

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS

DALITY KEFFELEN DE BARROS RODRIGUES

**Diversidade genética e mecanismos de resistência antifúngica em isolados  
clínicos e ambientais de *Aspergillus*  
*fumigatus***

Campo Grande - MS  
2025

# **DALITY KEFFELEN DE BARROS RODRIGUES**

DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA EM  
ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Aspergillus*  
*fumigatus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção de título de Doutor

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Souza Carvalho Melhem

Coorientador: Prof. Dr. Wellington Santos Fava

Campo Grande - MS  
2025



**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias**  
**Doutorado**

Aos onze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e cinco, às catorze horas, na modalidade eletrônica, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Marcia de Souza Carvalho Melhem (UFMS), Anamaria Mello Miranda Paniago (UFMS) e Maria da Gloria Souza Stafocker (USP), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **DALITY KEFFELEN DE BARROS RODRIGUES**, CPF \*\*\*.160.964-\*\*, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**DIVERSIDADE GENÉTICA E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA EM ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE ASPERGILLUS FUMIGATUS**" e orientação de Marcia de Souza Carvalho Melhem. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

**EXAMINADOR**

Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem (Interno)

Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago (Interno)

Dra. Bárbara Casella Amorim (Externo) (Suplente)

Dr. James Venturini (Interno) (Suplente)

Dra. Maria da Gloria Souza Stafocker (Externo)

**RESULTADO FINAL:**

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

**OBSERVAÇÕES:**

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Documento assinado digitalmente

MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM  
Data: 12/12/2025 12:17:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Assinaturas:**

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

Documento assinado digitalmente

DALITY KEFFELEN DE BARROS RODRIGUES  
Data: 05/01/2026 15:53:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## AGRADECIMENTOS

As primeiras linhas desse texto são direcionadas a Deus. Eu O agradeço, não pelos Seus feitos poderosos em minha vida, mas pelo que Ele é: o “Grande Eu Sou”, o alfa e o ômega, por quem todas as coisas foram criadas e terão o seu fim, o que inclui também o fim deste ciclo.

Através de Deus, nasci de pais que me apoiaram nesta jornada inteira. Sem o apoio deles, Lígia e Paulo, esta tese não existiria. Agradeço por todos os momentos em que me levantaram, se alegraram comigo nas minhas vitórias e se entristeceram nos meus momentos de lutas. Aos meus pais, eu dedico essa tese e o meu saber.

À minha orientadora e amiga Marcia, cujo meu encontro, também, não foi ao acaso e sim uma providência. Todas as pessoas que cruzam seu caminho nunca a esquecem, bem como são inspiradas por ela. Sou grata pela generosidade de compartilhar comigo seu conhecimento, sua companhia e sua casa.

Agradeço à minha família de sangue e espiritual, pelas suas orações, muitas das quais eu nunca saberei, mas que surtiram efeito em minha vida.

Agradeço, em nome do James Venturini, ao Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LabDIP) da UFMS, pela recepção e apoio, e ao Prof. Wellington (Weg) pela sua coorientação e seu suporte. Foi neste laboratório que iniciei meus trabalhos com *Aspergillus* e não sabia eu que este fungo teria um grande impacto na minha vida. Agradeço aos funcionários, incluindo os que não mais trabalham lá, a todos os alunos e também professores. Aos alunos do laboratório de Micologia do LabDIP por toda partilha e por apoiarem este projeto. Ao projeto Radif e a profa. Dra. Anamaria Paniago. Ao LACEN-MS, em nome da minha amiga Lisandra, pelos treinamentos e também por sua amizade. À Juliana Takahashi, por ceder seu conhecimento em MALDI-TOF MS, que nos auxiliou no início desse projeto. Ao LatAsp, por isolar e recuperar alguns fungos ambientais que foram incluídos neste projeto e aos voluntários convidados que se dispuseram a participar e nos ajudar com suas coletas. Ao programa de Pós-graduação, professores e especialmente aos amigos que fiz. Alguns destes amigos me levaram a suas casas, me alimentaram e me medicaram quando estive doente. Graças a eles, a jornada foi mais leve.

Em nome do Prof. Watanabe, agradeço à equipe de professores e alunos dos Laboratórios de Micologia da Universidade de Chiba.

Por fim, e não menos importante, agradeço a todos que estiveram comigo nesta jornada.

## RESUMO

A aspergilose é um grupo de doenças oportunísticas decorrente da inalação de conídios de fungos do gênero *Aspergillus*. O manejo terapêutico constitui um desafio, tanto em virtude das limitações diagnósticas quanto pelo surgimento de isolados resistentes aos antifúngicos triazólicos, frequentemente, associado ao uso prolongado destes em pacientes hospitalizados. Ademais, há relatos de isolados resistentes que infectaram pacientes sem histórico prévio de tratamento, sugerindo a aquisição da resistência no ambiente, decorrente da exposição excessiva do fungo a pesticidas triazólicos empregados na agricultura. Agravando esse cenário, existem poucos estudos acerca da epidemiologia da resistência na América do Sul, sendo o Brasil um país de expressiva atividade agrícola, com destaque para o estado de Mato Grosso do Sul (MS). Este estudo teve por objetivos analisar a frequência de isolados resistentes, clínicos e ambientais, de *Aspergillus* spp. no MS, investigar mutações no gene *cyp51A*, compreender a influência de algumas das mutações no fenótipo de resistência e determinar a similaridade genética dos isolados de *A. fumigatus* resistentes. Entre 2022 e 2024, foram recuperados, 86 isolados clínicos e 67 isolados do ar atmosférico de *Aspergillus* spp. A identificação molecular das espécies foi realizada através do sequenciamento dos genes  $\beta$ -tubulina e calmodulina. A delimitação das espécies foi baseada na monofilia dos clados obtidos nas análises filogenéticas. Os testes de sensibilidade antifúngica foram conduzidos por microdiluição em caldo, seguindo o método EUCAST E. DEF 9.3.2, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O sequenciamento do gene *cyp51A* foi realizado em isolados de *A. fumigatus* resistentes. A genotipagem de microssatélites foi empregada para avaliar a relação genética entre os isolados resistentes. Experimentos de CRISPR-Cas9 foram realizados para investigar a contribuição das mutações no fenótipo de resistência. Dos 84 isolados de *A. fumigatus*, 7 apresentaram valores de CIM acima dos pontos de corte, indicando resistência. Destes, um isolado clínico (CMMS 154), com mutação G138S, foi resistente a voriconazol (4 mg/L) e itraconazol ( $> 16$  mg/L) e um isolado ambiental (CMMS 321), mutante G54A, foi resistente a posaconazol (8 mg/L) e itraconazol ( $> 16$  mg/L). Outros cinco isolados ambientais (CMMS 340 a 344), resistentes apenas ao agroquímico tebuconazol, apresentaram a mutação não silenciosa M172V, além de quatro mutações silenciosas e a análise de microssatélites indicou que eles pertencem ao mesmo grupo genético. Os isolados CMMS 154 e CMMS 321 agruparam-se, distintamente, próximos a isolados selvagens. A validação das mutações M172V e das mutações silenciosas demonstrou que contribuem, parcialmente, para a redução da sensibilidade ao tebuconazol, mas não são o único mecanismo de resistência envolvido. Os resultados sugerem a possível circulação e expansão de isolados ambientais sob pressão seletiva de azóis agrícolas em uma importante região agroindustrial do Centro-Oeste brasileiro. Além disso, foi evidenciado a disseminação silenciosa de diferentes genótipos ambientais resistentes, em áreas urbanas e rurais, reforçando a necessidade de monitoramento genômico dos agentes da aspergilose na América do Sul.

**Palavras-chave:** Defensivos Agrícolas. Inibidores de 14-alfa Desmetilase. Sistemas CRISPR-Cas. Repetições de Microssatélites.

## ABSTRACT

Aspergillosis is a group of opportunistic diseases resulting from the inhalation of conidia from fungi of the genus *Aspergillus*. Therapeutic management is challenging due to both diagnostic limitations and the emergence of isolates resistant to triazole antifungals, which is frequently associated with prolonged use in hospitalized patients. Furthermore, there are reports of resistant isolates infecting patients with no prior history of treatment, suggesting that resistance is acquired in the environment as a result of excessive fungal exposure to triazole pesticides used in agriculture. Compounding this scenario, there are few studies on the epidemiology of resistance in South America, particularly in Brazil, a country with significant agricultural activity and specifically in the state of Mato Grosso do Sul (MS). This study aimed to analyze the frequency of resistant clinical and environmental isolates of *Aspergillus* spp. in Mato Grosso do Sul, investigate mutations, understand the influence of specific mutations on resistance phenotypes, and determine the genetic similarity of resistant *A. fumigatus* isolates. Between 2022 and 2024, 86 clinical isolates and 67 atmospheric air isolates of *Aspergillus* spp. were recovered. Molecular species identification was performed by sequencing the  $\beta$ -tubulin and calmodulin genes. Species delimitation was based on the monophyly of clades obtained through phylogenetic analyses. Antifungal susceptibility testing was conducted via broth microdilution, following the EUCAST E. DEF 9.3.2 method, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Sequencing of the *cyp51A* gene was performed on resistant *A. fumigatus* isolates, and microsatellite genotyping was used to assess the genetic relationship between them. CRISPR-Cas9 experiments were conducted to investigate the contribution of mutations to the resistance phenotype. Of the 84 *A. fumigatus* isolates, seven showed MIC values above the cutoff points, indicating resistance. Among these, one clinical isolate (CMMS 154) harboring the G138S mutation was resistant to voriconazole (4 mg/L) and itraconazole (>16 mg/L), and one environmental isolate (CMMS 321) with the G54A mutation was resistant to posaconazole (8 mg/L) and itraconazole (> 16 mg/L). Five other environmental isolates (CMMS 340 to 344), resistant only to the agrochemical tebuconazole, presented the non-silent M172V mutation in addition to four silent mutations and microsatellite analysis indicated they belong to the same genetic group. Isolates CMMS 154 and CMMS 321 clustered distinctly but near wild-type isolates. Validation of the M172V and silent mutations demonstrated that they contribute, in part, to reduced susceptibility to tebuconazole, but are not the sole resistance mechanism involved. The results suggest the possible circulation and expansion of environmental isolates under selective pressure from agricultural azoles in an important agro-industrial region of the Brazilian Midwest. Furthermore, the silent dissemination of different resistant environmental genotypes in urban and rural areas was evidenced, reinforcing the need for genomic monitoring of aspergillosis agents in South America.

**Keywords:** 14-alpha Demethylase Inhibitors. Agrochemicals. CRISPR-Cas system. Microsatellite Repeats.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da reação de amplificação do gene da $\beta$ -tubulina.....	39
Tabela 2 – Parâmetros da reação de amplificação do gene da calmodulina .....	40
Tabela 3 – Parâmetros da reação de sequenciamento dos genes da $\beta$ -tubulina e calmodulina .....	40
Tabela 4 – Pontos de corte determinados pelo EUCAST para espécies de <i>Aspergillus</i> .....	43
Tabela 5 – Parâmetros da reação de amplificação do <i>cyp51A</i> .....	44
Tabela 6 – Parâmetros da reação de sequenciamento do <i>cyp51A</i> .....	44
Tabela 7 – Parâmetros da reação de amplificação das regiões de microssatélite ...	46
Tabela 8 – Parâmetros do sequenciamento das regiões de microssatélite.....	46
Tabela 9 – Parâmetros da amplificação do <i>cyp51A</i> mutado do isolado 340 .....	48
Tabela 10 – Parâmetros para a <i>Overlap Extension and sewing PCR</i> do <i>cyp51A</i> ....	49
Tabela 11 – Condições da PCR direta da colônia para confirmação da presença do plasmídeo.....	50
Tabela 12 – Parâmetros para a PCR inversa do <i>cyp51A</i> -M172V .....	50
Tabela 13 – Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 4 fármacos e 1 agrotóxico triazólico, frente a 153 isolados clínicos e ambientais de <i>Aspergillus</i> spp. (MS, 2022–2024) .....	59
Tabela 14 – Síntese dos valores de concentração inibitória mínima frente a 4 triazóis clínicos e 1 fungicida agrícola, de 153 isolados, clínicos e ambientais, de <i>Aspergillus</i> spp. (MS, 2022–2024) .....	63
Tabela 15 – Mutações, valores de CIM e origem dos sete isolados clínicos e ambientais resistentes.....	65
Tabela 16 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM, mg/L), de dois fármacos e um agrotóxico triazólico, frente a 5 isolados transformantes e 2 parentais, com respectivos genótipos .....	67
Tabela 17 – Diâmetros dos halos de disco-difusão (mm) para os isolados parentais e transformantes de <i>A. fumigatus</i> sob exposição a tebuconazol.....	68

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Código genético com os códons de RNA mensageiro e os respectivos aminoácidos.....	45
--	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema simplificado da via de biossíntese do ergosterol em <i>Aspergillus</i> spp.....	20
Figura 2 – Representação esquemática da localização das mutações no gene <i>cyp51A</i> identificadas nos isolados de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	28
Figura 3 – Esquema do processo de transformação mediado por recombinação homóloga.....	32
Figura 4 – Distribuição geográfica das cidades de origem dos 153 isolados de <i>Aspergillus</i> spp. no estado de Mato Grosso do Sul.....	54
Figura 5 – Distribuição das espécies entre 86 isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. provenientes do estado de Mato Grosso do Sul (2022) .....	55
Figura 6 – Distribuição das espécies de 67 isolados ambientais de <i>Aspergillus</i> spp. provenientes do estado de Mato Grosso do Sul (2022-2024) .....	56
Figura 7 – Análise filogenética de 5 isolados clínicos e ambientais da seção Terrei, com base no gene da $\beta$ -tubulina, identificados pelo acrônimo CMMS .....	57
Figura 8 – Relação genética de 7 isolados de <i>A. fumigatus</i> resistentes a triazóis, com base na análise de 9 marcadores de microssatélite.....	66
Figura 9 – Panorama das mutações em <i>cyp51A</i> descritas em <i>A. fumigatus</i> na América do Sul .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FLU	5-flucitosina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AmB	Anfotericina B
APC	Aspergilose pulmonar crônica
APCC	Aspergilose Pulmonar Cavitária Crônica
API	Aspergilose pulmonar invasiva
APFC	Aspergilose Pulmonar Fibrosante Crônica
APSI	Aspergilose Pulmonar Invasiva Subaguda
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAS	Caspofungina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMMS	Coleção de Culturas do Mato Grosso do Sul
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
DMI	Inibidores de Desmetilação
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECOFF	<i>Epidemiologic Cutoff</i>
ECV	<i>Epidemiological Cutoff Values</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUCAST	<i>European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing</i>
FCZ	Fluconazol
HCCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
HDR	<i>Homology-Directed Repair</i>
Humap	Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian
i.a	Toneladas de Ingredientes Ativos
IC	<i>Inhibitory Concentration</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz de São Paulo
ISA	Isavuconazol
ITC	Itraconazol

ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LabDIP	Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
LACEN/MS	Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso do Sul
LatAsp	Pesquisa Latino-Americana sobre a resistência de <i>Aspergillus fumigatus</i>
LB	Luria-Bertani
LBA	Lavado Broncoalveolar
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MCF	Micafungina
MCZ	Miconazol
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MMRC	<i>Medical Mycology Research Center</i> da Universidade de Chiba
MS	Mato Grosso do Sul
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
DO	Densidade Óptica
pb	Pares de Bases
PD	Potato Dextrose
PEG	Polietilenoglicol
POS	Posaconazol
PPG-DIP	Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias
mRNA	RNA Mensageiro
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SENTRY	<i>Antifungal Surveillance Program</i>
sgRNA	RNA Guia
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TR	<i>Tandem Repeat</i>
tracrRNA	Trans-activating CRISPR RNA
TSA	Testes de Sensibilidade Antifúngica
UE	União Européia

UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
VOR	Voriconazol
YG	<i>Yeast extract</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Aspergilose.....</b>	<b>16</b>
1.1.1 Critérios para o diagnóstico de aspergilose.....	17
1.1.2 Triazóis e tratamento da aspergilose.....	19
<b>1.2 <i>Aspergillus</i>: introdução ao gênero e morfologia.....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Identificação de espécies e genotipagem.....	23
1.2.1.1 Identificação molecular.....	23
1.2.1.2 Identificação Proteômica .....	24
1.2.2 Genotipagem.....	24
<b>1.3 Resistência antifúngica em <i>Aspergillus fumigatus</i>.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Principais mecanismos de resistência em <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	26
<b>1.3 Justificativa.....</b>	<b>32</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Aspectos éticos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Disponibilidade de dados .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Locais de realização do estudo.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Origem dos isolados clínicos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5 Origem dos isolados ambientais do ar.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6 Coleta e processamento das amostras do ar .....</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Isolamento fúngico e classificação em seção .....</b>	<b>38</b>
<b>3.8 Identificação molecular das espécies .....</b>	<b>38</b>
3.8.1 Extração do DNA genômico .....	38
3.8.2 Amplificação dos genes de β-tubulina e calmodulina.....	39
3.8.3 Sequenciamento dos genes de β-tubulina e calmodulina .....	40
3.8.4 Análise filogenética.....	41
<b>3.9 Teste de sensibilidade antifúngica .....</b>	<b>42</b>
<b>4. Sequenciamento do <i>cyp51A</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5. Genotipagem de microssatélites .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CRISPR-Cas9 .....</b>	<b>47</b>
<b>6.1 Amplificação e construção plasmídeo <i>cyp51A-340</i> .....</b>	<b>48</b>

<b>6.2 Amplificação e construção de plasmídeo AfS35 - M172V .....</b>	<b>50</b>
<b>6.3 Síntese do sgRNA e preparação do <i>repair template</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>6.4 Formação do protoplasto .....</b>	<b>51</b>
<b>6.5 Transformação por recombinação homóloga.....</b>	<b>51</b>
<b>6.6 TSA dos isolados transformantes .....</b>	<b>52</b>
<b>7. Análises estatísticas .....</b>	<b>52</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>8.1 Pontos de coletas dos isolados.....</b>	<b>53</b>
<b>8.2 Tipos de amostras biológicas dos isolados clínicos .....</b>	<b>54</b>
<b>8.3 Distribuição das espécies .....</b>	<b>54</b>
<b>8.4 Resistência a antifúngicos .....</b>	<b>57</b>
<b>8.4.1 Resistência a tebuconazol.....</b>	<b>63</b>
<b>8.5 Mutações em <i>cyp51A</i> em isolados resistentes a triazóis .....</b>	<b>64</b>
<b>8.6 Relação genética entre isolados resistentes a triazóis.....</b>	<b>65</b>
<b>8.7 Mutações em <i>cyp51A</i> em isolados resistentes a tebuconazol.....</b>	<b>67</b>
<b>9. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>10. CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>11. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Aspergilose é um grupo de doenças causadas pela infecção através da inalação de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, que contém mais de 400 espécies, sendo *A. fumigatus* a mais comum (Visagie *et al.*, 2024). É um fungo ubíquo e amplamente distribuído no meio ambiente, em especial no solo. Os esporos, chamados de conídios são, em regra, disseminados por correntes aéreas, caracterizando o gênero como anemófilo. A inalação de conídios por seres humanos e outros animais ocorre diariamente, com risco de desenvolvimento da aspergilose, de acordo com os fatores predisponentes do hospedeiro. As taxas de mortalidade para esta doença podem ultrapassar 50% especialmente em pacientes imunocomprometidos, transplantados de medula óssea, com câncer ou doenças hematológicas (Bassetti *et al.*, 2021).

Os antifúngicos triazólicos são os principais fármacos administrados no tratamento da doença, pela eficácia e baixa toxicidade. No entanto, mecanismos de resistência induzem ao fracasso do tratamento e às altas taxas de mortalidade ( $\leq 90\%$ ). Grande parte da resistência aos azóis está relacionada à presença de mutações específicas do gene *cyp51A*, enquanto uma parcela significativa da resistência está também associada a superexpressão de bombas de efluxo. Todavia, ainda existem isolados resistentes que fogem à regra e possuem mecanismos ainda não conhecidos ou mutações não descritas (Lockhart; Beer; Toda, 2020).

Apesar dos relatos crescentes sobre o aumento das taxas de resistência na Europa, na América Latina há poucos estudos disponíveis e várias limitações significativas. Muitos desses estudos não sequenciaram o *cyp51A*, não incluíram isolados ambientais e/ou são apenas relatos de casos (Gonzalez-Lara *et al.*, 2019; Leonardelli *et al.*, 2017). Até este momento, o Brasil tem poucos estudos, que apesar de muito relevantes, concentram-se em sua maioria no estado de São Paulo (Negri *et al.*, 2017; Pontes *et al.*, 2020, 2022; Pontes; Arai; *et al.*, 2024). Além disto, a grande maioria destes apenas realizam experimentos com *A. fumigatus* e não pesquisam o perfil de sensibilidade de outras espécies de *Aspergillus*. Assim, é crucial realizar mais pesquisas sobre a epidemiologia da resistência em outras regiões do país, que incluam isolados ambientais, explorem os mecanismos de resistência e a diversidade de espécies resistentes, além de *A. fumigatus*.

## 1.1 Aspergilose

As manifestações clínicas da aspergilose são variadas, podendo incluir formas invasivas, aspergilose pulmonar crônica, broncopulmonar alérgica, além de bronquite, sinusite e asma associadas à sensibilização ao fungo. A grande maioria dos casos de infecção são por *A. fumigatus*, seguido de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. nidulans*, mas a literatura relata diversos casos com espécies crípticas (Hase *et al.*, 2022; Horiuchi *et al.*, 2024; Tamiya *et al.*, 2015). A capacidade de crescer em temperaturas  $\geq 40$  °C e o seu pequeno conídio, de 2–3 µm, com alta capacidade de dispersão, germinação e penetração nas vias respiratórias inferiores, são fatores de virulência importantes para *A. fumigatus* que o tornam a espécie infecciosa predominante (Veerdonk *et al.*, 2017; Walsh; Hayden; Larone, 2018).

Em indivíduos imunocompetentes e sem condições predisponentes os mecanismos de defesa, que incluem macrófagos alveolares, células NK e neutrófilos, geralmente eliminam os conídios. Porém, pacientes com imunidade comprometida, especialmente aqueles sob uso prolongado de corticosteroides ou com neutropenia, apresentam maior suscetibilidade à aspergilose. Em transplantados de medula óssea, o risco é particularmente elevado devido à alta imunossupressão associada ao procedimento. Pacientes com Doenças Pulmonares Obstrutivas (DPOC) e fibrose cística são grupos de risco para o desenvolvimento da doença. Nestes indivíduos, os conídios podem germinar nos pulmões como hifas invasivas, levando à aspergilose pulmonar invasiva (API), uma forma grave que causa destruição do tecido pulmonar, disseminação sistêmica e desenvolvimento de lesões aspergilares no parênquima pulmonar (Focaccia, 2021).

Anualmente, mais de 2 milhões de pessoas desenvolvem aspergilose invasiva, com uma incidência estimada de mais de 200.000 milhões de casos por ano (27,2 por 100.000 habitantes) em grupos de risco para a doença. Mais de 1 milhão de pessoas, aproximadamente, morrem por API, com mortalidade bruta de 85% e atribuível de 68%–72%, na maior parte dos casos em pacientes com DPOC, e um dos principais fatores é o diagnóstico tardio (Denning, 2024). No Brasil estima-se que haja cerca de 8 mil casos de API por ano (Giacomazzi *et al.*, 2016).

Pacientes com imunodepressão leve ou sem a mesma, mas com histórico de doença pulmonar anterior que resultou em lesões cavitárias, como tuberculose, COVID-19 e DPOC, podem desenvolver aspergilose pulmonar crônica (APC), que é

uma forma persistente de infecção fúngica e de evolução lenta ( $\geq 3$  meses) (Focaccia, 2021). A APC está subdividida em mais formas clínicas: (i) Nódulos de *Aspergillus*, (ii) Aspergiloma pulmonar simples, também conhecido como bola fúngica, que se aloca nas cavidades pulmonares de casos sintomáticos, e caso a terapia não funcione pode-se optar por cirurgia, (iii) Aspergilose Pulmonar Cavitária Crônica (APCC) forma mais comum da APC, (IV) Aspergilose Pulmonar Fibrosante Crônica (APFC) forma mais grave da doença, onde a APCC pode progredir na ausência de terapia e com destruição importante do pulmão, e (V) Aspergilose Pulmonar Invasiva Subaguda (APSI) (Page *et al.*, 2019; Patterson *et al.*, 2016). No mundo, há incidência de 1,2 milhões de casos anualmente, principalmente associada a tuberculose (Page *et al.*, 2019). Além disso, 19% dos pacientes com APC podem falecer no primeiro ano da doença (Denning, 2024; Patterson *et al.*, 2016).

Na micologia veterinária as aves constituem um dos animais com maior risco para aspergilose devido a ausência de epiglote e células ciliadas que facilitam a entrada dos conídios no trato respiratório. Limitações intrínsecas na resposta imune inata fazem que a mortalidade pela aspergilose em determinados grupos de aves possa ultrapassar 50%. Além das perdas econômicas da aspergilose em aves, que podem facilmente ultrapassar milhões de dólares, existe ainda risco da contaminação de trabalhadores de granjas, especialmente quando o descarte dos animais mortos ocorre através da incineração que estimula a formação de propágulos (Härtle; Vervelde; Kaspers, 2022; Hauck; Cray; França, 2020; Ulloa-Avellán *et al.*, 2023).

### 1.1.1 Critérios para o diagnóstico de aspergilose

A definição da aspergilose é complexa e depende de observação clínica, exames de imagem e achados microbiológicos. Na forma invasiva, há três classificações que seguem critérios clínicos e laboratoriais, sendo eles: a doença provada, provável e possível (Donnelly *et al.*, 2020). Para a doença provada são exigidos ao menos um dos critérios a seguir:

- a.** Um exame histopatológico, citopatológico ou exame microscópico direto de amostras estéreis obtidas por agulhas; ou biópsia com evidência de danos teciduais; ou
- b.** Recuperação de hifas por cultura de uma amostra do trato respiratório estéril + achado radiológico sugestivo; ou

c. Reação em Cadeia da Polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) + sequenciamento de tecido no qual foi observado presença de hifas.

O diagnóstico da doença provada exige a comprovação da presença de um fator do hospedeiro (ex. neutropenia ou imunodeficiência grave), um critério clínico (ex. sinal do ar crescente na tomografia) e um critério micológico (ex. pesquisa de *Aspergillus* spp. em cultura, microscopia ou pesquisa de抗ígenos do fungo como a galactomanana).

Por fim, o diagnóstico da doença possível acontece quando se encontram critérios clínicos e fatores do hospedeiro, mas sem evidência micológica laboratorial (Donnelly *et al.*, 2020).

Os exames histopatológico, citopatológico ou exame microscópico direto definem aspergilose, mas não a espécie causadora.

Os critérios para o diagnóstico da APC são menos categorizados que a API e podem ser definidos pela junção de três critérios: (i) presença de uma ou mais cavidades, com ou sem aspergiloma, ou nódulos em imagem torácica por um período de pelo menos 3 meses, (ii) evidência microbiológica de infecção por *Aspergillus* ou uma resposta imunológica a *Aspergillus* e (iii) exclusão de diagnósticos alternativos (Denning *et al.*, 2015).

Identificação e isolamento em cultura do fungo em amostras respiratórias não estéreis não é suficiente para diagnóstico de infecção e não discrimina entre colonização e infecção. A colonização por *Aspergillus* refere-se à presença do fungo no trato respiratório sem, no entanto, configurar infecção ou doença fúngica ativa (Uffredi *et al.*, 2003).

A galactomanana e  $\beta$ -D-glucana são polissacarídeos da parede celular e biomarcadores sorológicos utilizados no diagnóstico de aspergilose. A galactomanana é útil para o diagnóstico de API, sendo frequentemente detectável no soro e no lavado broncoalveolar (LBA). Entretanto, na APC, em outras formas não invasivas e em pacientes com histórico de uso recente de antifúngicos, a galactomanana não é frequentemente detectável no soro. Por outro lado,  $\beta$ -D-glucana é considerada menos específica, pois é encontrada na parede de outros fungos e não é mais sensível do que a galactomanana, o que limita sua utilidade no diagnóstico (Denning, 2024).

### 1.1.2 Triazóis e tratamento da aspergilose

Os azóis são um grupo de fármacos com amplo espectro de atividade antifúngica. Se dividem em imidazóis e triazóis, conforme o número de átomos de nitrogênio presentes no anel azólico. Os triazóis são compostos por um anel de 5 membros com 2 átomos de carbono e 3 átomos de nitrogênio, representados principalmente pelo voriconazol (VOR), itraconazol (ITC), posaconazol (POS), isavuconazol (ISA), sendo estes os disponíveis até o momento para o tratamento da aspergilose. O fluconazol (FCZ) não é recomendado e não tem eficácia contra *Aspergillus*. Diferentemente de *Candida* e outras leveduras, em fungos filamentosos os triazóis tem ação fungicida ou invés de fungistática (Carmona; Limper, 2017).

Voriconazol é recomendado como fármaco primário no tratamento da API e outras síndromes invasivas da aspergilose, pode ser administrado por via intravenosa, tem boa absorção oral e penetração em tecido, sendo indicado também para o tratamento da aspergilose do sistema nervoso central. Tem eficácia superior à anfotericina (AmB) convencional e ação rápida, atingindo níveis séricos desejáveis (Patterson *et al.*, 2016).

Itraconazol pode ser indicado como fármaco alternativo no tratamento da API em casos de resistência ou onde AmB não pode ser administrada; porém, é o fármaco primário para tratamento da APC e da forma broncopulmonar alérgica. É disponibilizado na forma oral, tem absorção instável, interage com alimentos e outros fármacos e tem ação mais lenta (Patterson *et al.*, 2016).

Posaconazol tem forte recomendação para ser administrado na profilaxia da API e na terapia de resgate. É indicada em pacientes com neutropenia prolongada e aqueles submetidos à transfusão de medula óssea. Por fim, o ISA é o fármaco triazólico mais recente a ser disponibilizado, indicado como opção alternativa no tratamento da aspergilose, em casos de resistência ou falha clínica (Patterson *et al.*, 2016).

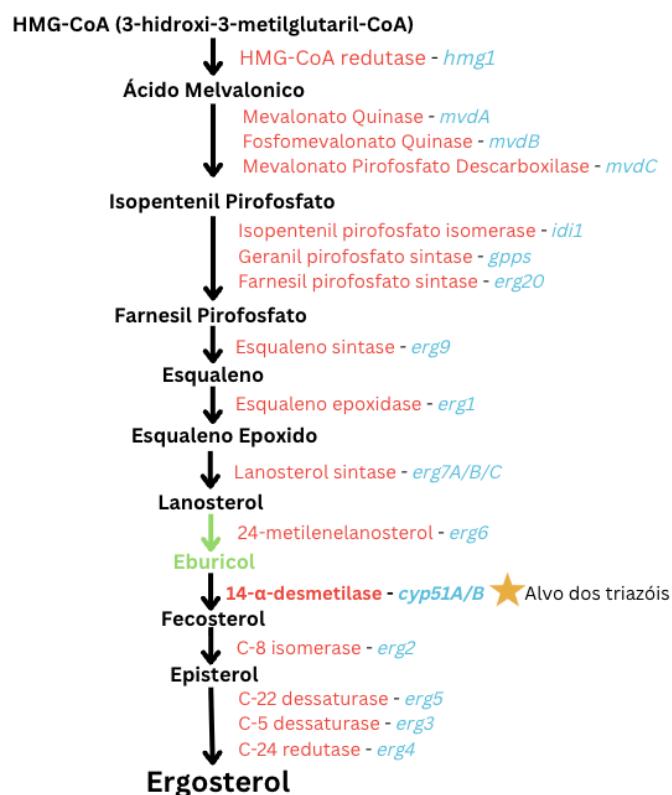
A escolha do fármaco ocorrerá, certamente, analisando-se a forma clínica da doença, o paciente e suas características, além das opções disponíveis em cada centro de saúde. A AmB, fármaco da classe dos polienos, também é administrado no tratamento da aspergilose como segunda linha de tratamento e em casos de resistência antifúngica. A caspofungina, da classe das equinocandinas, pode também

ser usada como 2º ou 3º linhas de tratamento na API, porém, tem ação fungistática (Patterson *et al.*, 2016).

