em um isolado clínico resistente de *A. fumigatus* (MIC de 2,0 mg/L para ITC) (SALAH et al., 2019). Um estudo desenvolvido no Brasil englobou *A. fumigatus*, isolados clínicos e ambientais, obtidas de solo de lavoura de milho, e avaliou perfil de sensibilidade *in vitro* a VCZ, POS, ITC e outros azóis.

Poucos isolados apresentaram resistência a ITC, porém, para os ambientais foram verificados maiores valores de MIC, quando comparado com MIC para as clínicas (BEDIN DENARDI et al., 2018).

Os achados, deste e outros estudos, sobre baixa eficácia de triazóis trazem inquietação, desde que, *A. fumigatus* é a espécie prevalente na clínica médica e fenótipos pouco sensíveis *in vitro*, são potencialmente capazes de causar resistência clínica em casos de aspergilose, em regra, tratados com terapia azólica. Ao contrário de outras espécies, como *A. flavus* e *A. niger*, *A. fumigatus* não tem capacidade de infectar tecidos vivo vegetal, portanto, não é fitopatógeno e não é o alvo da aplicação dos fungicidas na agricultura, mas pode ter exposição não intencional, podendo ser considerada “colateral”, a esses compostos (GISI, 2014). Os fungicidas decaem sua atividade, dispersando seus resíduos no solo, com colheita finalizada ou não, e em substratos vegetais capazes de serem colonizados por *A. fumigatus* (HOLLOMON, 2017). Caso haja resíduos nesses substratos, em concentração suficiente para inibir o crescimento de isolados selvagens de *A. fumigatus*, mas não daqueles não selvagens com possível mecanismo de resistência, isso vai convergir para a seleção e recuperação de populações com altos valores de MIC, como observado neste estudo.

Por outro lado, as taxas de isolados multirresistentes, em particular em *A. fumigatus*, verificadas em agroflorestas foram inesperadas. Esse fato, pode estar relacionado à dificuldade de eliminação e preservação de ambientes livres de azóis, como já citado, anteriormente. Algumas agroflorestas amostradas já haviam sido lavouras ou, até mesmo, área de pecuária, sofrendo tais ambientes outros tipos de pressão por determinado período de tempo, no qual, alguns proprietários não conseguiram relatar com exatidão, por motivos de ter adquirido o terreno sem saber muito bem sobre os antecedentes. Outro aspecto relevante é que o uso de fungicidas azólicos não é a única forma que os fungos ambientais podem ser expostos aos azóis, visto que pode haver contaminação do solo e das águas superficiais (CHEN et al., 2013). Ou seja, além do histórico da área utilizada para cultivo ser relevante, para a resistência dos fungos aos antifúngicos, um compilado de informações precisa ser feito, como a origem da

água de irrigação e solo. Este aspecto é relevante, pois os plantios precisam de um espaço muitas vezes isolado, onde pode haver fontes de água próximas contaminadas com produtos químicos de plantios fronteiriços e, até mesmo, compra de solo de outras regiões contaminadas com agrotóxicos. Importante, ainda, ressaltar que recuperar um ambiente pulverizado com azóis pode requerer um longo período de tempo, pois tais compostos podem permanecer ativos em diversos nichos por vários meses (CHOWDHARY et al., 2013) podendo, ainda, permanecer em resíduos vegetais durante o processo de compostagem (SNELDERS et al., 2009).

A seção Terrei, segunda em frequência neste estudo, inclui espécies, como: *A. terreus* e *A. alabamensis* que podem causar quadros de aspergilose disseminada, em animais domésticos (KABAY; ROBINSON; HUXTABLE; MCALEE, 1985). Como relatado por Burrough e colaboradores (2012), a infecção pode ser diagnosticada pelo exame histopatológico positivo para hifas fúngicas hialinas septadas, mostrando a capacidade dessas espécies em invadir o tecido hospedeiro, muitas vezes com curso fatal, seja pela alta virulência, seja pela resistência clínica. As características dessas infecções invasivas por fungos não *Aspergillus fumigatus* são o alto potencial de invasão de tecidos, disseminação e possível morbidade devido à produção *in vivo* de micotoxinas.

Aspergillus terreus é temido pela resistência à anfotericina B, com sensibilidade variável aos azóis (ESCRIBANO et al., 2012; IMBERT et al., 2018; VAHEDI SHAHANDASHTI; LASS-FLÖRL, 2019). O encontro em amostras de solo, obtidas tanto de agroflorestas quanto de lavouras, alerta para ocorrência de fontes de disseminação via correntes aéreas de bioaerossóis contendo conídios dessa espécie. Nesse cenário de resistência antifúngica, foi importante a descrição neste estudo de isolados, recuperados de lavouras e agroflorestas, não sensíveis para VCZ. Esse dado contrasta aos do grande estudo de Zorán e colaboradores (2018), com 432 isolados de *A. terreus*, em que a resistência ao VCZ foi rara, mas está conforme descrito, recentemente, por Monpierre e colaboradores (2021) em 2 de 19 isolados dessa espécie, recuperados de solo de lavoura. Em relação a POS, ainda que seja o azol mais potente, globalmente, 1 isolado não sensível a esse fármaco foi recuperado de solo de agrofloresta.

Recentemente, um fenótipo de resistência ao POS foi descrito em solo de lavoura de bananas (MONPIERRE et al., 2021). O perfil de resistência a POS em *A. terreus* não é incomum, tendo sido relatado em 5% dos isolados do estudo de Zorán e colaboradores (2019), atingindo cifras superiores a 10% na Áustria, Alemanha e Reino Unido. Para ITC, os isolados de *A. terreus* foram sensíveis, confirmando dados anteriores obtidos de cepas clínicas e ambientais de várias regiões do mundo (ZORÁN et al., 2019; MONPIERRE et al., 2021). O mecanismo conhecido para resistência aos triazóis, em isolados de *A. terreus*, é a mutação na posição M217 de *cyp51A* (ARENDRUP et al., 2012).

Ainda que não se possa extrapolar os dados obtidos em laboratório, para situação clínica, merece atenção e monitoramento a emergência de resistência aos mais novos triazólicos em *A. terreus*. O dimensionamento de resistência ambiental nessa espécie, incrementado por dados deste estudo, contribui para compreensão da origem da resistência clínica e seus possíveis fatores determinantes.

Em 2009, um estudo filogenético de diferenças *locus*, realizado por Balajee e colaboradores, levou à caracterização de um grande número de isolados de *A. terreus*, a partir de amostras clínicas e ambientais, obtidas de diferentes localizações geográficas no mundo. Isolados oriundos da Universidade de Alabama em Birmingham (UAB), EUA foram agrupados em um clado diferente de outras regiões e, por isso, reconhecido como pertencentes a uma nova espécie, *A. alabamensis*. O perfil de sensibilidade dos isolados dessa nova espécie indicava alta sensibilidade para VCZ (0,25 mg/L - 0,5 mg/L) e ITC (0,25 mg/L- 1 mg/L), mesmo padrão descrito para *A. terreus*. De fato, as duas espécies, *A. terreus* e *A. alabamensis*, possuem muitas similaridades que vão além de apenas características morfológicas, envolvendo também metabolismos secundários (BADDLEY et al., 2003). Interessante que *A. alabamensis* foi encontrado em amostras de solo, na América do Sul e do Norte, especificamente, da Argentina e Estados Unidos da América (BALAJEE et al., 2009), em acordo com os achados deste estudo com amostras de solo de Mato Grosso do Sul, Br. Os quatro isolados de *A. alabamensis*, todos provenientes de lavouras apresentaram alta sensibilidade para ITC, conforme descrito por

Balajee *et al.*, 2009. Porém, os isolados das lavouras mostraram-se não selvagens para VCZ, de modo contrário como descrito quando da definição dessa espécie.