Os triazóis agem interrompendo a síntese do ergosterol, um lipídio essencial para a fluidez e estabilidade da membrana plasmática das células fúngicas. Os antifúngicos ligam-se à enzima 14- $\alpha$ -desmetilase, inibindo sua desmetilação, consequentemente, impedindo a conversão dos esteróis precursores, como lanosterol e, no caso de *Aspergillus* spp., o eburicol, comprometendo a produção final de ergosterol. A célula fúngica, então, acumula esteróis precursores e os transforma em um diol tóxico, que se incorpora à membrana celular de forma desorganizada, alterando a permeabilidade da célula. Isso leva ao comprometimento do crescimento e, consequentemente, à morte celular (Elsaman *et al.*, 2024). Um resumo da biossíntese do ergosterol pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema simplificado da via de biossíntese do ergosterol em *Aspergillus* spp.

## Síntese do Ergosterol



Vermelho: enzimas; Azul: gene que codifica as enzimas em *Aspergillus*; Verde: etapa específica de *Aspergillus* e ausente em leveduras. A estrela destaca a 14- $\alpha$ -demetilase, alvo dos antifúngicos triazólicos.

Fonte: autor

A relevância dos triazóis também alcança o meio agrícola, onde são utilizados como defensivos contra fungos fitopatógenos, sendo assim chamados de fungicidas inibidores de desmetilação (DMI). Dentre os efeitos a longo prazo dos DMIs está a resistência cruzada que vem acontecendo não só com os fármacos usados na clínica mas também com outros fungicidas DMIs, levando à pressão seletiva tanto em fitopatógenos quanto em fungos de relevância à saúde pública como *Aspergillus* spp. (Jørgensen; Heick, 2021).

No Brasil, os fungicidas são a 2º classe de defensivos mais comercializada, ficando atrás apenas dos herbicidas. Além do combate às pragas, os DMIs melhoram a produtividade das culturas e a aparência das hortaliças e plantas ornamentais. Isso se deve a sua característica sistêmica fungistática/fungicida de amplo espectro e plasticidade no uso, que vai desde tratamento de sementes até pós colheita, o que os diferencia de outros fungicidas protetores como o Mancozeb (composto de manganês e zinco), que tem seu uso mais restrito, devendo ser aplicados antes da infecção para reduzir a chances dos fitopatógenos causarem doenças. Mesmo assim, apesar de já banido em outros países, o Mancozeb ainda é o fungicida mais comercializado no Brasil, e configura em 4º lugar entre os defensivos mais vendidos (IBAMA, 2023; Jørgensen; Heick, 2021).

De acordo com o levantamento do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) de 2023 o tebuconazol foi o DMI mais comercializado pelo estado do MS, correspondendo a 329,92 toneladas de ingredientes ativos (i.a), seguido do protoconazol com 313,05 i.a, difenoconazol com 295,57 i.a e ciproconazol com 152,57 i.a. O Mancozeb teve uma comercialização de 2.598,85 i.a, mas o seu uso tem sido muito associado aos DMIs para melhor eficácia, o que pode explicar o aumento de mais de 100% na venda de DMIs em 5 anos (IBAMA, 2023).

Na Europa houve mudança de cenário, os DMIs são bem mais comercializados em comparação ao Brasil pois alguns fungicidas como o Mancozeb estão banidos por gerar altos níveis de resíduos que ultrapassam os valores aceitáveis pela legislação da União Européia (UE) (Commision, 2024). De acordo com o site oficial da UE, o tebuconazol tem aprovação para uso até 2026, mas está em vias de desuso, pois é extremamente tóxico e seu uso pode levar a problemas como má formação fetal além de afetar o ecossistema. Além disso, outros DMIs como o epoxiconazol, difenoconazol e metconazol estão em discussão para serem substituídos (Bryson, 2019).

## 1.2 *Aspergillus*: introdução ao gênero e morfologia

*Aspergillus* pertence à ordem *Eurotiales* juntamente com mais 25 gêneros, e acomoda a família *Aspergillaceae*, reconhecidos por sua relevância em diversas áreas, incluindo: indústria alimentícia, na fermentação de queijos e produção de shoyu e missô; na biotecnologia com a produção de ácidos e enzima; além de serem produtores de micotoxinas (p.ex., *A. flavus*) contaminantes de ambientes e alimentos (Visagie *et al.*, 2024).

O gênero comprehende fungos cosmopolitas e algumas espécies são importantes patógenos oportunistas. A grande parte da sua reprodução se dá por meio assexuado através dos conídios que propagam-se pelo ar e podem se movimentar por quilômetros, apesar de algumas espécies possuírem reprodução sexuada conhecida (Heald; Spracklen, 2009).

A taxonomia de *Aspergillus* está organizada, atualmente, em 5 subgêneros, 80 séries, 28 seções e 453 espécies. Abordagens polifásicas que utilizam morfologia, fisiologia, bioquímica e sequenciamento de vários genes são usadas, constantemente, para análise da filogenia, o que permite a reclassificação e identificação de novas espécies (Houbraken *et al.*, 2020; Visagie *et al.*, 2024).

A morfologia tem como principais características: hifas hialinas septadas, conidióforos não ramificados que terminam em forma de vesícula que comportam células conidiogênicas chamadas fiálides e, junto a elas, pode haver uma sequência de células que servem para seu suporte, chamadas métulas. Espécies que possuem métulas são chamadas de bisseriadas, enquanto as que possuem apenas fiálides, se denominam unisseriadas. A presença ou não de métulas, bem como, o tamanho dos conídios e a disposição das fiálides na vesícula, são características importantes para classificação das espécies em suas respectivas seções (Walsh; Hayden; Larone, 2018).

Espécies de *Aspergillus* tem crescimento rápido, em cerca de 2 ou 3 dias, em meios de cultura, com exceções como espécies da seção Terrei ou *A. lentulus* (seção Fumigati), que têm esporulação lenta em cerca de uma semana ou mais. Todas as espécies crescem bem em temperatura ambiente e *A. fumigatus* é uma das espécies conhecidas por suportar temperatura  $\geq 40$  °C. As diversas espécies apresentam colônias com textura algodonosa, pulverulenta ou aveludada, de início brancas que se tornam coloridas com a esporulação, em tons de verde, amarelo, cinza e marrom.

*Aspergillus fumigatus*, a espécie mais importante como agente de aspergilose, apresenta colônia pulverulenta, de coloração verde-escura azulada, e conídios pequenos, com cerca de 2–3 µm; microscopicamente, apresenta cabeças conidiais unisseriadas, geralmente restritas aos dois terços superiores da vesícula, dispostas paralelamente ao eixo do conidióforo (Samson *et al.*, 2014; Walsh; Hayden; Larone, 2018).

### 1.2.1 Identificação de espécies e genotipagem

#### 1.2.1.1 Identificação molecular

Diante do grande número de espécies, a morfologia continua sendo importante para a classificação de gênero e, em alguns casos, até para classificação da seção. Para alcançar a identificação definitiva das espécies, o sequenciamento associado à filogenia é o método mais acurado.

O *internal transcribed spacer* (ITS), localizado entre as regiões 18S e 26S, é o marcador molecular mais utilizado para discriminar espécies fúngicas, mas não tem bom desempenho para *Aspergillus*; porém, pode ser útil quando usado em conjunto com outros marcadores (Balajee *et al.*, 2009).

A β-tubulina é uma das subunidades estruturais principais dos microtúbulos, componentes importantes do citoesqueleto de células eucarióticas e o sequenciamento do seu gene (*BenA*) é, possivelmente, o marcador mais utilizado para o gênero *Aspergillus*, especialmente útil para a seção Fumigati (Balajee *et al.*, 2009). Para membros da seção Nigri, o sequenciamento da β-tubulina costuma não ser suficientemente discriminatório e outros marcadores são indicados, como: calmodulina (gene *CaM*) uma proteína celular que regula vários processos vitais ligando-se ao cálcio e ativando proteínas-alvo dentro das células, e as subunidades I e II da RNA polimerase B (*RPB1* e *RPB2*) enzimas essenciais na transcrição de RNA em células eucarióticas (Ezeonuegbu *et al.*, 2022).

Para espécies em que apenas um marcador não é discriminatório, outros genes como o *Tsr1* que codifica uma proteína da biogênese de ribossomos, gene *Cct8* que codifica a subunidade theta do complexo chaperonina TCP-1 e os genes das subunidades maior (LSU) e menor dos ribossomos (SSU) são marcadores bem

conservados que podem ser usados em abordagens *multi loci*, juntamente, com os genes citados anteriormente (Houbraken *et al.*, 2020).

#### 1.2.1.2 Identificação Proteômica

O método proteômico *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) utiliza um equipamento para identificação de espécies de fungos e bactérias, com bom desempenho para a rotina clínica. Baseia-se na espectrometria de massa utilizando o laser para ionizar moléculas em uma matriz líquida, permitindo a análise rápida e precisa de proteínas e peptídeos com base em sua carga elétrica e peso molecular. Após a extração proteica de um microrganismo e a sua ionização, os íons viajam pelo tubo em vácuo do aparelho e a leitura da velocidade dessas moléculas, conforme carga e peso molecular, formam a imagem de um espectro. Assim, o aparelho e sua plataforma de softwares são capazes de identificar espécies comparando espectros gerados com aqueles armazenados em um banco de dados. O resultado é dado em escore que indica a confiabilidade da identificação (Wieser *et al.*, 2012). Altos escores e identificação precisa dependem do banco de dados e este é o maior desafio da técnica.

Os bancos comerciais, que são fornecidos com o equipamento, não possuem espectros suficientes que abarquem a grande diversidade de fungos, especialmente *Aspergillus*. Sendo assim, pesquisadores vêm tentando criar bancos que atendam às próprias necessidades ou até disponibilizá-los na internet para a utilização pública, como o exemplo da *MSI plattaforme*, que até o momento possui um dos bancos mais robustos para fungos filamentosos (Normand *et al.*, 2017).

#### 1.2.2 Genotipagem

Com as espécies definidas, a avaliação da correlação genética entre distintos isolados pode ser realizada por diversas metodologias. As regiões microssatélites do genoma, também conhecidas como *Short Tandem Repeats* (STRs), são sequências de DNA formadas por unidades curtas repetidas, como di-, tri- ou tetranucleotídeos. Elas são utilizadas como marcadores genéticos de alta resolução para genotipagem e *fingerprinting*. Além disso, STRs apresentam elevado poder de discriminação entre diferentes isolados de diversos patógenos. A genotipagem de STRs produz resultados

altamente reproduzíveis, permitindo a fácil comparação entre laboratórios, o que representa uma vantagem significativa em relação a técnicas baseadas em padrões, como *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), que apresentam baixa reproduzibilidade interlaboratorial (Mittal *et al.*, 2009).

Por essas razões, os STRs são ferramentas moleculares altamente valiosas em estudos epidemiológicos, permitindo rastrear a disseminação e a dinâmica populacional de patógenos. Ao fornecer informações sobre as relações genéticas entre isolados, os STRs ajudam a identificar cadeias de transmissão, detectar surtos e monitorar a evolução de populações microbianas ao longo do tempo. Essas informações podem, por sua vez, orientar políticas de saúde pública e estratégias mais eficazes de prevenção, controle e contenção de surtos, ou de disseminação de patógenos resistentes, através da análise de sua distribuição (De Valk *et al.*, 2005).

### **1.3 Resistência antifúngica em *Aspergillus fumigatus***

A microdiluição em caldo é o método de referência para detecção *in vitro* de isolados resistentes. Esse teste permite a determinação quantitativa da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que corresponde à menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento do microrganismo em condições padronizadas (EUCAST, 2022).

Os protocolos padronizados do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), dos Estados Unidos, e do *European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) estabelecem diretrizes para a determinação da sensibilidade antifúngica. Embora apresentem algumas poucas diferenças metodológicas, ambos são considerados equivalentes e possuem seus próprios pontos de corte clínicos (*breakpoints*). Na ausência de *breakpoints* clínicos disponíveis, disponibilizam pontos de corte epidemiológicos: *Epidemiological Cutoff Values* (ECV), definidos pelo CLSI, ou *Epidemiologic Cutoff* (ECOFF), estabelecidos pelo EUCAST. Esses valores classificam os isolados como *wild type* (selvagens) ou *non-wild type* (não selvagens). No entanto, os pontos de corte epidemiológicos não estão correlacionados à resposta clínica ao tratamento, pois não se baseiam em estudos de farmacodinâmica. Eles apenas indicam que a CIM de um fármaco supera os valores encontrados frente à  $\geq 95\%$  de isolados de uma espécie fúngica, o que indica presença de mecanismos de resistência e mutações (Lockhart; Ghannoum; Alexander, 2017).

Apesar dessa limitação, os pontos de corte epidemiológicos são ferramentas valiosas para a vigilância microbiológica, pois auxiliam na compreensão da epidemiologia local e alertam profissionais da saúde sobre possíveis ameaças emergentes (CLSI, 2017; EUCAST, 2022; Lockhart; Beer; Toda, 2020).

Um dos maiores desafios na classificação de isolados resistentes é a falta de pontos de corte, especialmente para *Aspergillus* spp. Atualmente, o EUCAST é o comitê que disponibiliza mais *breakpoints* para *A. fumigatus*, além de alguns ECOFF para *A. niger*, *A. flavus* e *A. terreus*. No entanto, a interpretação dos dados ainda enfrenta desafios, especialmente, em estudos com espécies crípticas ou aqueles com antifúngicos ainda não utilizados na prática clínica, como os fungicidas. Diante disto, a única alternativa é comparar os resultados com outros estudos da literatura e investigar mutações genéticas que possam indicar isolados com menor sensibilidade e fora da curva de normalidade (Lockhart; Ghannoum; Alexander, 2017).

### 1.3.1 Principais mecanismos de resistência em *Aspergillus fumigatus*

O gene que codifica a enzima alvo dos triazóis, a 14- $\alpha$ -demetilase, é chamado *cyp51* em fungos filamentosos, como *Aspergillus*, e *erg11* em leveduras. Está localizado no cromossomo 7 em *A. fumigatus*, possui 22.650 pares de bases (pb), aproximadamente. Sua estrutura é composta por 2 *exons* e 1 *ítron*. A parte funcional, o RNA mensageiro (mRNA) tem cerca de até 2000 pb (Zhang *et al.*, 2019).