Obtivemos uma diversidade de perfis de sensibilidade aos antifúngicos, bem como uma diversidade de espécies na seção Flavi. Algumas espécies causaram raros casos de infecções em humanos e animais e para outras há relatos apenas de isolados ambientais. *A. flavus* é a espécie mais importante da seção Flavi devido aos casos de infecções humanas. Os dados dos isolados de agroflorestas e lavouras, obtidos até o momento, indicam que para *A. flavus*, recuperados de ambientes pulverizados, os valores de MIC de VCZ foram mais elevados do que aqueles de isolados de ambientes não pulverizados. Em um estudo brasileiro, cepas de *A. flavus* de lavoura de milho foram comparadas às clínicas, quanto ao efeito *in vitro* de ITC, VCZ e POS. Em geral, VCZ e POS mostraram-se eficazes contra todos os isolados, clínicos e ambientais, com apenas um MIC de VCZ alto (MIC 4,0 mg/L) para um isolado clínico. As cepas demonstraram sensibilidade a ITC e, apenas, alguns isolados ambientais apresentaram resistência (MIC \geq 4,0 mg/L) (BEDIN DENARDI *et al.*, 2018). Para ITC, os resultados com isolados de agroflorestas e lavouras de MS, se comparados com achados ambientais de Bedin Denardi e colaboradores (2018), ITC apresentou melhor atividade antifúngica sobre isolados obtidos de ambos os ambientes, com apenas um, proveniente de lavoura, mostrando resistência (MIC 2 mg/L) ao fármaco.

Aspergillus tamaritii, da seção Flavi, tem grande importância econômica, pois é uma espécie utilizada na produção de molhos e fermentação (ANANDAN; MARMER; DUDLEY, 2007); porém, em determinadas situações pode causar infecções diversas, como onicomiose (KRISTENSEN; STENDERUP; OTKJAER, 2004) e infecções secundárias em pacientes com queimaduras extensas. O que pode acontecer com essas espécies raras de *Aspergillus*, como *A. tamaritii*, é que sua abundância em determinados ambientes, como o solo, pode afetar, principalmente, trabalhadores rurais. Caso de queratite descrito na Índia, associado a incidente com barras de ferro e penetração ocular de aerossóis em áreas agrícolas, expondo a maior risco moradores de regiões agrárias do país,

com alto risco de cegueira, por conta do alto custo dos medicamentos (KREDICS et al., 2007). Casos de queratite apresentam sazonalidade, provavelmente, relacionado à períodos de maiores correntes de ar atmosférico que conduzem bioaerossóis. Um caso foi um agricultor de 65 anos, sem comorbidades, que apresentou dores de garganta, febre e diarreia, sem muco ou sangue, por cerca de três dias. O único relato antecedente do paciente, era um trauma no pé direito de aproximadamente 30 dias. O paciente apresentava faringe congestionada, com exsudatos brancos que não sangravam, e nódulos eritematosos dolorosos em algumas extremidades do corpo, como as costas, testa e tronco. Amostra de secreção da garganta apresentou bactérias Gram-positivas, em formato de coco, e células leveduriformes. Quando semeada em Sabouraud, foi isolado um fungo identificado como *A. tamarii*, pelo sequenciamento genético. O agricultor não usava sapatos durante seu trabalho, tendo contato direto com o solo. O tratamento foi realizado com sucesso, com ITC 200mg duas vezes ao dia, por quatro semanas (SHARMA et al., 2013).

Outra forma de infecção por *A. tamarii*, ocorreu em recém-nascido prematuro, admitido em UTI, o qual desenvolveu maceração eritematosa, com múltiplas pústulas e erosão, sendo diagnosticado com aspergilose cutânea primária. O exame das escamas da pele revelou hifas septadas, com ramificações em forma de Y, sugerindo *Aspergillus*. A cultura das fezes foi positiva para *Aspergillus*, a qual foi identificada molecularmente, como *A. tamarii* (KREDICS et al., 2007; GHOSH et al., 2016; MANIKANDAN et al., 2019). Ainda que a maioria dos casos de queratite seja de região agrícola na Índia, há registro de ocorrências na Espanha, associado à contaminação de lentes de contato e México (CUADROS et al., 2018; AL-HATMI et al., 2019).

A identificação de *A. tamarii* pode ser difícil, requerendo sequenciamento de vários *locus*, como região ITS e genes codificadores de β -*tubulina* e de calmodulina. Neste estudo, até o momento, foi utilizado para identificação dessa espécie, apenas, o sequenciamento do gene codificador da β -*tubulina*. O isolado foi resistente para ITC e não selvagem para VCZ e POS, mesmo sendo oriundo de solo de ambientes não pulverizados. Esse perfil de resistência não é frequente nos estudos clínicos ou ambientais, em que os valores de MIC são,

em regra, baixos para ambos os triazóis (MURA et al., 2018).

Aspergillus caelatus, outra espécie da seção Flavi, foi encontrada em amostra de solo de ambiente pulverizado, apresentando-se não selvagem para VCZ e POS, com valores muito mais elevados do que os isolados clínicos relatados na literatura, evidenciando existência de rota ambiental de resistência. Na Colômbia, *A. caelatus* foi encontrado colonizando paciente com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), sem ter sido possível associar piora do quadro pulmonar pela presença dessa espécie. Antes do encontro do isolado fúngico a paciente foi tratada por 18 meses com broncodilatadores, anti-inflamatórios, sem terapia antibiótica ou antifúngica, sendo internada por tromboembolismo pulmonar. O tamanho grande dos esporos de *A. caelatus* pode ser uma razão pela qual esta espécie não havia sido relatada anteriormente associada a doenças humanas. Porém, a patogenicidade de *A. caelatus* parece ser mais elevada do que *A. flavus* em modelo experimentação animal com larvas (LE PAPE et al., 2019).

Aspergillus parasiticus, também da seção Flavi, é encontrado em solo rico em material vegetal em decomposição, bem como em instalações de armazenamento de grãos secos. *A. parasiticus* é de importância agrícola devido à sua capacidade de causar doenças em milho, amendoim e caroço de algodão. É uma das três espécies capazes de produzir a micotoxina aflatoxina, uma das substâncias naturais mais cancerígenas já descritas. O estresse ambiental pode aumentar a produção de aflatoxina em cepas em plantas que são danificadas devido à exposição a condições climáticas adversas, durante a seca, por insetos ou por pássaros. Em humanos, a exposição às toxinas pode causar atraso no desenvolvimento em crianças e produzir doenças hepáticas graves e/ou carcinoma hepático em adultos (PITT; HOCKING, 2009). A espécie, também, pode causar aspergilose em humanos e outros animais (HORN et al., 2009).

Isolados clínicos e do meio ambiente, pertencentes à seção Nigri, apresentam sensibilidade variada aos antifúngicos, de acordo com a espécie a que pertence. No Japão, foi descrita tendência das cepas de *A. tubingensis* serem menos sensíveis aos azóis do que as de *A. niger* (HASHIMOTO et al.,

2017). Neste estudo, contudo, em isolados de agroflorestas e lavouras não foi verificada essa situação, sendo os isolados das 3 espécies classificados como não selvagens, em sua grande maioria, frente aos antifúngicos triazólicos, ainda que MIC de ITC não tenha apresentado valores tão elevados, como citado na literatura. Relato de altos valores de MIC de ITC em *A. tubingensis* (4 mg/L) e *A. niger* (32 mg/L) e baixos para VCZ e POS são encontrados na literatura internacional (GAUTIER *et al.*, 2016). A inconsistência e carência de dados de MIC para isolados ambientais desta seção, enfatiza a necessidade e relevância de estudos sobre esses patógenos oportunistas.

Aspergillus tubingensis foi, de fato isolado de pacientes hospitalizados em unidades de saúde em Marselha, França (2012 e 2013). Esta espécie foi a quinta mais comum, depois de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus*. Foram coletadas amostras respiratórias, de ouvido, de boca e cutâneas que geraram isolados submetidos à identificação molecular, com análise da sequência de β -*tubulina* e calmodulina. *A. tubingensis* foi isolado de 14 pacientes, a partir de amostras respiratórias, com metade deles em insuficiência respiratória e um paciente submetido, recentemente, a transplante. Outros pacientes já haviam sido diagnosticados, em ano anterior, com infecção por isolados da seção Nigri e cujas cepas estavam armazenadas no laboratório do hospital de Marseilles (GAUTIER *et al.*, 2016). Em outro caso, *A. tubingensis*, foi isolado da pele de uma mulher de 56 anos, que possuía diabetes tipo 2 e, quando a doença ficou sem controle de tratamento e a paciente foi hospitalizada em Yucatan, México, recebeu diagnóstico de doença dermatológica crônica assintomática. O laudo era devido a uma lesão, localizada na perna direita, que consistia em um abscesso flutuante de, aproximadamente, 10 cm de diâmetro com leve pigmentação e um exsudato purulento. O teste de sensibilidade indicou inexistência de resistência (FRÍAS-DE-LEÓN *et al.*, 2018). Além desses casos, *A. tubingensis* também pode ocasionar queratite. Em Kredics e colaboradores (2009), dois relatos de casos de queratite na Índia foram tratados com ITC e outros antifúngicos. Os dois isolados foram testados para ITC e VCZ e tiveram MIC menores que 2,0 mg/L. Diferente dos isolados clínicos, os 3 isolados de *A. tubingensis*, obtidos de solos de agroflorestas e lavouras foram não selvagens para VCZ. Portanto, neste trabalho os isolados independente do ambiente,

apresentaram valores muito mais elevados, se comparados aos de estudos de casos clínicos.