Mutações nesse gene podem modificar a enzima, dificultando a ligação dos fármacos e, consequentemente, reduzindo sua eficácia e, por isso, estão frequentemente associadas à diminuição da sensibilidade ou até mesmo à resistência aos triazóis (Song; Zhang; Lu, 2018). Em *A. fumigatus*, existem dois genes parálogos: *cyp51A* e *cyp51B*. No entanto, as principais mutações associadas à resistência ocorrem no *cyp51A*. Isso porque, os azóis se ligam mais fortemente à enzima codificada pelo *cyp51B*, inibindo a produção de ergosterol, e o *cyp51A* pode ser então ativado e superexpresso para tentar restaurar o ergosterol e minimizar o impacto dos antifúngicos podendo, assim, levar o fungo à resistência (Hollomon, 2017).

As principais mutações no *cyp51A* são classificadas em dois tipos: (i) mutações pontuais, que resultam da substituição de um único nucleotídeo no *códon*, também conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*), e (ii) mutações associadas a repetições em *tandem*

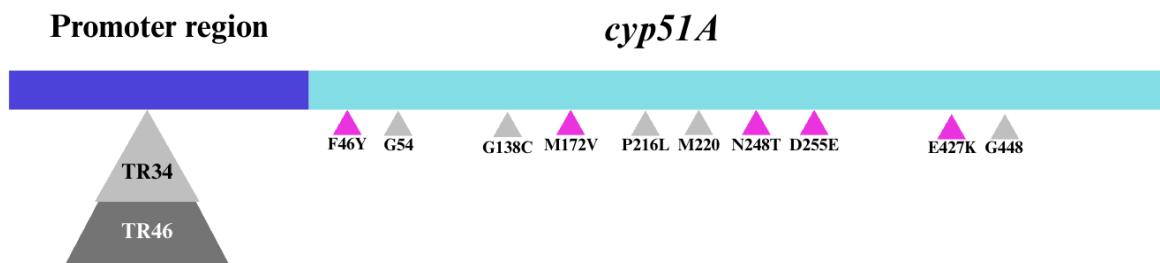
(*tandem repeat*, *TR*), que envolvem inserções de sequências repetitivas na região promotora do gene (Song; Zhang; Lu, 2018) (Figura 2).

As mutações pontuais são descritas por um sistema de códigos composto por: letra-número-letra. A primeira letra refere-se ao aminoácido original que seria produzido naturalmente pela célula, o número refere-se à posição no gene onde a mutação é encontrada e por fim, a última letra refere-se ao aminoácido formado após a mutação. Por exemplo: uma famosa mutação no *cyp51A* descrita como G54E, significa uma substituição do aminoácido glicina (G) por ácido glutâmico (E) na posição 54 da sequência de pares de base do *cyp51A*. O sistema de código de letras é aprovado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUB) (IUPAC-IUB, 1984).

Dentre as mutações pontuais em *cyp51A*, destacam-se os *hotspots* G54, M220, G448, P216 e G138. As alterações G54E/V/W/R, M220I/K/V/T, P216L e G138C estão associadas à resistência primária ao ITC e POS, enquanto a mutação G448S confere resistência principalmente ao VOR. Algumas dessas mutações podem ocorrer de forma isolada, mas outras surgem em combinações específicas. Duas combinações são particularmente relevantes: uma que reúne cinco substituições de aminoácidos (F46Y, M172V, N248T, D255E e E427K), conhecida na literatura como *cyp51A-5SNPs*, e outra com três substituições (F46Y, M172V e E427K), chamada de *cyp51A-3SNPs* (Escribano *et al.*, 2011; Garcia-Rubio *et al.*, 2018).

Outro tipo de mutação importante no *cyp51A* é a repetição em *tandem* na região promotora, mais comumente de 34 ( $TR_{34}$ ) ou 46 ( $TR_{46}$ ) pb. Essas repetições estão associadas, principalmente, à resistência ao VOR e ITC, mas já foram descritos isolados pan-azólicos resistentes e até resistentes a fungicidas agrícolas (Macedo *et al.*, 2020; Risum; Hare; Gertsen; Kristensen; Rosenvinge; Sulim; Abou-Chakra; *et al.*, 2022; Siopi *et al.*, 2020). Tais mutações vêm, usualmente, acompanhadas de mutações pontuais, tal como  $TR_{34}/L98H$  e  $TR_{46}/Y121F/T289A$ . Estão relacionadas ao aumento da expressão do gene, resultando em maior produção da enzima-alvo. Como consequência, há aumento na competição pelos sítios de ligação dos fármacos, reduzindo sua eficácia na célula (Song; Zhang; Lu, 2018).

Figura 2 – Representação esquemática da localização das mutações no gene *cyp51A* identificadas nos isolados de *Aspergillus fumigatus*



Rosa: mutações dos 3 e 5 SNPs

Fonte: Autor

Diferentemente das mutações pontuais, que estão associadas a isolados clínicos e ao uso prolongado de antifúngicos durante o tratamento, as mutações TR são encontradas em isolados ambientais, provenientes do solo e ar. Quando começaram a surgir pacientes já infectados com *A. fumigatus* que possuíam mutações TR antes mesmo de iniciar a terapia antifúngica, levantou-se a hipótese de que outros fatores na natureza possam exercer pressão seletiva sobre *A. fumigatus*. Uma das principais possibilidades é a exposição a fungicidas DMI. Por isso, a presença de mutações TR em isolados clínicos é um achado particularmente preocupante (Snelders *et al.*, 2009; Verweij *et al.*, 2009). Estudos comprovaram o impacto do uso de fungicidas na resistência cruzada a triazóis clínicos, como Rhodes *et al.* (2022) que através do genoma confirmou que alguns isolados clínicos de *A. fumigatus* mutantes já haviam adquirido resistência no meio ambiente antes de infectar humanos e o estudo de Cao *et al.* (2021) que encontrou uma relação entre o aumento dos níveis de resíduos de fungicidas azólicos no solo e a prevalência de isolados de *A. fumigatus* resistentes.

Há crescente preocupação na Europa devido aos inúmeros relatos de mutações TR e ao uso em larga escala de fungicidas. Isolados contendo TR já foram identificados em bulbos de tulipas e a exportação desses produtos pode contribuir para a disseminação de fungos resistentes para outros continentes. Além disso, práticas como o cultivo em estufas e incineração de resíduos, comuns em alguns desses países, podem favorecer a seleção desses isolados (Cogliati, 2013; Takahashi *et al.*, 2021).

Um estudo em Manchester (UK) relatou que 43% dos isolados estudados de *A. fumigatus*, resistentes a triazóis, não possuíam mutações no *cyp51A* (Bueid *et al.*, 2010). Isso ressalta a importância da pesquisa de mais genes ou mecanismos de resistência para a melhor compreensão do panorama.

Além do *cyp51A*, existem outros genes também estão envolvidos na resistência em *A. fumigatus*, sendo exemplos: *hmg1*, *cox* e *hapE*. O gene *hmg1* codifica a HMG-CoA redutase, enzima responsável por iniciar a biossíntese do ergosterol ao converter HMG-CoA em ácido mevalônico (Arai *et al.*, 2021). No estudo de Resendiz-Sharpe *et al.*, (2020), mutações no *hmg1* foram identificadas em 24% (n = 23) dos isolados de *A. fumigatus* resistentes a triazóis, sendo que 22% (n=5) desses não apresentavam mutações no gene *cyp51A*. A localização dessas mutações e sua combinação com mutações TR no *cyp51A* podem agravar ainda mais a resistência aos triazóis, reduzindo, significativamente, a sensibilidade aos antifúngicos.

*Cox7c* é um gene que codifica a citocromo c oxidase, componente terminal da cadeia respiratória mitocondrial, responsável por catalisar a transferência de elétrons e reduzir o oxigênio ao aceitar elétrons do citocromo c. Um estudo de Chen *et al.* (2022) mostrou que mutação nesse gene reduziu a sensibilidade aos azóis, além de afetar o crescimento fúngico. Uma das consequências dos antifúngicos na célula fúngica é o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem efeito tóxico. No entanto, essa mutação pode comprometer a função mitocondrial normal, levando à redução da respiração mitocondrial e, consequentemente, a menor produção de EROs (Chen, M. *et al.*, 2022).

O complexo proteico Hap é um conjunto de proteínas que regula a transcrição de genes. Ele é formado por três proteínas: HapE, HapB e HapC. Foi comprovado que os mutantes de *HapE* apresentam maior expressão de mRNA de *cyp51A*, possivelmente, porque o complexo Hap se liga com mais afinidade à região promotora de *cyp51A*, induzindo a superexpressão do gene (Camps *et al.*, 2012).

Vale destacar que algumas mutações pontuais, em particular no gene *cyp51A*, também são encontradas em isolados sensíveis, o que ainda gera debate sobre seu real impacto na resistência, enquanto outras estão diretamente associadas ao fenótipo resistente. Além disso, embora algumas mutações confirmam resistência primária a determinados antifúngicos, em muitos casos ocorre também redução de sensibilidade a outros triazóis. Essas alterações continuam sendo alvo de estudos e são

frequentemente relatadas em *A. fumigatus* (Escribano *et al.*, 2011; Garcia-Rubio *et al.*, 2018).

Um outro mecanismo de resistência estudado é a superexpressão de genes que codificam as proteínas bombas de efluxo. Essas proteínas de membrana, pertencentes principalmente às famílias ABC (*ATP-binding cassette*) e MFS (*Major Facilitator Superfamily*), podem atuar transportando os fármacos para fora da célula fúngica, reduzindo sua concentração intracelular e, consequentemente, sua eficácia (Coleman; Mylonakis, 2009). O aumento na expressão de genes que codificam tais bombas, como AfuMDR (*multidrug resistance genes*), tem sido associado a casos de resistência clínica, tornando o tratamento das infecções mais desafiador. Além disso, as bombas de efluxo podem atuar em conjunto com mutações no gene *cyp51A*, potencializando a resistência aos antifúngicos e dificultando o tratamento da aspergilose (Paul *et al.*, 2018).

O estudo das consequências fenotípicas de mutações requer a criação de cepas isogênicas, ou seja, cepas idênticas exceto pela mutação de interesse, para que a causa real da resistência possa ser isolada e estudada. A modificação genética em fungos, historicamente, era um processo demorado e de baixa eficiência. No entanto, a necessidade de introduzir mutações precisas levou à adoção de tecnologias de edição de DNA de última geração. A tecnologia que se estabeleceu como padrão-ouro para essa tarefa é o sistema CRISPR-Cas9. O *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), que faz referência a fragmentos pequenos e palindrômicos, que estão organizados em repetições intercaladas dentro do genoma de algumas bactérias e são usados para armazenar material genético exógeno. Quando parasitada por vírus bacteriófagos, a bactéria pode capturar parte do DNA do vírus e fundi-lo ao seu próprio genoma na região CRISPR. Assim, caso seja parasitada uma segunda vez, ela ou suas proles podem ativar o sistema CRISPR/Cas (Redman *et al.*, 2016).

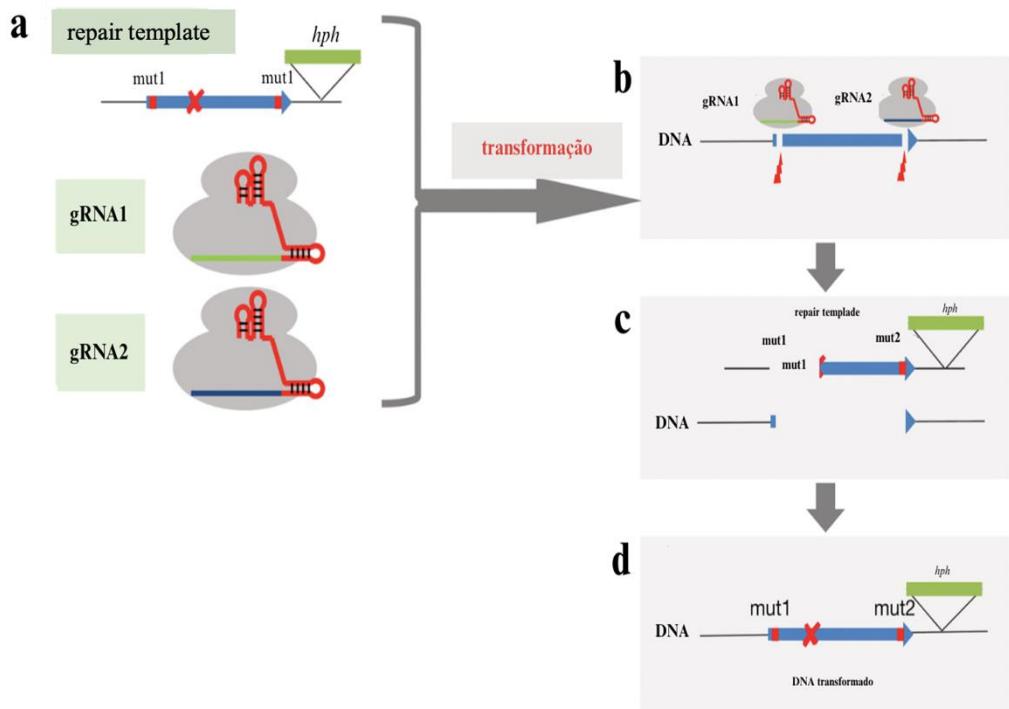
O processo começa quando o fragmento de DNA viral incorporado é transcrito em um RNA (CRISPR RNA-crRNA), que se associa a outro fragmento de RNA (*trans-activating CRISPR RNA-tracrRNA*), necessário para a ativação da endonuclease Cas9, formando um complexo. Finalmente, após o complexo ser ativado, o crRNA reconhece a sequência complementar no DNA do novo vírus invasor e a Cas9 realiza o corte na fita do DNA do bacteriófago, impedindo sua multiplicação (Redman *et al.*, 2016).

Esse sistema foi adaptado em laboratório e tornou-se uma ferramenta de edição genética, permitindo a modificação precisa de sequências de DNA em diferentes organismos. O crRNA e o tracrRNA foram combinados em uma única molécula artificial chamada RNA guia (sgRNA) que possui cerca de 20 pb e é específica para uma região-alvo. A enzima Cas9, derivada de *Streptococcus pyogenes*, é a mais popularmente utilizada em laboratório, mas outras variantes da Cas também podem ser empregadas (Jin *et al.*, 2022; Redman *et al.*, 2016).

Existem, basicamente, duas abordagens para a edição de DNA: a recombinação não homóloga e a recombinação homóloga. A recombinação não homóloga (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) ocorre quando a Cas cliva a molécula de DNA e a célula, diante desse estresse, tenta imediatamente reparar a parte clivada. Porém, esse mecanismo não é exato e há alta possibilidade de a célula reconstruir o DNA com uma sequência diferente da original, o que pode levar à perda do funcionamento de um gene, também chamado de *knockout* gênico. A recombinação não homóloga é útil para o estudo das funções dos genes em um organismo e é mais rápida pois não depende de um DNA molde (também chamado de *repair template*). Todavia, é um processo bem mais impreciso e pouco utilizado em estudos que analisam, exclusivamente, mutações em genes de resistência. (Jin *et al.*, 2022; Redman *et al.*, 2016).

A recombinação homóloga (*Homology-Directed Repair*, HDR) é uma técnica que exige mais tempo de execução e padronização, pois, durante o processo de edição genética, o sgRNA contém um *repair template*, que é complementar ao genoma da célula estudada. No momento em que a Cas corta o DNA-alvo da célula, o *repair template* se funde, automaticamente, ao DNA. A vantagem dessa técnica é que, em vez de inutilizar totalmente o gene, pode-se usar o *repair template*, que é uma cópia quase idêntica do gene, mas com mutações específicas induzidas em laboratório. Dessa forma, é possível estudar o papel de determinadas mutações e como elas afetam a sensibilidade antifúngica (Jin *et al.*, 2022; Umeyama *et al.*, 2018). A técnica de HDR utilizada em *A. fumigatus* está exemplificada na Figura 3.

Figura 3 – Esquema do processo de transformação mediado por recombinação homóloga



Fonte: adaptado de Umeyama *et al.* (2018)

A investigação aprofundada dos mecanismos genéticos subjacentes à resistência a triazóis, culminando na validação funcional dessas mutações por meio de ferramentas moleculares avançadas (CRISPR-Cas9) é vital para estabelecer a causalidade da resistência (Jin *et al.*, 2022). Diante de todas as considerações, estudos dentro do contexto de urgência global em saúde pública, buscando preencher lacunas críticas no conhecimento sobre a epidemiologia da resistência fúngica, contribuindo para dimensão da ocorrência de isolados resistentes em matrizes ambientais são cruciais para mapear reservatórios e rotas de exposição, subsidiando estratégias eficazes de vigilância.

### 1.3 Justificativa

O Brasil é um expoente na produção agrícola, beneficiado por vasta diversidade de espécies e condições geográficas que favorecem a ocorrência de patógenos, mas pouco se sabe sobre a dimensão da resistência e sobre o impacto dos triazólicos agrícolas e das mudanças climáticas em *Aspergillus* spp. no país.

Até o momento, a maioria dos estudos sobre resistência no Brasil está concentrada no estado de São Paulo. Em 2020 Pontes *et al.*, (2020) publicaram um estudo retrospectivo de cinco anos (2014–2017) no Hospital Universitário de Campinas, analisando 199 isolados clínicos e identificando mutações TR34/L98H/S297T/F495I no gene *cyp51A*. Dois anos depois, relataram um caso de paciente imunocomprometido com resistência ao VOR (CIM > 8 µg/mL), associada à mutação pontual G448S no *cyp51A*. Outra análise retrospectiva no mesmo hospital avaliou mais de 415 isolados clínicos e 63 ambientais, coletados entre 1998-2005 e 2014–2021, identificando mutações *cyp51A*-5SNIPs e uma nova combinação de mutações: TR46/F495I (Pontes; Arai; *et al.*, 2024). Os 63 isolados, classificados como ambientais, foram coletados nos quartos de pacientes. Por fim, Pontes *et al.* (2024) publicaram estudo, com isolados de seis pacientes com fibrose cística em tratamento entre 2014 a 2018, identificando mutações *cyp51A*-5SNIPs.

Em Santa Catarina, isolados clínicos e ambientais resistentes foram encontrados, mas dentre outras limitações, o *cyp51A* não foi estudado (Bedin Denardi *et al.*, 2018).

Adicionalmente, um estudo de Negri *et al.* (2017) realizou uma vigilância retrospectiva de isolados resistentes ao longo de 19 anos (1998–2017), analisando 221 isolados de *A. fumigatus*, atendidos em seis centros médicos de quatro cidades brasileiras (cidades não especificadas). Os pesquisadores não identificaram mutações no gene *cyp51A* e concluíram que a resistência aos triazóis ainda não era emergente no Brasil; no entanto mesmo encontrando isolados resistentes, não foram estudados outros genes de resistência, nem analisada a presença de superexpressão de bombas de efluxo.

No estado do MS, que se configura como um dos mais importantes no cenário agrícola, fungicidas DMI são empregados em lavouras podendo ter forte impacto no micobioma fúngico ambiental. Isolados de *Aspergillus* spp. resistentes podem estar sendo selecionados, dispersos no meio ambiente e inalados por trabalhadores rurais e outros indivíduos, evoluindo para infecção com risco de refratariedade ao tratamento com triazóis clínicos (Lockhart; Chowdhary; Gold, 2023).

Lemos *et al.* (2024), como resultado de mestrado pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, comprovaram a ampla diversidade de espécies de *Aspergillus* no ar interno de hospitais, mas o perfil de sensibilidade antifúngica não foi determinado. O estudo de mestrado de Dorneles (2022), do Programa de Pós-graduação em

Doenças Infecciosas e Parasitárias (PPGDIP) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), com isolados do solo coletados de lavouras do MS, descreveu ocorrência de resistência triazólica em diversas espécies, incluindo *A. fumigatus* multirresistentes a VOR, ITC e POS.

A caracterização precisa da espécie e seu perfil de sensibilidade a antifúngicos são fundamentais para a formulação de estratégias de tratamento adequadas, que podem, no futuro, reduzir as taxas de mortalidade e os custos com saúde. No Brasil, ainda há muitas lacunas devido ao número reduzido de estudos sobre a epidemiologia da resistência e os perfis de sensibilidade antifúngica, bem como, sobre os mecanismos subjacentes de resistência, em isolados ambientais e clínicos, em outras espécies além de *A. fumigatus*. Embora alguns estudos anteriores tenham contribuído para o conhecimento atual, a maioria deles analisou isolados clínicos concentrados em poucas regiões do país. Os relatos de resistência encontrados até o momento motivam o desenvolvimento de pesquisas para elucidar as taxas de resistência a triazólicos e investigar a base molecular desse fenômeno no MS.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar a frequência de *A. fumigatus* resistentes, em isolados clínicos e ambientais, coletados no MS entre os anos de 2022–2024.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a distribuição de espécies de *Aspergillus* em amostras clínicas e ambientais do ar atmosférico;
- Determinar a frequência de isolados resistentes de *Aspergillus*;
- Analisar a relação genética entre os isolados resistentes de *A. fumigatus*;
- Investigar mecanismo de resistência por mutações gênicas em *A. fumigatus*, e
- Estudar a relação entre mutações encontradas e resistência antifúngica.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa com humanos, com número CAAE: 59722522.0.0000.0021.

Todos os isolados foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), com número AFB8668.

#### **3.2 Disponibilidade de dados**

As sequências dos isolados resistentes de *A. fumigatus* deste estudo estão disponíveis publicamente no National Center for Biotechnology Information (NCBI), no banco de dados GenBank, sob os números de acesso PX655623 a PX655627.

#### **3.3 Locais de realização do estudo**

A recepção das culturas fúngicas, a recuperação de colônias de amostras ambientais, classificação em seção de *Aspergillus* e testes de sensibilidade antifúngica (TSA) foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LabDIP) da UFMS.

Os sequenciamentos da  $\beta$ -tubulina, calmodulina, *cyp51A* e das regiões microssatélites, bem como os experimentos com CRISPR-Cas9 foram realizados no *Medical Mycology Research Center* da Universidade de Chiba (MMRC) no Japão.

#### **3.4 Origem dos isolados clínicos**

Os isolados clínicos foram recebidos como parte da rotina de apoio diagnóstico ao Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) da UFMS e ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de MS. Nenhuma amostra biológica foi manipulada e os isolados foram recebidos em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD) com adição de cloranfenicol ou ágar batata, previamente, identificados como *Aspergillus* spp. Foram incluídos no estudo isolados do ano de 2022.

Todos os isolados foram incorporados à Coleção Microbiológica do Mato Grosso do Sul (CMMS), administrada pelo LabDIP, e estão referenciados neste estudo pelo seu identificador numérico cadastrado em banco de dados do *Research Electronic Data Capture* (REDCap), desenvolvido pela Universidade de Vanderbilt, EUA, ou pelo acrônimo CMMS.

### **3.5 Origem dos isolados ambientais do ar**

Parte dos isolados foram provenientes do projeto de Pesquisa Latino-Americana sobre resistência de *Aspergillus fumigatus* (LatAsp) e recebidos em 2022 no LabDIP, em tubos criogênicos contendo solução de glicerol 20%, contendo a identificação prévia de seção.

Adicionalmente, isolados do ar foram coletados em 2023 na parte urbana de algumas cidades do MS, na zona rural e na Base de Estudos do Pantanal. As amostras foram transportadas e processadas no LabDIP. No momento em que esses isolados foram cultivados, priorizou-se o isolamento de colônias sugestivas de *A. fumigatus* e por isso não foi possível estimar a frequência exata de todas as espécies do ar, como foi possível com os isolados clínicos.

Amostragem de ar, adicional, foi realizada em 2024 ao redor de residências de dois pacientes do HUMAP, com suspeita de aspergilose, na cidade de Campo Grande.

### **3.6 Coleta e processamento das amostras do ar**

Fitas adesivas estéreis foram distribuídas a alunos e funcionários da UFMS que se voluntariaram para coletar amostras em suas residências. Os voluntários foram instruídos como manejar e onde posicionar os adesivos para otimizar a coleta. As fitas foram expostas por um período de 2 h a 6 h em ambientes com circulação de ar, como janelas. Após o período de exposição, as fitas foram fechadas e entregues ao laboratório. Cada adesivo foi colado em uma placa de Petri contendo ASD e incubado a 35 °C por até 6 h. Em seguida, o adesivo foi removido e a placa foi incubada por mais 48 h.

Outra estratégia de amostragem de ar atmosférico utilizou placas de Petri com ASD que foram transportadas para diferentes locais dentro da cidade de Campo Grande e expostas por um período de 1 h a 3 h. Após a exposição, essas placas foram

seladas, transportadas do laboratório e incubadas a 35 °C no mesmo dia, por até 48 h.

Uma coleta foi realizada no Pantanal, por voluntários do curso de biologia na Base de Estudos do Pantanal durante expedições de rotina, caracterizando amostragem por conveniência.

### **3.7 Isolamento fúngico e classificação em seção**

Após a incubação de todas as placas, as colônias sugestivas de *Aspergillus* spp. foram transferidas para outras placas de ASD e incubadas a 35 °C até obtenção de colônias puras. Durante esse processo, exame direto da cultura corado com azul de lactofenol foi feito para confirmar a presença de *Aspergillus* spp. e descartar os isolados de *Penicillium* spp. e outros morfotipos semelhantes.

Os isolados de *Aspergillus* spp. foram cultivados em ágar Czapek, pelo método da colônia gigante para fins da classificação em seção, levando-se em consideração os seguintes aspectos: tempo de crescimento, coloração e textura das colônias na frente e no verso. A técnica de microcultivo em lâmina, com ágar batata, também foi realizado em alguns isolados para observação das estruturas fúngicas (Samson *et al.*, 2014; Walsh; Hayden; Larone, 2018).

### **3.8 Identificação molecular das espécies**

#### **3.8.1 Extração do DNA genômico**

Foi realizado um protocolo *adaptado in house* baseado no método de extração Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (dos Santos *et al.*, 2024). Para tanto, conídios dos isolados foram coletados para preparo de inóculos de  $10^{5-6}$  UFC/mL. Em seguida, 100 µL dessa solução foi adicionado a 2 mL de meio Potato Dextrose (PD) líquido e incubado a 37 °C em agitação por 24 h para obtenção de micélio. Após 24h, o micélio foi adicionado a um tubo contendo esferas de 0,5 mm, 0,5 mL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico e 0,5 de tampão de extração. Os tubos foram submetidos ao MagNA Lyser para a disruptão mecânica do micélio e liberação do DNA, a 4000 rpm por 45 seg, repetidos 3x. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 min. Foram transferidos 400 µL do sobrenadante para um novo

tubo e adicionados 1 mL de etanol 100%. Os tubos foram incubados por 10 min e centrifugados a 12.000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido, foi adicionado 500 µL de etanol 70% e os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e após os tubos secarem o DNA foi eluído em 50 µL de *Tris-EDTA* (TE) e o DNA foi quantificado com auxílio do NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

### 3.8.2 Amplificação dos genes de $\beta$ -tubulina e calmodulina

Isolados com suspeita de pertencerem à seção Nigri foram submetidos ao sequenciamento do gene da calmodulina e os demais foram submetidos ao sequenciamento para  $\beta$ -tubulina. Os *primers* 2A e 2B para  $\beta$ -tubulina, CMD5 e CMD6 para calmodulina estão descritos no Apêndice 1 (Glass; Donaldson, 1995; Hong *et al.*, 2006).

A solução de PCR consistiu de 12,5 µL de KOD One Master Mix (Toyobo Research Reagents), 5,5 µL de água ultrapura, 1 µL de primers (10µM) e 2 µL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador Miniamp Thermal Cycler (Applied Biosystems) e os parâmetros estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Após a amplificação, a detecção do DNA foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 2% a 100 v por 30 minutos com *ladder* de 1 kb. Os produtos da PCR foram purificados com FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp).

Tabela 1 – Parâmetros da reação de amplificação do gene da  $\beta$ -tubulina

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturação	95 °C	30 s	
Anelamento	58 °C	30 s	40
Extensão	72 °C	1 min	
Extensão final	72 °C	3 min	1

Tabela 2 – Parâmetros da reação de amplificação do gene da calmodulina

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturação	95 °C	30 s	
Anelamento	53 °C	30 s	40
Extensão	72 °C	1 min	
Extensão final	72 °C	4 min	1

### 3.8.3 Sequenciamento dos genes de $\beta$ -tubulina e calmodulina

Solução contendo 0,5 de BigDye™ Terminator v1.1/3.1 (Applied Biosystems), 1  $\mu$ L de 5X BigDye™ Sequencing Buffer (Applied Biosystems), 1  $\mu$ L de cada primer (5  $\mu$ M), 5,5  $\mu$ L de água ultrapura e 1  $\mu$ L de DNA foi preparada e submetida a termociclador. Os parâmetros da reação estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros da reação de sequenciamento dos genes da  $\beta$ -tubulina e calmodulina

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96 °C	1 min	1
Desnaturação	96 °C	10 s	
Anelamento	50 °C	5 s	25
Extensão	60 °C	4 min	

Para a purificação, uma solução contendo 4  $\mu$ L de 125 mM de EDTA, 16  $\mu$ L de água ultrapura e 3  $\mu$ M de acetato de sódio foi adicionada a tubos, após a reação de sequenciamento. Foram adicionados por último 50  $\mu$ L de etanol 100%, misturados no vórtex e incubados no gelo por 15 min. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 25 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido, foram adicionados 100  $\mu$ L etanol 70% e os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e após os tubos secarem foram adicionados 10  $\mu$ L de formamida para eluição do DNA. Os tubos foram submetidos ao banho seco

(Termobloco) por 2 min a 98 °C. Por fim, os produtos do sequenciamento foram submetidos ao ABI *Automated Sequencer* (PerkinElmer) para detecção da fluorescência e geração do arquivo com as sequências.

Para a edição das sequências foi usado o software Geneious®. Inicialmente, a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do NCBI (acessível via <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizada para indicar a qual seção de espécies os isolados pertenciam antes de prosseguir com as análises filogenéticas.

### 3.8.4 Análise filogenética

A definição de espécie seguiu os critérios de Visagie *et al.* (2024), incluindo a aceitação das espécies sinonimizadas. O critério molecular de identificação das espécies foi a monofilia dos isolados nas análises filogenéticas, construídas a partir das sequências dos genes  $\beta$ -tubulina ou calmodulina (para a seção Nigri). As análises filogenéticas foram realizadas separadamente para cada região gênica. As sequências de referência utilizadas foram as mesmas empregadas por Houbraken *et al.* (2020), obtidas no GenBank através dos números de acesso. Espécies externas ao grupo de interesse foram incluídas como outgroup para enraizar as árvores filogenéticas.

As sequências foram visualizadas e renomeadas no software MEGA v.11 (Kumar; Stecher; Tamura, 2016). O alinhamento das sequências foi realizado no MAFFT (acessível via <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) sob as seguintes configurações: (i) permitir símbolos incomuns, como selenocisteína ("U"), inosina ("I") e outros caracteres não alfabéticos (*Allow unusual symbols*); (ii) manter diferenciação entre letras maiúsculas e minúsculas, direção das sequências nucleotíidas e ordem de saída igual à de entrada (*UPPERCASE/lowercase, Direction of nucleotide sequences, Output order = Same as input*); e (iii) estratégia G-INS-i - método progressivo lento, com árvore-guia de alta acurácia (*Strategy - G-INS-i [Slow; progressive method with an accurate guide tree]*) (Katoh; Rozewicki; Yamada, 2019).