Aspergillus brasiliensis, outra espécie recuperada do solo de MS, é uma das espécies mais comuns do gênero. É, de fato, onipresente no solo, contaminante comum de alimentos e, também, é relatado regularmente em ambientes internos, como plantas industriais. A doença humana causada por *A. brasiliensis* é rara, em comparação com outras espécies de *Aspergillus*. No entanto, quando ocorre, pode resultar em quadro pulmonar grave, que requer tratamento com VCZ ou anfotericina B, ou pode se manifestar sob outras formas clínicas, como de sinusite ou otite. O gênero *Aspergillus* é responsável por cerca de 75% dos casos de otomicose (infecção do conduto auditivo externo e da aurícula), podendo ser espécies da seção Nigri, como *A. brasiliensis* a causa mais comum (ALI- HATMI et al., 2018). Quadros de queratite, causados por esta espécie, também, são relatados na literatura. Uma mulher de 49 anos, trabalhadora agrícola na Índia, apresentou dor e visão confusa no olho direito por mais ou menos 30 dias. Os sintomas começaram após exposição a casca de arroz. A paciente não tinha antecedentes oftalmológicos. Após quatro dias de coleta em forma de esfregaço, um fungo preto teve crescimento em cultura. O antifúngico utilizado para tratamento foi o ITC e cetoconazol oral 200 mg duas vezes ao dia, com acréscimo de natamicina, que logo foi substituída por anfotericina B 0,15%, além da realização de um transplante de córnea. Para pós-operatório, foi administrado clotrimazol e cetoconazol forma oral. Outra mulher indiana, de 35 anos, apresentou úlcera córnea central, esfregaços a partir de raspados deram positivo para cultura de *Aspergillus* de coloração preta. Para tratamento também foi utilizado ITC em colírio, após alguns meses a córnea estava cicatrizada. Os MICs para ITC e VCZ foram ≤ 1 mg/L frente aos agentes desses casos clínicos (MANIKANDAN et al., 2010), foram inferiores aos verificados para os isolados ambientais de *A. brasiliensis* obtidos de solos de agroflorestas.

Alguns comentários serão traçados, a seguir, sobre o segundo cálculo da ocorrência de espécies, levando-se em conta os fenótipos observados neste estudo. O agrupamento de isolados com mesmo fenótipo de sensibilidade a

antifúngicos, com base na sua origem e valores de MIC, abriu uma nova perspectiva da ocorrência de resistência. Provavelmente, o cálculo de resistência segundo agrupamento em fenótipos, considerando apenas um indivíduo aqueles com mesmo fenótipo e mesma origem, seja mais realista. Ou seja, várias colônias fúngicas obtidas da mesma amostra de solo com mesmo fenótipo, representavam, apenas, um indivíduo. Com esse critério, supondo-se que cada fenótipo represente um indivíduo, pode-se inferir que o estudo compreendeu 58 isolados e não 68 isolados.

Dentro dessa análise, *A. fumigatus* manteve-se como prevalente, tanto em agroflorestas, quanto em lavouras. Dentre os 58 indivíduos, excluindo-se repetições de mesmo indivíduo na análise, a frequência de resistentes e não selvagens foi quase total (93,1%), com apenas 4 isolados, todos de *A. fumigatus*, sendo sensíveis, reforçando que a via ambiental de resistência azólica como muito importante e requerendo maior investigação. Tomando-se como base as 4 espécies mais relevantes, *A. fumigatus* foi a espécie mais abundante e, ainda com altíssima proporção de resistência, foi, comparativamente, a que apresentou alguma taxa de isolados sensíveis in vitro aos medicamentos (14,8%). A extensa maioria (73,9%; 17/23) dos isolados resistentes de *A. fumigatus* foi recuperada das lavouras. Todos os isolados (100%) de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* foram resistentes a um ou mais fármacos azólicos. De modo surpreendente, a frequência de fenótipos resistentes e não selvagens foi idêntica naqueles recuperados de lavouras (50%) e de agroflorestas (50%) nessas 3 espécies. Assim, dentre a variável de maior interesse neste estudo, a resistência a azóis, ocorreu tanto em isolados de solo pulverizados quanto orgânicos, indicando inexistência de nexos causal entre exposição a fungicidas e desenvolvimento de resistência a fármacos azólicos.

No entanto, tais dados de resistência por adoção do agrupamento em fenótipos só poderão ser validados se comprovada a similaridade genética entre isolados que apresentam o mesmo fenótipo. Para tanto, a análise de genoma completo ou por microssatélites é necessária pois tem maior poder discriminatório em *Aspergillus*, assim, como em outros gêneros, do que a fenotipagem por sensibilidade a antifúngicos (DE VALK et al., 2005). Estudos

futuros com os fenótipos encontrados neste estudo poderão comprovar a consistência do agrupamento por fenótipos, como sugerido nesta Dissertação. Até que isso ocorra, os dados de resistência foram calculados sobre todos os 68 isolados e assim se baseiam as conclusões do estudo.

Apesar do aumento de resistência clínica e microbiológica, em casos de aspergilose, e o uso de pesticidas ser uma prática muito frequente nas Américas, não há estudos que interliguem a resistência em *A. fumigatus* com fungicidas agrícolas e/ou aos azóis clínicos (HOLLOMON, 2017). Estudos são importantes para avaliação do impacto do uso desses produtos químicos em fungos saprófitas ambientais, como espécies de *Aspergillus* (LE PAPE et al., 2016). As taxas de resistência, em diversas espécies de *Aspergillus*, aos fármacos azólicos com base nos perfis de sensibilidade verificados neste estudo, devem ser destacadas. Embora a resistência aqui relatada seja ambiental e não esteja relacionada a processos infecciosos ativos, é importante considerar a ocorrência de resistência *in vitro* encontrada nos isolados de *Aspergillus* das seções Fumigati e Flavi, como predominantes patógenos em países tropicais e subtropicais e seu impacto na clínica médica. A fronteira entre as rotas de resistência ambiental e clínica é desconhecida e isso é um incentivo para pesquisas sobre as condições que facilitam o desenvolvimento, seleção e disseminação de fenótipos de *Aspergillus* resistentes, que têm escopo multidisciplinar e requer colaborações dentro da perspectiva de saúde única (BUIL et al., 2019).

6. CONCLUSÕES

A identificação de espécie por sequenciamento do gene *β -tubulina* foi realizada em 68 isolados, proporcionando a verificação de 10 espécies.

Isolados resistentes, ou não selvagens (NWT), a azóis foram encontrados em alta frequência e em todas as espécies, com destaque para multirresistência a ITC, VCZ e POS em três isolados de *A. fumigatus*.

Solo de lavouras tradicionais foi origem de maior resistência (58,7%), em relação ao de agroflorestas. *A. fumigatus* resistente a azóis, foram recuperados com maior frequência de lavouras, em relação às agroflorestas. A existência da rota da resistência ambiental nos agentes de aspergilose foi comprovada no estado de MS. No entanto, sua relação do uso de fungicidas azólicos de uso agrícola não foi evidenciada, mesmo em áreas de forte agronegócio, mantendo em aberta a questão do impacto desses agrotóxicos na pressão seletiva de resistência em *Aspergillus*.

Solo de lavouras, assim como agroflorestas continham isolados pertencentes a quatro seções de *Aspergillus*, maior frequência de Fumigati, seguida de Nigri, Terrei e Terrei;

A prevalência de *Aspergillus fumigatus*, o principal agente de aspergilose, foi notória sobre outras de interesse clínico, *A. terreus*, *A. flavus* e *A. niger* ou fitopatógenas de interesse agrícola e/ou industrial (*A. alabamensis*, *A. tubingensis*, *A. tamarii*, *A. caelatus*, *A. parasiticus* e *A. brasiliensis*);

A mínima sensibilidade aos fármacos azólicos ITC, VCZ e POS, foi alarmante, no conjunto de isolados ambientais, independente da espécie, sendo relevante o encontro de isolados resistentes ou não selvagens a um ou mais azóis na extensa maioria dos isolados de *A. fumigatus*;

Para fungicidas azólicos, tebuconazol e difeconazol, foram observados isolados pouco sensíveis pela concentração inibitória mínima observada, mostrando um reduto de resistência a azóis que podem facilitar disseminação de resistência cruzada com fármacos triazólicos de uso clínico;

Multirresistência ambiental foi encontrada, amplamente, entre isolados de várias espécies, incluindo *A. fumigatus*, indicando risco de aquisição de agentes

com possibilidade de gerar resistência à terapia com triazólicos em pacientes com aspergilose;

Solos de agrofloresta, também, proporcionaram recuperação de isolados resistentes e não selvagens, impossibilitando demonstrar uma relação entre resistência e exposição a fungicidas.

Os tipos de fungicidas usados nas lavouras analisadas não puderam ser mais bem conhecidos, pela falta de informações dos agricultores gerada por motivos indefinidos, exemplificando uma das dificuldades que contribuíram para a fragilidade, como já evidenciada na literatura, donexo-causal do impacto de fungicidas na ocorrência de resistência ambiental.

A alta proporção de isolados ambientais de *A. fumigatus*, em amostras de solo coletadas em diversas regiões do estado de Mato Grosso do Sul e a forte resistência demonstrada, faz deste estudo pioneiro, um alerta para a presença da rota ambiental de resistência no estado e motiva à vigilância desse patógeno oportunista em diversos ambientes e estimula a busca de fatores determinantes para essa ocorrência nessa região.

7.REFERÊNCIAS

AL-HATMI, Abdullah M. S.; CASTRO, Marino Alcantara; HOOG, G. Sybren; BADALO, Hamid; ALVARADO, Victor Flores; VERWEIJ, Paul E.; MEIS, Jacques F.; ZAGO, Virginia Vanzzini. Epidemiology of *Aspergillus* species causing keratitis in Mexico. **Mycoses**, v. 62, n. 2, p. 144–151, fev. 2019.

ALI, Khaled; HAMED, Mameda; HASSAN, Hameda; ESMAIL, Amira; SHENEEF, Abeer. Identification of Fungal Pathogens in Otorrhinomycosis and Their Drug Sensitivity: Our Experience. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 22, n. 04, p. 400–403, out. 2018.

ALVAREZ-MORENO, C.; LAVERGNE, R.; HAGEN, F.; MORIO, F.; MEIS, J. F.; PAPE, P. L. 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.

ANANDAN, Dayanandan; MARMER, William N; DUDLEY, Robert L. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkalineprotease isolated from *Aspergillus tamaritii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 339–347, 12 abr. 2007.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 52, n. 5, p. 799–804, ago. 2003.

ARENDRUP, Maiken C.; JENSEN, Rasmus H.; GRIF, Katharina; SKOV, Marianne; PRESSLER, Tacjana; JOHANSEN, Helle K.; LASS-FLORL, Cornelia. In Vivo Emergence of *Aspergillus terreus* with Reduced Azole Susceptibility and a Cyp51a M217I Alteration. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 981–985, 15 set. 2012.

ARMANDO, Marcio Silveira; BUENO, Ynaiá Masse; ALVES, Edson Raimundo da Silva; CAVALCANTE, Carlos Henrique. Agrofloresta para Agricultura Familiar. **Embrapa**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 01-11, dez. 2002.

BADDLEY, John W.; PAPPAS, Peter G; SMITH, Anita C.; MOSER; Stephen A. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a University Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5525–5529, dez. 2003.

BALINI, L. C.; LUIS, A. S.; SOARES, L. C.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; FIORINI, Adriana. Identificação, pela técnica de PCR-RFLP, de *Aspergillus* spp. Isolados de grãos de soja e milho. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, 11 ago. 2015.

BEDIN DENARDI, Laura; DALLA-LANA, Bianca Hoch; JESUS, Francinelli Pantella Kunz; SEVERO, Cecília Bittencourt; SANTURIO, Janio Moraes; ZANETTE, Régis Adriel; ALVES, Sydney Hartz. In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 30–36, jan. 2018.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, 31 dez. 2004.

BIO GENE. **K204**: Extração de DNA/RNA Viral. Belo Horizonte: Bioclin-Quibasa, 2017. 32 p.

BONGOMIN, Felix; GAGO, Sara; OLADELE, Rita O.; DENNING, David W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017.

BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. Removal of Herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 2, p. 418–426, mar. 2001.
BOWYER, P.; DENNING, D. W. Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*: Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 2, p. 173–178, fev. 2014.

BUIL, Jochem B.; HARE, Rasmus K.; ZWAAN, Bas J.; ARENDRUP, Maiken C.; MELCHERS, Willem J.G.; VERWEIJ, Paul E. The fading boundaries between patient and environmental routes of triazole resistance selection in *Aspergillus fumigatus*. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. e1007858, 22 ago. 2019.

BURKS, Caroline; DARBY, Alexandra, LONDOÑO, Luisa Gómez; MOMANY, Michele; BREWER, Marin T. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment: Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 7, p. e1009711, 29 jul. 2021.

BURROUGH, Eric; DEITZ, Krysta; KINYON, Joann; ANDREASEN, Claire; FRANA, Timothy; SUTTON, Deanna; THOMPSON, Elizabeth; FU, Jianmin; WICKES, Brian; HOSTETTER, Jesse. Disseminated aspergillosis in a dog due to *Aspergillus alabamensis*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2012.

CHEN, Zhi-Feng; YING, Guang-Guo; MA, Yi-Bing; LAI, Hua-Jie; Chen, Feng; PAN, Chang-Gui. Typical Azole Biocides in Biosolid-Amended Soils and Plants Following Biosolid Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 26, p. 6198–6206, 3 jul. 2013.

CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; RANDHAWA, H. S.; GAUR, S. N.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F.. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 362–366, 1 fev. 2012.

CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; XU, J.; MEIS, J. F.. Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003633, 24 out. 2013.

CLSI, M57: Principles and procedures for the development of epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. Wayne, v.36, n.6, p. 1-13, abr.2016.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir desolo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc. agrotec.**, v. 32, n. 3, p. 5, 2008.

CUADROS, Juan; GROS-OTERO, Juan; GALLEGU-ANGUI, Patricia; SCHEU, Ann Karolin; MONTES-MÓLLON, Ángeles; PÉREZ-RICO, Cinta; MORENO, Javier Paz; GÓMEZ-HERRUZ, Peña; SOLIVERI, Juan; TEUS, Miguel. *Aspergillus tamaritii* keratitis in a contact lens wearer. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p. 21–24, mar. 2018.

DENNING, D. W.; VENKATESWARLU, K.; OAKLEY, K. L.; ANDERSON, M. J.; MANNING, N. J.; STEVENS, D. A.; WARNOCK, D. W.; KELLY, S. L. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n. 6, p. 1364–1368, jun. 1997.

ESCRIBANO, P.; PELÁEZ, T.; RECIO, S.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Characterization of clinical strains of *Aspergillus terreus* complex: molecular identification and antifungal susceptibility to azoles and amphotericin B. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 2, p. E24–E26, fev. 2012.

EUCAST. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.2**: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. [s.l]: Eucast, 2020. 23 p.

FRÍAS-DE-LEÓN, M. G.; ROSAS-DE PAZ, E.; ARENAS, R.; ATOCHE, C.; DUARTE-ESCALANTE, E.; SOSCHIN, Molina, D.; ACOSTA-ALTAMIRANO, G.; RYES-MONTES, M.R. Identification of *Aspergillus tubingensis* in a primary skin infection. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p. 274–278, jun. 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Land Use**. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RL>. Acesso em: 19 jun. 2021 ^a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Pesticides Use**. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>. Acesso em: 10 dez. 2021 ^b.

GARCIA-RUBIO, R. et al. *Aspergillus fumigatus* Cross-Resistance between Clinical and Demethylase Inhibitor Azole Drugs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 5, 12 fev. 2021.

GAUTIER, Magali; NORMAND, Anne-Cécile; L'OLLIVER, Coralie; CASSAGNE, Carole; REYNAUD-GAUBERT, Martine; DUBUS, Jean-Christophe; BRÉGEON,

Fabienne; HENDRICKX, Marijke; GOMEZ, Carine; RANQUE, Stéphane; PIARROUX, Renaud.. *Aspergillus tubingensis*: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 459–470, 1 jul. 2016.

GISI, U. Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: a critical review: Resistance risk for DMIs in *Aspergillus fumigatus*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 352–364, mar. 2014.

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.