As sequências alinhadas foram, então, refinadas utilizando a interface *online* Gblocks 0.91b sob as seguintes configurações: (i) permitir blocos finais menores (*Allow smaller final blocks*), (ii) permitir posições com lacunas dentro dos blocos finais (*Allow gap positions within the final blocks*), e (iii) permitir posições flanqueadoras menos restritas (*Allow less strict flanking positions*), (acessível via

[http://phylogeny.lirmm.fr/phylo\\_cgi/one\\_task.cgi?task\\_type=gblocks](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks) (Dereeper *et al.*, 2008).

Os alinhamentos foram, então, analisados por máxima verossimilhança utilizando a plataforma IQ-TREE (acessível via <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>), com seleção automática do melhor modelo evolutivo e as seguintes configurações: tipo de sequência = DNA (*Sequence type* - DNA) e *ultrafast bootstrap* com 1000 repetições para estimativa do suporte dos ramos (Trifinopoulos *et al.*, 2016).

O software FigTree v.1.4.4 foi usado para visualizar e editar os dendrogramas (Nguyen *et al.*, 2015).

### 3.9 Teste de sensibilidade antifúngica

Todos os testes de sensibilidade foram realizados através da microdiluição em caldo de acordo com o método de referência EUCAST E. DEF 9.4 (EUCAST, 2022). O método incluiu preparação das soluções de estoque, diluição dos antifúngicos, contagem de conídios para preparo dos inóculos, adição de antifúngicos e inóculos às placas de microdiluição de 96 poços, leitura e interpretação dos resultados.

Foram realizados testes com todos os isolados clínicos e ambientais, incluindo os que não eram da seção Fumigati, com os seguintes antifúngicos: ITC, VOR, POS, ISA (Sigma-Aldrich) e o fungicida agrícola tebuconazol (TEB) (Sigma-Aldrich). Para validação dos testes, foram adicionadas em todas as placas 2 cepas-controle: *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

Para *A. fumigatus* a leitura dos resultados foi realizada após 48 h com auxílio de espectrofotômetro, utilizando a densidade óptica (DO) com comprimento de 490 nm e a determinação do CIM aconteceu comparando-se a redução de crescimento em  $\geq 90\%$ , em relação ao controle sem fármaco. Como preconizado pelo EUCAST, a leitura dos testes em outras espécies que não sejam *A. fumigatus* foi realizada a “olho nu” com a CIM sendo determinada pelo *Inhibitory Concentration* - IC<sub>100</sub>. Os valores de moda, intervalo de valores de CIM, CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> (respectivamente, concentração que inibe 50% e 90% do conjunto de isolados) foram calculados. A resistência *in vitro* foi definida de acordo com os *breakpoints* definidos pelo EUCAST e na ausência dos mesmos, os isolados foram classificados em *wild-type* ou *non wild-type* pelos ECOFFS (EUCAST, 2025). Para TEB não existem pontos de corte disponíveis, então CIMs  $\geq 4$  mg/L foram consideradas altas de acordo com

Resendiz-Sharpe *et al.* (2021). Todos os pontos de corte disponíveis pelo EUCAST estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Pontos de corte determinados pelo EUCAST para espécies de *Aspergillus*

Espécie	ITRA	POS	VOR	ISA
<i>A. flavus</i>	> 1	> 0,5	> 2	> 2
<i>A. fumigatus</i>	> 1	> 0,25	> 1	> 2
<i>A. niger</i>	> 2	> 0,5	> 2	> 4
<i>A. terreus</i>	> 1	> 0,25	> 2	> 1

Adaptados de (EUCAST, 2025)

Rosa: *breakpoints*; Amarelo: ECOFFs

#### 4. Sequenciamento do *cyp51A*

Os isolados de *A. fumigatus* para os quais foram encontradas altos valores de CIM, correspondendo a isolados *non-wild type* ou resistentes, foram submetidos ao sequenciamento do *cyp51A* (Mellado *et al.*, 2001). Os *primers* usados estão listados no Apêndice 1. Para a amplificação do gene, uma solução contendo 12,5 µL de *KOD One PCR Master Mix*, 1 µL de cada *primer*, *forward* e *reverse* (10 µM), 12,5 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA foi preparada. Os parâmetros estão descritos na Tabela 5.

A eletroforese foi realizada como descrito no item 3.8.2. Os produtos da PCR foram purificados com FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp) de acordo com as instruções do fabricante.

A solução para o sequenciamento foi preparada contendo 0,5 µL BigDye™ Terminator (Applied Biosystems), 1 de 5X BigDye™ Sequencing Buffer (Applied Biosystems), 1 de cada primer (5 µM), 5,5 de água ultrapura e 1 de DNA. Os parâmetros da reação estão a seguir no Tabela 6.

Tabela 5 – Parâmetros da reação de amplificação do *cyp51A*

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	98 °C	3 min	1
Desnaturação	98 °C	10 s	
Anelamento	58 °C	30 s	30
Extensão	68 °C	30 s	
Extensão final	68 °C	2 min	

Tabela 6 – Parâmetros da reação de sequenciamento do *cyp51A*

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96 °C	1 min	1
Desnaturação	96 °C	10 s	
Anelamento	50 °C	5 s	25
Extensão	60 °C	3 min	

A purificação das sequências e leitura das fluorescências foram realizadas como descrito no item 3.8.2.

Os arquivos gerados foram alinhados com o genoma da sequência de referência A1113, na plataforma online *Benchling* (acessível via <https://www.benchling.com/>). Os SNIPs encontrados foram analisados e as alterações de aminoácidos foram investigadas com auxílio da lista de códons (Quadro 1) de acordo com a IUPAC-IUB, (1984).

Quadro 1 – Código genético com os *códons* de RNA mensageiro e os respectivos aminoácidos

U		C		A		G			
Códon / Siglas dos aminoácidos									
U	UUU UUC	F	UCU UCC UCA UCG	S	UAU UAC	Y	UGU UGC		
	UUA UUG	L			UAA UAG	STOP	UGA		
							UGG		
	CUU CUC	L	CCU CCC CCA CCG	P	CAU CAC	H	CGU CGC		
C	CUA CUG				CAA CAG	Q	CGA CGG		
	AUU AUC AUA	I	ACU ACC ACA ACG	T	AAU AAC	N	AGU AGC		
A	AUG	M			AAA AAG	K	AGA AGG		
	GUU GUC GUA GUG	V	GCU GCC GCA GCG	A	GAU GAC	D	GGU GGC		
G			GAA GAG	E	GGA GGG				
					G				

Legenda para siglas dos aminoácidos: A - Alanina, C - Cisteína, D - Ácido aspártico, E - Ácido Glutâmico, F - Fenilalanina, G - Glicina, H - Histidina, I - Isoleucina, K - Lisina, L - Leucina, M - Metionina, N - Asparagina, P - Prolina, Q - Glutamina, R - Arginina, S - Serina, T - Treonina, V - Valina, W – Triptofano, X - Aminoácido não especificado

Fonte. Autor

## 5. Genotipagem de microssatélites

Os isolados resistentes foram submetidos ao sequenciamento das regiões de repetição curta em *tandem*, também chamadas de regiões microssatélites, para a determinação da variabilidade genética (De Valk *et al.*, 2005). Os 9 *loci* sequenciados foram: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C. Os respectivos *primers* para amplificação dessas regiões estão descritos no Apêndice 1. As regiões foram amplificadas e a solução de PCR foi preparada com 10 µL de Go Taq Master Mix (Promega), 1 µL de cada primer (10 µM), 7 µL de água destilada e 2 µL do DNA. Na Tabela 7 encontram-se os parâmetros da reação de PCR.

Tabela 7 – Parâmetros da reação de amplificação das regiões de microssatélite

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturação	95 °C	15 s	
Anelamento	57 °C	15 s	35
Extensão	72 °C	1 min	
Extensão final	72 °C	1 min	

A eletroforese foi de acordo com o item 3.8.2 com adição de 1 µL do corante Novel Juice. Os produtos de PCR foram purificados adicionando-se 4 µL do ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems™) diluído nos tubos de DNA, submetendo-os a uma ciclagem de temperatura de 37 °C por 30 min, 80 °C por 5 min e, por fim, refrigeração a 4 °C.

Para a reação de sequenciamento, foram pipetados: 1 µL do DNA purificado, 0,5 µL de BigDye, 1 µL de 5X BigDye Sequencing Buffer e 5,5 µL de água ultrapura. Os parâmetros da reação de sequenciamento estão descritos na tabela 8 e os *primers* usados nos no Apêndice 1.

Tabela 8 – Parâmetros do sequenciamento das regiões de microssatélite

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96 °C	1 min	1
Desnaturação	96 °C	10 s	
Anelamento	50 °C	5 s	25
Extensão	60 °C	1:30 min	

A purificação das sequências e a leitura das fluorescências foram realizadas conforme descrito no item 3.8.2. A contagem das repetições em *tandem* foi feita com o auxílio do software SnapGene. Para a construção do dendrograma, foi realizada uma análise de agrupamento UPGMA utilizando o software Bionumerics 7.6. Dados

contendo os números de repetições em tandem foram levantados da literatura e da plataforma online <https://afumid.shinyapps.io/afumID/> para compor o dendrograma.

## 6. CRISPR-Cas9

A recombinação homóloga foi realizada a fim de verificar se as mutações encontradas em alguns dos isolados estavam envolvidos na resistência ao TEB. As mutações que foram alvo do estudo foram: uma não silenciosa (M172V) e quatro silenciosas (L358L, C454C, G497G, G89G), presentes em combinação, em alguns isolados com sensibilidade baixa ao TEB, incluindo o isolado 340 que foi usado como molde para o estudo.

Três *repair templates* foram construídos utilizando o método de Umeyama *et al.* (2018). Os *primers* utilizados para construir o molde de reparo são mostrados no Apêndice 1 e incluíram as regiões *upstream* e *downstream* do *cyp51A*, bem como mutações silenciosas (mut), que foram inseridas nos fragmentos para conferir resistência à nuclease Cas9 (Silva *et al.*, 2017). Além disso, um cassete marcador de resistência à higromicina B (hph), obtido do plasmídeo pHph, também foi incluído na construção do plasmídeo.

Para o primeiro *repair template*, os *amplicons* da região *cyp51A* do isolado 340 foram amplificados e fundidos com hph no vetor plasmidial, para incluir as mutações M172V, G89G, L358L, C454C e G497G. O plasmídeo foi, então, inserido por recombinação homóloga na cepa-padrão AfS35, gerando o genótipo AfS35<sup>340</sup>, e no isolado molde 340 (genótipo *cyp51A*<sup>340</sup>), como controle de qualidade.

O segundo *repair template* foi cedido pelo MMRC, obtido através da amplificação do *cyp51A* de AfS35, e inserido no isolado molde 340 para gerar os transformantes *wild-type*: AfS35<sup>WT</sup> e 340<sup>WT</sup>, respectivamente.

O terceiro *repair template* foi construído a fim de conter, apenas, a mutação M172V e gerar o genótipo AfS35<sup>M172V</sup>.

Os detalhes metodológicos de cada etapa serão descritos a seguir.

## 6.1 Amplificação e construção plasmídeo *cyp51A*-340

O *cyp51A* do isolado 340, que continha as mutações, foi amplificado em quatro fragmentos, sendo eles: A, C, F, B. Os *primers* usados para a amplificação de cada fragmento estão descritos no Apêndice 1 (Majima *et al.*, 2021).

Para a amplificação, as extremidades dos *primers* internos e externos foram desenhados de forma que pudessem se sobrepor e se unirem ao plasmídeo na etapa posterior. Ademais, alguns *primers* continham uma troca de nucleotídeo a fim de induzir a inserção de duas mutações que viriam a conferir resistência a Cas9 após a transformação. Por fim, também foi amplificado o plasmídeo (Takara Bio USA, Inc.) contendo uma sequência de DNA acoplada que confere resistência à higromicina.

A solução de PCR consistiu de 12,5 µL de KOD One Master Mix (Toyobo Research Reagents), 12,5 µL de água ultrapura, 1 µL de primers (10µM) e 1 µL do DNA *template* e plasmídeo. Os parâmetros estão descritos a seguir no Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros da amplificação do *cyp51A* mutado do isolado 340

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	98 °C	1 min	1
Desnaturação	98 °C	10 s	
Anelamento	57 °C	5 s	25
Extensão	68 °C	30 s	

Reação de eletroforese, em duplicata, em gel de agarose 1% com *ladder* 100 pb foi realizada e as bandas positivas dos 4 fragmentos e do plasmídeo foram marcadas, cortadas do gel e colocadas em um tubo para serem purificadas (FavorPrep GEL/PCR Purification Kit, Favorgen Biotech Corp).

O método de *Overlap Extension and sewing PCR* foi usado para unir os fragmentos e reconstruir o *cyp51A*. Os volumes da reação foram os seguintes: 50 µL da enzima Q5 (New England Biolabs), 2 µL de primers LFH1 and LFH4, 5 µL DNA dos fragmentos e 41 µL de água. Os parâmetros da PCR estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros para a *Overlap Extension and sewing PCR* do *cyp51A*

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	98 °C	30 sec	1
Desnaturação	98 °C	10 s	
Anelamento	62 °C	30 s	35
Extensão	72 °C	1:30 s	
Extensão final	72 °C	2 min	1

Uma nova eletroforese, em duplicata, foi realizada e as bandas cortadas e purificadas como descrito anteriormente.

Para a formação dos plasmídeos circulares através da infusão do DNA do *cyp51A* ao vetor plasmidial linear, foram pipetados em tubo 3 µL do DNA do *cyp51A* reconstruído, 1 µL da enzima de infusão (Takara Bio USA, Inc.). O tubo foi submetido 50 °C por 15 min, seguidos de 2 min em gelo, adição de 50 µL de *Escherichia coli* *DH5α* (Nippon Gene Ecos™) e aquecimento a 42 °C por 1 min. Por fim, o tubo foi incubado a 37 °C por 1 h.

Para a seleção das células de *E. coli* contendo o plasmídeo do *cyp51A*, 25 µL do produto da infusão foram pipetados na superfície de meio Luria-Bertani (LB) incubado a 37 °C por 12 h. Após o período de incubação, a fim de confirmar o experimento anterior, foram selecionadas 8 colônias para a realização de PCR direta, contendo 10 µL de água ultrapura, 10 µL de KAPA taq e 1 µL dos primers *cyp51A\_SQ6F* e *hph-3*. Os parâmetros da PCR estão descritos na Tabela 11. As mesmas 8 colônias foram cultivadas em meio LB.

Após a PCR, as colônias que apresentaram bandas confirmaram a presença do plasmídeo. As colônias positivas foram submetidas a extração do plasmídeo com *FastGene® Plasmid Mini Kit* (NIPPON Genetics) segundo instruções do fabricante. O *cyp51A* foi amplificado, purificado e sequenciado de acordo com o item 4.

**Tabela 11 – Condições da PCR direta da colônia para confirmação da presença do plasmídeo**

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	15 sec	1
Desnaturação	95 °C	15 s	
Anelamento	56 °C	15 s	30
Extensão	72 °C	1 min	
Extensão final	72 °C	1 min	1

## **6.2 Amplificação e construção de plasmídeo AfS35 - M172V**

O plasmídeo de *cyp51A* contendo, apenas, a mutação M172V foi construído através da PCR inversa com: 12,5 µL de KOD One, 12,5 µL de água ultrapura, 1 µL dos primers (10 Mµ), 1 µL do plasmídeo AfS35. Os parâmetros da PCR estão descritos no quadro 12.

Após a PCR inversa, as etapas de eletroforese, infusão, incubação e PCR direta da colônia foram iguais às descritas no item 6.1.

As colônias que apresentaram bandas na PCR confirmaram a presença do plasmídeo e foram submetidas à extração do plasmídeo com *FastGene® Plasmid Mini Kit* (NIPPON Genetics), segundo instruções do fabricante. O *cyp51A* foi amplificado, purificado e sequenciado de acordo com o item 4.