GHOSH, Anup K.; GRUPTA, Amit; RUDRAMURTHY, Shivaprakash M.; PAUL, Saikat; HALLUR, Vinay Kumar; CHAKRABARTI, Arunaloke. Fungal Keratitis in North India: Spectrum of Agents, Risk Factors and Treatment. **Mycopathologia**, v. 181, n. 11–12, p. 843–850, dez. 2016.

GROLL, A. H.; KOLVE, H. Antifungal Agents: In Vitro Susceptibility Testing, Pharmacodynamics, and Prospects for Combination Therapy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 256–270, 1 abr. 2004.

HAGIWARA, D.; WATANABE, A.; KAMEI, K.; GOLDMAN, GH. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 21 set. 2016.

HASHIMOTO, Aki; HAGIWARA, Daisuke; WATANABE, Akira; YAHIRO, Maki; YIKELAMU, Alimu; YAGUCHI, Takashi; KAMEI, Katsuhiko. Drug Sensitivity and Resistance Mechanism in *Aspergillus* Section *Nigri* Strains from Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, ago. 2017.

HOLLOMON, D. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? Agricultural azole fungicides and *A. fumigatus* resistance. **Pest Management Science**, v. 73, n. 10, p. 1987–1993, out. 2017.

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.

HORN, Bruce W.; RAMIREZ-PRADO, Jorge H.; CARBONE, Ignazio. The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. **Mycologia**, v. 101, n. 2, p. 275–280, mar. 2009.

IMBERT, S.; NORMAND, A.C.; RANQUE, S.; COSTA, J.M.; GULTARD, J.; ACOOCEBERRY, L.; BONNAL, C.; FEKKAR, A.; BOUGEOLS, N.; HOUZÉ, S.; HENNEQUIN, C.; PIARROUX, R.; DANNAOUL, E. BOTTEREL, F. Species

Identification and *In Vitro* Antifungal Susceptibility of *Aspergillus terreus* Species Complex Clinical Isolates from a French Multicenter Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, maio 2018.

JENKS, Jeffrey; HOENIGL, Martin. Treatment of Aspergillosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 98, 19 ago. 2018.

KABAY, M. J.; ROBINSON, W. F.; HUXTABLE, C. R.; MCALEER, R.. The Pathology of Disseminated *Aspergillus terreus* Infection in Dogs. **Vet. Patho**, S.L, v. 22, p. 540-547, 1985.

KREDICS, László; VARGA, János; KOCSUBÉ, Sándor; DÓCZI, Ilona; SAMSON, Robert A.; RAJARAMAN, Revathi; NARENDRAN, Venkatapathy; BHASKAR, Madhavan; VÁGVOLGYI, Csaba; MANIKANDAN, Palanisamy. Case of Keratitis Caused by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3464–3467, out. 2007.

KREDICS, László; VARGA, János, KOCSUBÉ, Sandor. RAJARAMAN, Revathi; RAGHAVAN, Anita; DÓCZI, Ilona; BHASKAR, Madhavan; NÉMETH, Tibor, Mihály; ANTAL, Zsuzsanna; VENKATAPATHY, Narendran; VÁGVOLGYI, Csaba; SAMSON, Robert A.; CHOCKAIYA, Manoharan; PALANISAMY, Manikandan. Infectious Keratitis Caused by *Aspergillus tubingensis*. **Cornea**, v. 28, n. 8, p. 951–954, set. 2009.

KRISTENSEN, Lise; STENDERUP, Jorgen; OTKJAER, Aksel. Onychomycosis due to *Aspergillus tamarii* in a 3-year-old Boy. **Acta Dermato-Venereologica**, S.L, v., n., p. 1-2, out. 2004.

LACAZ, Carlos da Silva; PORTO, Edward; HEINS-VACCARI, Elisabeth Maria; MELO, Natalina Takahashi de. **Guia para identificação Fungos Actinomicetos Algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. 445 p.

LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310–350, abr. 1999.

LATGÉ, Jean-Paul.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, 18 dez. 2019.

LINDEN, J. w. m. van Der; JANSEN, R. r.; BRESTERS, D.; VISSER, C. e.; GEERLINGS, S. e.; KUIJPER, Ed j.; MELCHERS, Willem j. g.; VERWEIJ, Paul e.. Azole-Resistant Central Nervous System Aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 8, p. 1111–1113, 15 abr. 2009.

LINDEN, J.w.m. van Der; CAMPS, S. M. T.; KAMPINGA, G. A.; ARENDS, J. P. A.; DEBETS-OSSenkOPP, Y. J.; HAAS, P. J. A.; RIJNDERS, B. J. A.; KUIJPER, E. J.;

VAN TIEL, F. H.; VARGA, J. Aspergillosis due to Voriconazole Highly Resistant *Aspergillus fumigatus* and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates From Domiciles. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 4, p. 513–520, 15 ago. 2013.

LINDEN, J.w.m. van Der; ARENDRUP, M.c.; WARRIS, A.; LAGROU, K.; PELLOUX, H.; HAUSER, P.m.; CHRYSANTHOU, E.; MELLADO, E.; KIDD, S.e.; TORTORANO, A.M. Prospective Multicenter International Surveillance of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 1041–1044, jun. 2015.

LAVERGNE, R.; MORIO, F.; FAVENNEC, L.; DOMINIQUE, S.; MEIS, J. F.; GARGALA, G.; VERWEIJ, Paul E.; PAPE, P. L. First Description of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Due to TR 46 /Y121F/T289A Mutation in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4331–4335, jul. 2015.

LE PAPE, P.; LAVERGNE, R.; MORIO, F.; ALVAREZ-MORENO, C.. Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 156–157, jan. 2016.

LE PAPE, Patrice; XIMENES, Rafael Matos; ARIZA, Beatriz; IRIARTE, Juan; ALVARADO, Jaime; ROBERT, Estelle; SIERRA, Claudia; MONTAÑEZ, Anita; ÁLVAREZ-MORENO, Carlos. First case of *Aspergillus caelatus* airway colonization in a Chronic Obstructive Pulmonary Disease patient. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 85–90, abr. 2019.

LOCKHART, S. R.; FRADE, J. P.; ETIENNE, K. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; BALAJEE, S. A.. 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.

MARR, K. A.; PATTERSON, T.; DENNING, D. Aspergillosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 875–894, dez. 2002.

MANIKANDAN, Palanisamy; ABEL-HADI, Ahmed; SINGH, Yendrembam Randhir Babu; REVATHI, Rajaraman; ANITA, Raghavan; BANAWAS, Saeed; DUKHYIL, Abdul Aziz Bin; ALSHEHRI, Bader; SHOBANA, Coimbatore Subramanian; SELVAM, Kanesan Panneer; NARENDRAN, Venkatapathy. Fungal Keratitis: Epidemiology, Rapid Detection, and Antifungal Susceptibilities of *Fusarium* and *Aspergillus* Isolates from Corneal Scrapings. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–9, 20 jan. 2019.

MANIKANDAN, Palanisamy; VARGA, János; KOCSUBÉ, Sándor; REVATHI, Rajaraman; ANITA, Raghavan; DÓCZI, Ilona; NÉMETH, Tibor, Mihály; NARENDRAN, Venkatapathy; VÁGVOLGVI, Csaba; BHASKAR, Madhavan; MANOHARAN, Chpckaiya; SAMSON, Robert, A.; KREDICS, László. Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. **Journal of Medical Case Reports**, v. 4, n. 1, p. 68, dez. 2010.

MEIS, Jacques F.; CHOWDHARY, Anuradha; RHODES, Johanna L.; FISHER, Matthew C.; VERWEIJ, Paul E. 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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspergilose**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aspergilose>. Acesso em: 27 dez. 2021

MONPIERRE, Lorra; DESBOIS-NOGARD, Nivole; VALSECCHI, Isabel; BAJAL, Marielle; ANGEBAULT, Cécile; MIOSSEC, Charline; BOTTEREL, Françoise; DANNANOUI, Éric. Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus* Isolates from the French West Indies (Martinique). **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, p.355, 30 abr. 2021.

MORIO, F.; AUBIN, G. G.; DANNER-BOUCHER, I.; HALOUN, A.; SACCHETTO, E.; GARCIA-HERMOSO, D.; BRETAGNE, S.; MIEGEVILLE, M.; PAPE, P. L. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1870–1873, 1 ago. 2012.

MOUSTAFA, S. Possibility of Reducing Presence of Harmful Fungi in Air-Conditioner Windows Using A Transcendental Antifungal Chemical. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 59–70, 1 jan. 2019.