**Tabela 12 – Parâmetros para a PCR inversa do *cyp51A*-M172V**

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	98 °C	1 min	1
Desnaturação	98 °C	10 s	
Anelamento	58 °C	5 s	25
Extensão	68 °C	1 min	
Extensão final	68 °C	1 min	1

### 6.3 Síntese do sgRNA e preparação do *repair template*

O sgRNA foi desenhado e cedido pelo MMRC. Para sua síntese foi utilizado o *EnGen® sgRNA Synthesis Kit* (New England Biolabs) e purificado com *RNA Clean e Concentrator* (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante.

### 6.4 Formação do protoplasto

Suspensões contendo de  $2-4 \times 10^7$  UFC/mL dos isolados 340 e AfS35 foram preparadas em tubos contendo 10 mL de meio extrato de levedura e glicose (*Yeast extract-YG*) e submetidas à incubação a 37 °C, sob agitação de 160-180 rpm por 6 h.

Após a germinação dos conídios, foram adicionados 10 mL do *buffer* de protoplasto e os tubos foram agitados a 30 °C, 50–60 rpm por 90 min. Em seguida, foram centrifugados por 10 min a 10 °C em 1800 xg.

O sobrenadante foi removido, o *pellet* ressuspandido em 1 mL de 0,6 M KCL-50 mM CaCl<sub>2</sub>, transferido para outro tubo de 1,5 mL e centrifugado a 4 °C 2500 xg por 3 min. Essa etapa foi realizada 2 vezes.

A contagem e conferência das células foi realizada e, então, o tubo foi submetido à centrifugação a 2500 xg 4 °C por 3 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspandido em solução de KCL-50 mM em concentração final de  $2-4 \times 10^7$  UFC/mL.

### 6.5 Transformação por recombinação homóloga

Foram adicionados 10 µg da nuclease Cas9 e 500 ng de sgRNA em um tubo, o qual foi incubado à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foram adicionados 5 µL do *repair template* e 100 µL do protoplasto, seguido de homogeneização em *vortex* por 8 vezes durante 1 seg. Logo, foram adicionados 50 µL de polietilenoglicol (PEG) e homogeneizado 5 vezes por 1 seg. O tubo foi incubado em gelo por 25 min e, em seguida, adicionado de 1000 µL de PEG e incubado por mais 25 min.

A solução obtida foi semeada em placas de ágar Czapek-dox e incubada a 37 °C por 20 h. Após o período de incubação, uma camada de 10 mL de ágar Czapek-

dox 0,35% contendo 400 µg/mL de higromicina foi sobreposta nas placas e incubadas novamente por 90 min, em temperatura ambiente, seguido de mais 3 dias a 37 °C.

Ao menos 3 colônias de cada transformante foram selecionadas para o sequenciamento e TSA. A extração do DNA ocorreu como descrito em 3.8.1 e o sequenciamento do *cyp51A* como descrito no item 4.

## 6.6 TSA dos isolados transformantes

Os testes com TEB foram realizados seguindo os protocolos do método de microdiluição em caldo M38-Ed3 do CLSI (CLSI, 2017). Todos os testes foram realizados em duplicata utilizando o mesmo ponto de corte para TEB (CIM  $\geq$  4 µg/mL).

Adicionalmente, mais testes de sensibilidade foram feitos utilizando *dry plates* comerciais (Eiken Chemical Co., Tóquio, Japão), a fim de obter os valores de CIM para ITC e VOR. Para isto foram preparados inóculos de  $2,5 \times 10^4$  UFC/mL para inoculação das placas, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a complementação e melhor elucidação dos resultados de CIM de TEB dos transformantes foram realizados testes de disco difusão de acordo com o documento M51-A do CLSI (CLSI, 2010), com adaptações segundo Qiao *et al.* (2007). Para este fim, 20 mL de meio de ágar Mueller-Hinton foram vertidos em uma placa contendo  $2,0 \times 10^5$  UFC/mL 200 µL de solução de Tween® 20 a 0,05%. Após a solidificação do meio, um disco de 6 mm contendo 10 µg de TEB foi colocado na superfície. As placas foram incubadas a 35 °C por 40 a 48 h, e os diâmetros das zonas de inibição foram medidos. Todas as medições (mm) para cada transformante foram realizadas em duplicata.

## 7. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada para comparar as frequências de isolamento das espécies e os perfis de resistência obtidos neste estudo com os dados reportados na literatura. Devido ao tamanho amostral limitado e à presença de frequências esperadas inferiores a 5 em algumas categorias, utilizou-se o Teste Exato de Fisher para tabelas de contingência 2x2, utilizando a ferramenta estatística online GraphPad QuickCalcs (acessível via <https://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Valores de  $p > 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

A precisão das estimativas de prevalência foi avaliada por meio do cálculo de intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para proporções, utilizando o método exato Clopper-Pearson no software Microsoft Excel.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Pontos de coletas dos isolados

Foram analisados um total de 86 isolados clínicos, oriundos de pacientes atendidos em 17 municípios de MS. A maioria deles foi proveniente de Campo Grande (61; 71%), seguido por São Gabriel do Oeste (4; 5%) e Dourados (3; 4%). Dos municípios de Anastácio, Aquidauana, Três Lagoas e Eldorado foram obtidos 2 (2%) isolados cada. Um isolado (1,2%) foi proveniente de cada município, a saber: Bela Vista, Camapuã, Cassilândia, Corguinho, Coxim, Deodápolis, Guia Lopes da Laguna, Maracaju, Rio Negro e Sidrolândia (Figura 4).

Do ar atmosférico, foram recuperados 67 isolados de 4 municípios e da região pantaneira (Passo do Lontra) de MS (Figura 4). Passo do Lontra é uma fazenda histórica e polo ecoturístico importante localizada no município de Corumbá. Dentre eles, a maioria foi proveniente de Campo Grande (40; 60%), seguido da zona rural de Aquidauana (19; 28 %), região urbana de Ivinhema (5; 7,5%), zona rural de Jaguari (1; 1,5%) e Passo do Lontra (2; 3%).

Figura 4 – Distribuição geográfica das cidades de origem dos 153 isolados de *Aspergillus* spp. no estado de Mato Grosso do Sul.



## 8.2 Tipos de amostras biológicas dos isolados clínicos

Os isolados clínicos foram, majoritariamente, provenientes de amostras de escarro (51/86; 59,3%), seguidos de aspirado traqueal (23/86; 26,74%), líquido pleural (3/86; 3,5%), LBA (1/86; 1,16%), fragmento pleural (1/86; 1,16%) e por fim, de amostras não respiratórias (7/86; 8,14%).

Entre os isolados de *A. fumigatus* ( $n = 50$ ) a maioria foi proveniente de escarro (19/50; 38%), seguido de aspirado traqueal (8/50; 16%), LBA (1/50; 2%) e amostras não respiratórias (4/50; 8%).

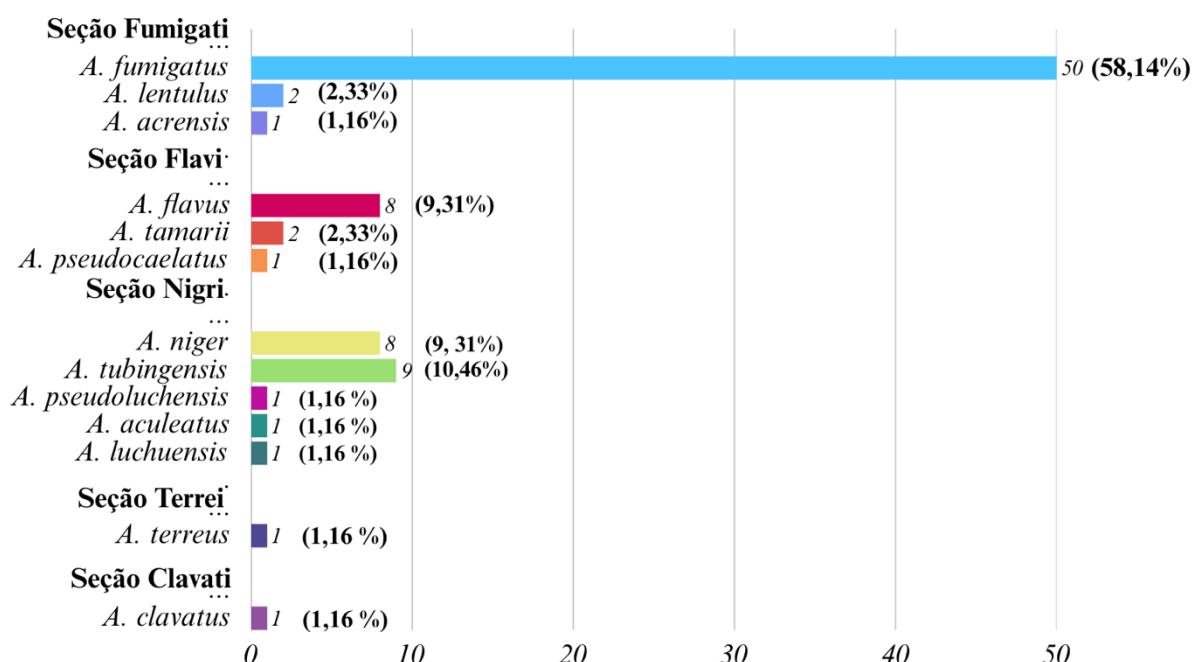
## 8.3 Distribuição das espécies

As espécies foram definidas para 151 dos 153 isolados, englobando clínicos e ambientais (Apêndice 2).

Os 86 isolados clínicos foram distribuídos em 5 seções, a saber: Fumigati (53/86; 62%), Nigri (20/86; 23%), Flavi (11/86; 13%), Terrei (1/86; 1%) e Clavati (1/86; 1%).

O sequenciamento gênico evidenciou as seguintes espécies dentre os isolados clínicos: *A. fumigatus* (50/86; 58,14%), *A. lentulus* (2/86; 2,33%) e *A. acrensis* (1/86; 1,16%) da seção Fumigati; *A. flavus* (8/86; 9,31%), *A. tamarii* (2/86; 2,33%) e *A. pseudocaelatus* (1/86; 1,16%) da seção Flavi; *A. tubingensis* (9/86; 10,46%), *A. niger* (8/86; 9,31%), *A. aculeatus* (1/86; 1,16%), *A. luchuensis* (1/86; 1,16%) e *A. pseudoluchensis* (1/86; 1,16%) da seção Nigri; *A. terreus* (1/86; 1,16%) da seção Terrei e *A. clavatus* (1/86; 1,16%) da seção Clavati, como demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Distribuição das espécies entre 86 isolados clínicos de *Aspergillus* spp. provenientes do estado de Mato Grosso do Sul (2022)

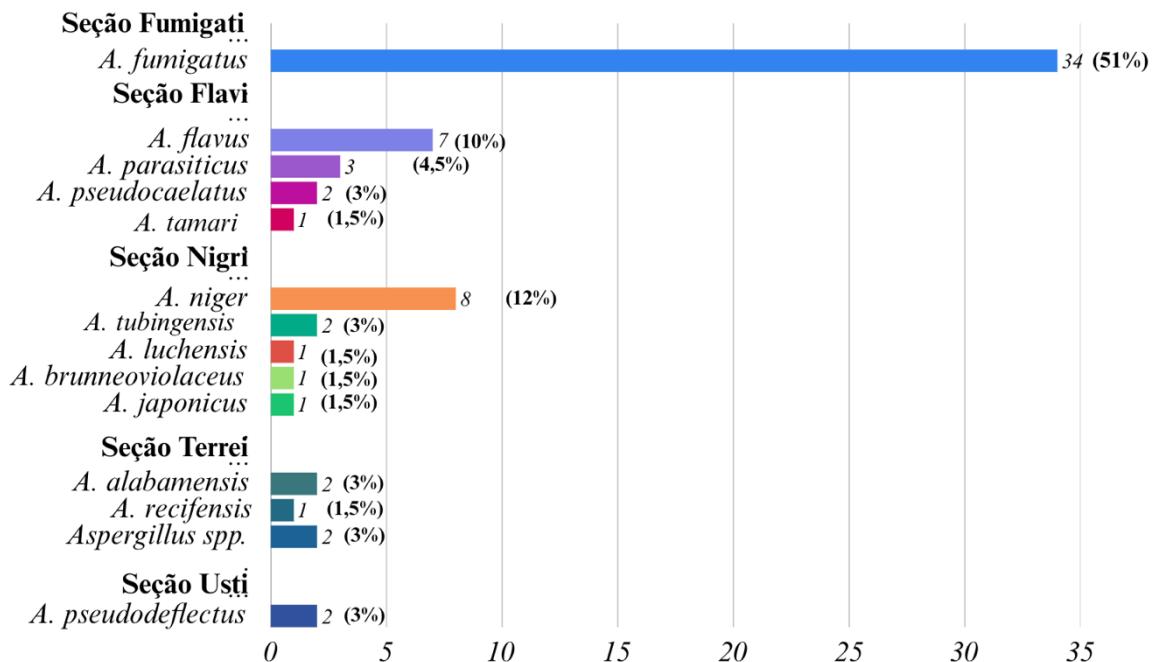


Os 67 isolados ambientais foram distribuídos em 5 seções: Fumigati (34/67; 51%), Nigri (13/67; 19%), Flavi (13/67; 19%), Terrei (5/67; 8%) e Usti (2/67; 3%).

O sequenciamento gênico evidenciou as seguintes espécies dentre os isolados ambientais: *A. fumigatus* (34/67; 51%), única na seção Fumigati; *A. flavus* (7/67; 10%), *A. parasiticus* (3/67; 4,5%), *A. pseudocaelatus* (2/67; 3%), *A. tamarii* (1/67; 1,5%) da seção Flavi; *A. niger* (8/67; 12%), *A. tubingensis* (2/67; 3%), *A. brunneoviolaceus* (1/67; 1,5%), *A. japonicus* (1/67; 1,5 %) e *A. luchensis* (1/67; 1,5%)

da seção Nigri; *A. alabamensis* (2/67; 3%), *A. recifensis* (1/67; 1,5%) e dois (2/67; 3%) isolados nos quais a espécie ainda não foi definida da seção Terrei; *A. pseudodeflectus* (2/67; 3%) da seção Usti, como consta na Figura 6.