PFALLER, M.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.; KROEGER, J.; MESSER, S.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. Use of Epidemiological Cutoff Values To Examine 9-Year Trends in Susceptibility of *Aspergillus* Species to the Triazoles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 586–590, 1 fev. 2011.

PITT, John I.; HOCKING, Ailsa D.. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. New York: Springer, 2009. 524 p.

SALAH, Husam; LACKNER, Michaela; HOUBRAKEN, Jos; THEELEN, Bart; LASS-FLORL, Cornelia; BOEKHOUT, Teun; ALMASLAMANI, Muna; TAJ-ALDEEN, Saad J. The Emergence of Rare Clinical *Aspergillus* Species in Qatar: Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility Profiles. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p. 1677, 30 jul. 2019.

SALMANTON-GARCÍA, Jon; SPRUTE, Rosanne; STEMLER, Jannik; BARTOLETTI, Michele; DUPONT, Damien; VALERIO, Maricela; GARCIA-VIDAL, Carolina; FALCES-ROMERO, Iker; MACHADO, Marina; DE LA VILLA, Sofía; SCHROEDER, Maria; HOYO, Irma; HANSES, Frank; FERREIRA-PAIM, Kennio; GIACOBBE, Daniele Roberto; MEIS, Jacques F.; GANGNEUX, Jean-Pierre; RODRÍGUEZ-GUARDADO, Azucena; ANTINORI, Spinello; SAL, Ertan; MALAJ, Xhorxha; SEIDEL, Danila; CORNELLY, Oliver A.; KOEHLER, Philipp.

COVID-19–Associated Pulmonary Aspergillosis, March–August 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, p. 1077–1086, 2021.

SILVA, D. DE M. C. E et al. A new culture medium for recovering the agents of Cryptococcosis from environmental sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 355–358, jun. 2015.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, 15 mar. 2016.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, fev. 2002.

SERFLING, A.; WOHLRAB, J.; DEISING, H. B. Treatment of a Clinically Relevant Plant-Pathogenic Fungus with an Agricultural Azole Causes Cross-Resistance to Medical Azoles and Potentiates Caspofungin Efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3672–3676, out. 2007.

SHARMA, Sadhna; YENIGALLA, Bindu Madhav; NAIDU, Sujeet Kumar; PIDAKALA, Premalatha. Primary cutaneous aspergillosis due to *Aspergillus tamaritii* in an immunocompetent host. **Case Reports**, v. 2013, n. aug22 1, p. bcr2013010128– bcr2013010128, 22 ago. 2013.

SNELDERS, E.; VELD, R. A. G. H. I.; RIJS, A. J. M. M.; KEMA, Gert H. J.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.. Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4053–4057, 15 jun. 2009.

SNELDERS, Eveline; CAMPS, Simone M.T.; KARAWAJCZYK, Anna; SCHAFTENAAR, Gijs; KEMA, Gert H.J.; VAN DER LEE, Henrich A.; KLAASSEN, Corné H. MELCHERS, Willem J. G.; VERWEIJ, Paul E. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e31801, 1 mar. 2012.

STEINMANN, J.; HAMPRECHT, A.; VEHRESCHILD, M. J. G. T.; CORNELY, O. A.; BUCHHEIDT, D.; SPIESS, B.; KOLDEHOFF, M.; BUER, J.; MEIS, J. F.; RATH, P.- m.. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1522–1526, maio 2015.

SYNGENTA. **CYPRESS 400 EC**. Paulínia: Syngenta, 2021. 23 p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L.. Microorganismos e doenças humanas: Doenças microbianas do sistema respiratório. In: TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Cap. 24, p. 701.

VAHEDI SHAHANDASHTI, R.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal resistance in *Aspergillus terreus*: A current scenario. **Fungal Genetics and Biology**, v. 131,

p. 103247, out. 2019.

DE VALK, Hanneke A.; MEIS, Jacques F. G. M.; CURFS, Ilse M.; MUEHLETHALER, Konrad; MOUTON, Johan W.; KLAASSEN, Corné H. W. Use of a Novel Panel of Nine Short Tandem Repeats for Exact and High-Resolution Fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4112–4120, ago. 2005.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and Soil**, v. 122, n. 1, p. 21–28, fev. 1990a.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. **Plant and Soil**, v. 122, n. 1, p. 29–37, fev. 1990b.

YANG, Yun-liang; LIN, Chih-chao; CHANG, Te-pin; LAUDERDALE, Tsai-ling; CHEN, Hui-ting; LEE, Ching-fu; HSIEH, Chih-wen; CHEN, Pei-chen; LO, Hsiu-jung. Comparison of Human and Soil *Candida tropicalis* Isolates with Reduced Susceptibility to Fluconazole. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34609, 5 abr. 2012.

ZHANG, J.; HEUVEL, J. van Den; DEBETS, A. J. M.; VERWEIJ, P. E.; MELCHERS, W. J. G.; ZWAAN, Bas J.; SCHOUSTRA, S. E.. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1863, p. 20170635, 27 set. 2017.

ZORAN, Tamara; SARTORI, Bettina; SAPPI, Laura; AIGNER, Maria; SÁNCHEZ-REUS, Ferran; REZUSTA, Antonio; CHOWGHARY, Anuradha; TAJ-ALDEEN, Saad J.; ARENDRUP, Maiken C.; OLIVERI, Salvatore; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana; LAGROU, Katrien; CASCIO, Giuliana; MEIS, Jacques F.; BUXINA, Walter; FARINA, Claudio; DROGARI-APIRANTHITOU, Miranda; GRANCINI, Anna; TORTORANO, Anna M.; WILLINGER, Birgit; HAMPRECHT, Axel; JOHNSON, Elizabeth; KLINGSPOR, Lena; ARSIC-ARSENJEVIC, Valentina; CORNELLY, Oliver A.; MELETIADIS, Joseph; PRAMMER, Wolfgang; TULLIO, Vivian; VEHRESCHILD, Jorg-Janne; TROVATO, Laura; LEWIS, Russel E.; SEGAL, Esther; RATH, Peter-Michael; HAMAL, Petr; RODRIGUEZ-IGLESIAS, Manuel; ROILIDES, Emmanuel; AKDAGIL-AKIRAN, Sevtap; CHAKRABARTI, Arunaloke; COLOMBO, Arnaldo L.; FERNÁNDEZ, Mariana S.; MARTIN-GOMEZ, M. Teresa; BADALI, Hamid; PETRIKKOS, Georgios; KIMKO, Nikolai; HEIMANN, Sebastian M.; UZUN, Omrum; ROUDBARY, Maryam; DE LA FUENTE, Sonia; HOUBRAKEN, Jos; RISSIEGGER, Brihitte; LASS-LORL, Cornelia; LACKNER, Michaela. Azole-Resistance in *Aspergillus terreus* and Related Species: An Emerging Problem or a Rare Phenomenon? **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 516, 28 mar. 2018.

ANEXO 1

APÊNDICE 1

Antifúngico	Espécie	EUCAST breakpoint (mg/L)			Antifúngico	Espécie	WT ≤
		≤ S	R >	ATU			
Voriconazol	<i>A. fumigatus</i>	1	1	2	Voriconazol	<i>A. flavus</i>	2
	<i>A. flavus</i>	1	1	2		<i>A. fumigatus</i>	1
Itraconazol	<i>A. fumigatus</i>	1	1	2	Itraconazol	<i>A. niger</i>	2
	<i>A. terreus</i>	1	1	2		<i>A. terreus</i>	2
Posaconazol	<i>A. fumigatus</i>	0,125	0,25	0,25	Posaconazol	<i>A. flavus</i>	1
	<i>A. terreus</i>	0,125	0,25	0,25		<i>A. fumigatus</i>	1
						<i>A. niger</i>	4
						<i>A. terreus</i>	0,5
						<i>A. flavus</i>	0,5
						<i>A. fumigatus</i>	0,25
						<i>A. niger</i>	0,5
						<i>A. terreus</i>	0,25

APÊNDICE 2

Glossário de termos usados para interpretação da sensibilidade antifúngica

Breakpoint: valores de corte clínico usados para classificar os resultados em três categorias de suscetibilidade: suscetível/sensível regime de dosagem, suscetível/sensível e resistente

Isolado resistente: aquele para o qual o MIC de determinado antifúngico ficou na categoria de resistente, segundo ponto de corte clínico do EUCAST

Isolado sensível: aquele para o qual o MIC de determinado fármaco ficou na categoria de sensível, segundo ponto de corte clínico do EUCAST

Isolado selvagem: aquele para o qual o MIC de determinado fármaco ficou abaixo ou no valor do ponto de corte epidemiológico, segundo EUCAST

Isolado não selvagem: aquele para o qual o MIC de determinado fármaco ficou acima do valor do ponto de corte epidemiológico, segundo EUCAST

Isolado menos sensível: aquele para o qual o MIC de TEB ou DIF foi acima de 16 mg/L

Isolado mais sensível: aquele para o qual o MIC de TEB ou DIF foi igual ou menor a 16 mg/L

Multirresistência: condição que isolado apresenta quando é resistente ou não selvagem a mais de uma classe de antimicrobiano

Resistência cruzada: condição de um isolado que desenvolve resistência a um composto químico antimicrobiano, após suposta exposição ambiental ou clínica, e apresenta resistência a outro composto de mesma classe química

Características de 131 aislados de *Aspergillus* obtenidos de 61 muestras de

solo de 9 lavouras e 3 agroflorestas, estado de Mato Grosso do Sul, 2020-2021

n	N	Seção/Es pécie	MIC (mg/L)					Tipo de cultivo	Amostr a de solo	Município
			ITC	VCZ	POS	TEB	DIF			
2	1	<i>A.fumig atus</i>	8	8	0,25	4	8	pulverizado	9(faz.3)	Sidrolândia
3	2	<i>A.niger</i>	8	>8	1	4	16	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
4	3	<i>A.flavus</i>	1	8	0,25	16	>16	pulverizado	3(faz. 1)	Rio Verde de Mato Grosso
5	4	<i>A.fumig atus</i>	1	2	0,25	8	8	pulverizado	8(faz.2)	Sidrolândia
6	5	<i>A.fumig atus</i>	8	1	0,25	1	1	pulverizado	8(faz.2)	Sidrolândia
7	6	<i>A.fumig atus</i>	8	1	0,25	8	16	pulverizado	9(faz.3)	Sidrolândia
8	7	<i>A.tamari i</i>	4	8	0,5	16	>16	orgânico	2(Agro. 1)	Sidrolândia
9	8	Nigri	8	1	0,25	NR	NR	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
10	9	<i>A.fumig atus</i>	0,25	1	0,5	16	>16	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
11	10	<i>A.tamari i</i>	0,5	0,25	0,015	>16	16	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
12	11	<i>A.fumig atus</i>	8	1	0,03	1	>16	pulverizado	5(faz.3)	Rio Verde de Mato Grosso
13	12	Flavi	8	1	0,5	NR	NR	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
14	13	<i>A.flavus</i>	1	>8	2	NR		orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
15	14	<i>A.niger</i>	8	1	0,06	>16	>16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
16	15	Fumigati	NR	8	2	NR	NR	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
17	16	<i>A.fumig atus</i>	0,5	8	0,5	16	16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
18	17	<i>A.niger</i>	2	0,5	NR	16	>16	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
19	18	Flavi	NR	1	1	NR	NR	pulverizado	8(faz.2)	Sidrolândia
20	19	<i>A.flavus</i>	2	0,12	2	16	>16	pulverizado	3 (faz.1)	Rio Verde de Mato Grosso
21	20	Fumigati	2	0,25	0,12	NR	NR	pulverizado	7 (faz.1)	Sidrolândia
22	21	Nigri	NR	0,25	1	NR	NR	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
23	22	<i>A.fumig atus</i>	conta mina do	8	2	-	-	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande

2	2	<i>Fumigati</i>	NR	8	2	NR	NR	pulverizado	9(faz.3)	Sidrolândia
4	3									
2	2	<i>Flavi</i>	1	8	0,5	NR	NR	pulverizado	8 (faz.2)	Sidrolândia
5	4									
2	2	<i>A.fumigatus</i>	1	>8	>8	>16	>16	pulverizado	4 (faz.2)	Rio Verde de Mato Grosso
6	5									
2	2	<i>A.fumigatus</i>	>8	8	0,5	>16	>16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
7	7									
2	2	<i>A.tubingensis</i>	>8	8	0,5	>16	4	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
8	8									
2	2	<i>A.brasiliensis</i>	4	8	>8	>16	>16	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
9	9									
3	3	<i>Nigri</i>	NR	8	1	NR	NR	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
0	0									
3	3	<i>Fumigati</i>	2	1	0,25	NR	NR	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
1	1									
3	3	<i>A.fumigatus</i>	0,015	0,03	0,03	8	8	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
2	2									
3	3	<i>A.niger</i>	2	8	0,5	8	>16	pulverizado	8 (faz.2)	Sidrolândia
3	3									
3	3	<i>A.parasiticus</i>	NR	8	0,25	8	>16	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
4	4									
3	3	<i>A.parasiticus</i>	2	8	0,5	8	>16	pulverizado	7 (faz.1)	Sidrolândia
5	5									
3	3	<i>A.fumigatus</i>	1	0,12	0,25	8	8	pulverizado	3 (faz.1)	Rio Verde de Mato Grosso
6	6									
3	3	<i>A.fumigatus</i>	NR	>8	>8	8	16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
7	8									
3	3	<i>Fumigati</i>	NR	8	0,06	NR	NR	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
8	9									
3	4	<i>Terrei</i>	NR	8	0,5	NR	NR	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
9	0									
4	4	<i>A.fumigatus</i>	0,5	8	1	1	4	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
0	1									
4	4	<i>Terrei</i>	NR	4	0,5	NR	NR	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
1	2									
4	4	<i>A.fumigatus</i>	8	4	1	1	1	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
2	5									
4	4	<i>A.fumigatus</i>	NR	1	0,03	8	>16	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
3	6									
4	4	<i>A.fumigatus</i>	NR	8	0,25	4	8	pulverizado	9(faz.3)	Sidrolândia
4	7									
4	4	<i>Fumigati</i>	NR	>8	>8	NR	NR	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
5	9									
4	5	<i>Flavi</i>	NR	8	0,06	NR	NR	pulverizado	5 (faz.3)	Rio Verde de Mato Grosso
6	2									
4	5	<i>Flavi</i>	NR	4	0,25	NR	NR	orgânico	7 (faz.1)	Sidrolândia
7	3									
4	5	<i>A.fumigatus</i>	NR	8	0,25	4	4	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
8	4									

49	55	<i>Flavi</i>	NR	8	1	NR	NR	orgânico	7 (Agro.1)	Sidrolândia
50	56	<i>Nigri</i>	NR	>8	2	NR	NR	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
51	58	<i>Nigri</i>	NR	>8	2	NR	NR	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
52	59	<i>A.flavus</i>	1	4	0,12	8	>16	orgânico	7 (Agro.1)	Sidrolândia
53	60	<i>A.flavus</i>	NR	8	0,5	NR	NR	pulverizado	3 (faz.1)	Rio Verde de Mato Grosso
54	61	<i>A.caelatus</i>	fazer	8	4	16	>16	pulverizado	3 (faz.3)	Rio Verde de Mato Grosso
55	62	<i>Fumigati</i>	fazer	>8	>8	fazer	fazer	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
56	63	<i>A.fumigatus</i>	0,5	fazer	fazer	16	>16	pulverizado	7 (faz.1)	Sidrolândia
57	64	<i>Fumigati</i>	fazer	8	0,25	NR	NR	pulverizado	15 (faz.1)	Figueirão
58	65	<i>A.fumigatus</i>	0,12	8	>8	1	4	pulverizado	15 (faz.1)	Figueirão
59	67	<i>A.fumigatus</i>	0,5	8	>8	>16	>16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
60	68	<i>A.fumigatus</i>	fazer	8	>8	16	>16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
61	69	<i>A.fumigatus</i>	0,5	8	4	>16	>16	pulverizado	15 (faz.1)	Figueirão
62	72	<i>Fumigati</i>	fazer	8	>8	fazer	fazer	pulverizado	15 (faz.1)	Figueirão
63	73	<i>A.fumigatus</i>	>8	4	4	>16	>16	pulverizado	13 (faz.1)	Coxim
64	74	<i>Nigri</i>	fazer	8	>8	fazer	fazer	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
65	75	<i>A.fumigatus</i>	0,5	0,25	0,5	1	8	pulverizado	13 (faz.1)	Coxim
66	76	<i>A.fumigatus</i>	0,5	0,5	0,25	4	4	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
67	77	<i>A.fumigatus</i>	0,25	0,25	0,25	1	4	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
68	79	<i>A.niger</i>	>8	1	1	16	>16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
69	81	<i>A.fumigatus</i>	1	>8	>8	16	>16	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
70	83	<i>A.fumigatus</i>	0,25	4	8	8	16	pulverizado	8 (faz.2)	Sidrolândia
71	84	<i>A.fumigatus</i>	>8	2	1	>16	>16	pulverizado	15 (faz.1)	Figueirão
72	85	<i>Fumigati</i>	1	1	>8	NR	NR	pulverizado	5 (faz.1)	Rio Verde de Mato Grosso
73	86	<i>A.flavus</i>	0,5	0,25	1	8	16	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia

74	87	<i>A.niger</i>	NR	4	1	-	-	pulverizado	13 (faz.1)	Coxim
75	88	<i>A.fumigatus</i>	0,25	4	1	1	8	orgânico	6 (Agro.1)	campo grande
76	89	<i>Fumigati</i>	NR	>8	4	NR	NR	pulverizado	8 (faz.2)	Sidrolândia
77	90	<i>Fumigati</i>	NR	2	0,5	NR	NR	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
78	91	<i>Terrei</i>	NR	0,5	2	NR	NR	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
79	92	<i>A.alabamensis</i>	0,25	2	1	2	16	pulverizado	4 (faz.2)	Rio Verde de Mato Grosso
80	94	<i>A.brasiliensis</i>	>8	4	2	16	>16	orgânico	2 (Agro.1)	Sidrolândia
81	95	<i>A.flavus</i>	0,12	>8	>8	1	8	pulverizado	9 (faz.3)	Sidrolândia
82	05	<i>A.fumigatus</i>	>8	>8	>8	>16	>16	pulverizado	4 (faz.2)	Rio Verde de Mato Grosso
83	08	<i>Terrei</i>	NR	4	2	NR	NR	pulverizado	3 (faz.1)	Rio Verde de Mato Grosso
84	11	<i>Nigri</i>	NR	4	4	NR	NR	pulverizado	13 (faz.1)	Coxim
85	12	<i>Fumigati</i>	NR	0,12	0,25	NR	NR	orgânico	1 (Agro.1)	Miranda
86	13	<i>Terrei</i>	NR	>8	>8	NR	NR	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
87	14	<i>A.tubingensis</i>	>8	4	4	8	16	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
88	15	<i>Terrei</i>	NR	>8	>8	NR	NR	pulverizado	13(faz.1)	Coxim
89	16	<i>A.fumigatus</i>	0,5	0,5	1	1	4	pulverizado	13(faz.1)	Coxim
90	18	<i>Terrei</i>	NR	0,5	0,5	NR	NR	pulverizado	7 (faz.1)	Sidrolândia
91	21	<i>A.fumigatus</i>	0,5	>8	2	1	4	orgânico	2(agro.1)	Sidrolândia
92	27	<i>Terrei</i>	NR	>8	4	NR	NR	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
93	30	<i>Nigri</i>	NR	4	2	NR	NR	pulverizado	8(faz.2)	Sidrolândia
94	1	<i>Terrei</i>	NR	>8	>8	NR	NR	pulverizado	3(faz. 1)	Rio Verde de

4	3 2										Mato Grosso
9 5	1 3 3	<i>Terrei</i>	NR	>8	>8	NR	NR	pulverizado	4(faz. 2)		Rio Verde de Mato Grosso
9 6	1 3 9	<i>Nigri</i>	NR	>8	>8	NR	NR	pulverizado	9(faz.3)		Sidrolândia
9 7	1 4 1	<i>A.caelatus</i>	1	>8	>8	8	16	pulverizado	3(faz. 1)		Rio Verde de Mato Grosso
9 8	1 4 2	<i>A.fumigatus</i>	0,25	8	8	1	4	pulverizado	3(faz. 1)		Rio Verde de Mato Grosso
9 9	1 4 3	<i>Nigri</i>	NR	0,5	2	NR	NR	orgânico	2(agro.1)		Sidrolândia
1 0 0	1 4 4	<i>A.terreus</i>	2	0,5	2	>16	>16	orgânico	6 (agro.1)		campo grande
1 0 1	1 4 5	<i>A.terreus</i>	8	4	0,5	>16	>16	pulverizado	8(faz.2)		Sidrolândia
1 0 2	1 4 6	<i>A.fumigatus</i>	0,5	>8	4	1	8	pulverizado	7 (faz.1)		Sidrolândia
1 0 3	1 4 8	<i>A.welwitschiae</i>	NR	>8	2	4	16	pulverizado	13(faz.1)		Coxim
1 0 4	1 4 9	<i>A.terreus</i>	>8	>8	4	>16	>16	orgânico	6 (agro.1)		campo grande
1 0 5	1 5 0	<i>A.fumigatus</i>	0,5	>8	2	8	16	orgânico	6 (agro.1)		campo grande
1 0 6	1 5 1	<i>Terrei</i>	NR	8	1	NR	NR	pulverizado	8(faz.2)		Sidrolândia
1 0 7	1 5 2	<i>A.alabamensis</i>	0,25	>8	0,015	16	16	pulverizado	15(faz.1)		Figueirão
1 0 8	1 5 3	<i>A.brasiliensis</i>	>8	>8	NR	>16	>16	orgânico	6 (agro.1)		campo grande
1 0 9	1 5 4	<i>A.terreus</i>	1	>8	0,06	16	16	orgânico	6 (agro.1)		campo grande
1 1 0	1 5 5	<i>A.terreus</i>	0,25	>8	0,03	>16	8	pulverizado	15(faz.1)		Figueirão
1 1 1	1 5 6	<i>A.alabamensis</i>	1	4	0,03	8	4	pulverizado	15(faz.1)		Figueirão
1	1	<i>A.tubing</i>	1	>8	0,12	8	16	pulverizado	13(faz.1)		Coxim

1 2	5 7	<i>ensis</i>)	
1 1 3	1 5 8	<i>A.niger</i>	2	>8	0,12	8	>16	pulverizado	15(faz.1)	Figueirão
1 1 4	1 5 9	<i>A.terreus</i>	1	>8	0,12	>16	>16	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
1 1 5	1 6 0	<i>A.niger</i>	1	>8	0,03	16	>16	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
1 1 6	1 6 1	<i>Flavi</i>	0,25	8	0,06	NR	NR	pulverizado	10(faz.1)	Maracaju
1 1 7	1 6 2	<i>Terrei</i>	1	4	0,25	NR	NR	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
1 1 8	1 6 3	<i>Terrei</i>	NR	NR	NR	NR	NR	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
1 1 9	1 6 4	<i>A.alabamensis</i>	0,5	4	0,06	8	16	pulverizado	10(faz.1)	Maracaju
1 2 0	1 6 6	<i>Terrei</i>	4	8	0,25	NR	NR	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
1 2 1	1 6 7	<i>Fumigati</i>	2	>8	0,12	NR	NR	pulverizado	10(faz.1)	Maracaju
1 2 2	1 6 8	<i>A.terreus</i>	0,5	4	0,06	16	16	pulverizado	13(faz.1)	Coxim
1 2 3	1 6 9	<i>A.fumigatus</i>	2	>8	0,06	4	1	pulverizado	11(faz.1)	Sidrolândia
1 2 4	1 7 0	<i>A.parasiticus</i>	4	>8	0,12	>16	>16	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
1 2 5	1 7 1	<i>Terrei</i>	1	>8	0,03	NR	NR	orgânico	6 (agro.1)	campo grande
1 2 6	1 7 2	<i>Terrei</i>	1	1	0,06	NR	NR	pulverizado	15(faz.1)	Figueirão
1 2 7	1 7 3*	<i>A.fumigatus</i>	2	>8	0,06	1	4	pulverizado	10(faz.1)	Maracaju
1 2 8	1 7 4	<i>A.fumigatus</i>	0,5	>8	0,06	16	16	pulverizado	10(faz.1)	Maracaju
1 2 9	1 7 5	<i>A.fumigatus</i>	2	8	0,06	1	4	pulverizado	10(faz.1)	Maracaju

130	176	<i>A.niger</i>	4	1	0,12	8	>16	pulverizado	11(faz.1)	Sidrolândia
131	177	<i>Terrei</i>	2	4	0,12	NR	NR	pulverizado	15(faz.1)	Figueirão

ITC, itraconazol; VCZ, voriconazol; POS, posaconazol; TEB, tebuconazol; DIF, difenoconazol; NR, não realizado

* *gene cyp51A sem mutação* Resistente selvagem