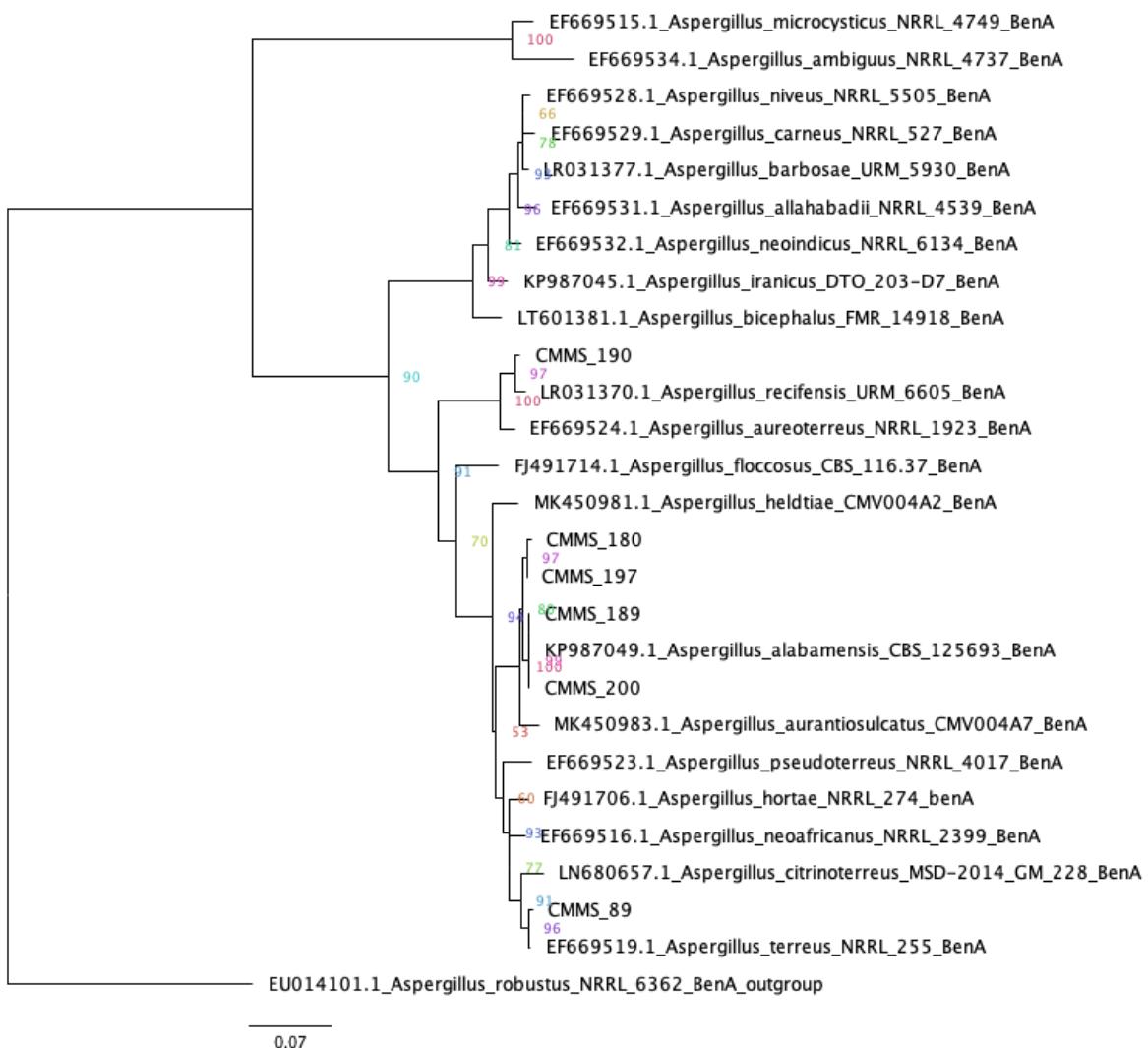
Figura 6 – Distribuição das espécies de 67 isolados ambientais de *Aspergillus* spp. provenientes do estado de Mato Grosso do Sul (2022-2024)



A relação filogenética entre os 5 isolados ambientais da seção Terrei, pode ser verificada pela Figura 7, com destaque para dois isolados (CMMS 180 e CMMS 197) que se agruparam separadamente dos demais e, portanto, permanecem sem identificação de espécie.

As árvores filogenéticas das demais espécies constam nos Apêndices numerados de 3 a 7.

Figura 7 – Análise filogenética de 5 isolados clínicos e ambientais da seção Terrei, com base no gene da  $\beta$ -tubulina, identificados pelo acrônimo CMMS



#### 8.4 Resistência a antifúngicos

Foram realizados testes de sensibilidade para os 153 isolados de *Aspergillus* spp., frente aos 5 triazólicos. Os valores de CIM para cada isolado, individualmente, estão relatados no Apêndice 2. A distribuição das CIMs por espécie está apresentada na Tabela 13. Os valores de moda,  $\text{CIM}_{50}$ ,  $\text{CIM}_{90}$  e intervalo para as espécies mais frequentes estão descritos na Tabela 14.

Dentre 84 isolados de *A. fumigatus*, para 7 os valores de CIM dos triazólicos ficaram acima dos pontos de corte. Dentre estes, um isolado clínico (CMMS 154) resistente a VOR (4 mg/L) e ITC ( $> 16$  mg/L), um isolado ambiental (CMMS 321) resistente a POS (8 mg/L) e ITC ( $> 16$  mg/L) e 5 isolados ambientais com altos CIMs

para tebuconazol (8 mg/L). A taxa de resistência para isolados clínicos foi de 2% (1/50) e para isolados ambientais de 6% (2/34) (considerando os dados de microssatélite descritos no item 8.6 a seguir). Os valores de CIM<sub>50</sub> e intervalo das CIM para os 84 isolados foram respectivamente 0,5 e 0,03–4 mg/L para VOR; 0,12 e 0,015–8 mg/L para POS; 0,25 e 0,015–>16 mg/L para ITC; 1 e 0,03–8 mg/L para TEB; 0,5 e 0,06–2 mg/L para ISA. Os resultados para os 3 isolados de outras espécies da seção Fumigati, todos de origem clínica, mostraram altas CIMs: TEB (> 16 mg/L) para *A. acrensis*, ISA (2 e 8 mg/L) e VOR (4 mg/L) para os dois *A. lentulus* (CMMS 51, CMMS 54).

Entre os 15 isolados de *A. flavus*, 1 de origem clínica (7%) foi resistente a ITC (> 16 mg/L). Os valores de CIM<sub>50</sub> e intervalo das CIM foram respectivamente 0,5 e 0,12–1 para VOR; 0,06 e 0,03–0,25 para POS; 0,06 e 0,015–16 mg/L para ITC; 0,5 e 0,03–2 mg/L para TEB; 0,5 e 0,12–1 mg/L para ISA.

Dentre os 16 isolados de *A. niger*, dois de origem clínica (12,5%) apresentaram perfil *non-wild type* para ITC (4 e 16 mg/L). Os valores de CIM<sub>50</sub> e os intervalos das CIM foram, respectivamente, 1 e 0,5–1 mg/L para VOR; 0,12 e 0,06–0,25 mg/L para POS; 0,5 e 0,03–16 mg/L para ITC; 1 e 0,03–2 mg/L para TEB; e 0,5 e 0,12–1 mg/L para ISA. Os resultados obtidos para as demais espécies da seção Nigri mostraram 11 isolados de *A. tubingensis*, para os quais, dois clínicos e um ambiental, foram encontrados altos valores de CIM para ITC (8–16 mg/L). Os valores de CIM<sub>50</sub> e intervalo das CIM foram, respectivamente, 1 e 0,12–2 mg/L para VOR; 0,12 e 0,03–0,25 mg/L para POS; 0,5 e 0,015–16 mg/L para ITC; 2 e 0,03–4 mg/L para TEB; e 0,5 e 0,25–2 mg/L para ISA. Além disso, foi registrado um isolado de *A. pseudoluchuensis* associado a alto valor de CIM para ITC (16 mg/L).

Tabela 13 – Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 4 fármacos e 1 agrotóxico triazólico, frente a 153 isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. (MS, 2022–2024)

Espécie (n)	Antifúngico	Nº de isolados na CIM (mg/L) de										
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	≥16
<i>A. acrensis</i>	Voriconazol							1				
	Posaconazol						1					
	Itraconazol			1								
	(1) Tebuconazol											1
	Isavuconazol								1			
<i>A. aculeatus</i>	Voriconazol		1									
	Posaconazol	1										
	Itraconazol			1								
	(1) Tebuconazol			1								
	Isavuconazol				1							
<i>A. alabamensis</i>	Voriconazol				1		1					
	Posaconazol				2							
	Itraconazol				2							
	(2) Tebuconazol					1	1					
	Isavuconazol						1	1				
<i>Aspergillus</i> spp.	Voriconazol					1		1				
	Posaconazol			1	1							
	Itraconazol					1	1					
	(2) Tebuconazol							2				
	Isavuconazol					1	1					
<i>A. brunneoviolaceus</i>	Voriconazol		1									
	Posaconazol		1									
	Itraconazol		1									
	(1) Tebuconazol		1									
	Isavuconazol				1							
<i>A. clavatus</i>	Voriconazol											
	Posaconazol											
	Itraconazol						1					
	(1)* Tebuconazol											
	Isavuconazol								1			

Espécie	Antifúngico	Nº de isolados na CIM (mg/L) de										
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	≥16
<i>A. flavus</i> (15)	Voriconazol				3	2	7	3				
	Posaconazol		6	5	3	1						
	Itraconazol	2	4	2	2	3	1					1
	Tebuconazol		4		1			2	3	5		
	Isavuconazol				1	5	5	4				
<i>A. fumigatus</i> (84)	Voriconazol		2		4	19	37	21			1	
	Posaconazol	10	9	16	32	16						1
	Itraconazol	12	10	9	8	22	16	5				2
	Tebuconazol		19		4			3	21	27	5	5
	Isavuconazol				1		18	30	30	5		
<i>A. japonicus</i> (1)	Voriconazol						1					
	Posaconazol				1							
	Itraconazol				1							
	Tebuconazol				1							
	Isavuconazol										1	
<i>A. lentulus</i> (2)	Voriconazol										2	
	Posaconazol		1	1								
	Itraconazol		1					1				
	Tebuconazol		1							1		
	Isavuconazol									1	1	
<i>A. luchuensis</i> (2)	Voriconazol							2				
	Posaconazol		1			1						
	Itraconazol	1							1			
	Tebuconazol				1						1	
	Isavuconazol									2		
<i>A. niger</i> (16)	Voriconazol					1	9	4				
	Posaconazol			6	5	3						
	Itraconazol	1	2		6	2	2			1		1
	Tebuconazol		1	1	2				6	6		
	Isavuconazol				1		8	6	1			

Espécie	Antifúngico	Nº de isolados na CIM (mg/L) de										
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	≥16
<i>A. parasiticus</i> (3)	Voriconazol				1	1	1					
	Posaconazol	1		2								
	Itraconazol	1			1	1						
	Tebuconazol							2	1			
	Isavuconazol						2	1				
<i>A. pseudocaelatus</i> (3)	Voriconazol				2	1						
	Posaconazol	3										
	Itraconazol	1	1			1						
	Tebuconazol		1				1		1			
	Isavuconazol			2		1						
<i>A. pseudodeflectus</i> (2)	Voriconazol							1	1			
	Posaconazol		1						1			
	Itraconazol						1			1		1
	Tebuconazol					1		1	1			
	Isavuconazol				1			1				
<i>A. pseudoluchensis</i> (1)	Voriconazol						1					
	Posaconazol			1								
	Itraconazol											1
	Tebuconazol				1							
	Isavuconazol							1				
<i>A. recifensis</i> (1)	Voriconazol				1							
	Posaconazol	1										
	Itraconazol				1							
	Tebuconazol								1			
	Isavuconazol						1					
<i>A. tamarii</i> (3)	Voriconazol					1	1	1				
	Posaconazol	1	1			1						
	Itraconazol		2	1								
	Tebuconazol	1							1	1		
	Isavuconazol					1	2					

Espécie	Antifúngico	Nº de isolados na CIM (mg/L) de										
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	≥16
<i>A. terreus</i>	Voriconazol								1			
	Posaconazol					1						
	Itraconazol								1			
	(1) Tebuconazol									1		
	Isavuconazol						1					
<i>A. tubingensis</i>	Voriconazol				2		2	5	2			
	Posaconazol		1	3	5	2						
	Itraconazol	2		1	1		3	1			1	2
	(11) Tebuconazol		1	1				1	3	5		
	Isavuconazol					1	5	3	2			

Legenda: cor laranja; área de resistência clínica segundo breakpoint; verde: área de isolados *non-wild type* segundo ECOFFS; Azul: área de valores altos de CIMs para tebuconazol

\* Alguns testes de sensibilidade não foram realizados para esta espécie.

Tabela 14 – Síntese dos valores de concentração inibitória mínima frente a 4 triazóis clínicos e 1 fungicida agrícola, de 153 isolados, clínicos e ambientais, de *Aspergillus* spp. (MS, 2022–2024)

Espécie	Antifúngico	Moda	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Intervalo
<i>A. flavus</i> (15)	Voriconazol	0,5	0,5	1	0,12–1
	Posaconazol	0,3	0,06	0,12	0,03–0,25
	Itraconazol	0,03	0,06	0,5	0,015–16
	Tebuconazol	2	0,5	2	0,03–2
	Isavuconazol	0,5	0,5	1	0,12–1
<i>A. fumigatus</i> (84)	Voriconazol	0,5	0,5	1	0,03–4
	Posaconazol	0,12	0,12	0,25	0,015–8
	Itraconazol	0,25	0,25	0,5	0,015–>16
	Tebuconazol	2	1	2	0,03–8
	Isavuconazol	1	0,5	1	0,06–2
<i>A. niger</i> (16)	Voriconazol	0,5	1	1	0,5–1
	Posaconazol	0,06	0,12	0,25	0,06–0,25
	Itraconazol	0,12	0,5	4	0,03–16
	Tebuconazol	2	1	2	0,03–2
	Isavuconazol	0,5	0,5	1	0,12–1
<i>A. tubingensis</i> (11)	Voriconazol	1	1	2	0,12–2
	Posaconazol	0,12	0,12	0,12	0,03–0,25
	Itraconazol	0,5 e 16	0,5	16	0,015–16
	Tebuconazol	4	2	4	0,03–4
	Isavuconazol	0,5	0,5	1	0,25–2

#### 8.4.1 Resistência a tebuconazol

Após os resultados do TSA notou-se que dois isolados clínicos da seção Fumigati eram resistentes. Até aquele momento, a identificação da espécie ainda não tinha sido concluída. Os registros do isolados foram analisados para saber de quais pacientes os isolados foram provenientes. Assim, o isolado previamente mencionado como CMMS 51 foi obtido do nomeado Paciente I, enquanto o isolado CMMS 154 foi

proveniente do nomeado Paciente II. Após o diagnóstico clínico e o sequenciamento genético, confirmou-se que o Paciente I (CMMS 51) apresentava colonização por *A. lentulus*, enquanto o Paciente II (CMMS 154) foi diagnosticado com APC causada por *A. fumigatus*. Ambos residem na capital Campo Grande, a aproximadamente 3 km de distância um do outro. Com o objetivo de ampliar a busca por isolados resistentes, foi realizada uma coleta extra no primeiro semestre 2024 nos endereços desses dois pacientes. Assim, as coletas ambientais foram conduzidas com 15 dias de intervalo, realizadas em frente às residências e em praças públicas próximas. Nessas amostragens, foram isolados os cinco *A. fumigatus* com altos CIMs para TEB (CMMS 340, 341, 342, 343, 344). A coleta ocorreu como descrito no ítem 3.6.

### **8.5 Mutações em *cyp51A* em isolados resistentes a triazóis**

A investigação do mecanismo de resistência por mutações em *cyp51A* foi realizada apenas nos isolados de *A. fumigatus* resistentes a triazóis clínicos e agrícola (Tabela 3). Todos os cinco isolados ambientais resistentes ao TEB apresentaram a mutação não silenciosa M172V, além de quatro mutações silenciosas (L358L, C454C, G497G e G89G). O isolado CMMS 154 do Paciente II, com aspergilose pulmonar crônica, apresentou mutação G138S. O isolado CMMS 321, de origem ambiental de área rural indígena, apresentou mutação G54A.

**Tabela 15 – Mutações, valores de CIM e origem dos sete isolados clínicos e ambientais resistentes**

ID	VOR	ISA	ITC	POS	TEB	Mutações	Origem
<b>CMMS</b>							
154	4	2	> 16	0,03	4	G138S	Clínica (Do Paciente II)
321	1	1	> 16	8	0,5	G54A	Ambiental
340	1	1	1	0,25	8		Ambiental
341	0,5	0,25	1	0,25	8	M172V	Coletados próximo a residência do Paciente I (CMMS 51)
342	1	1	0,5	0,25	8	L258L C454C	
343	0,5	0,25	1	0,25	8	G497G G89G	Ambiental
344	0,5	0,25	0,5	0,25	8		Coletados próximo a residência do Paciente II (CMMS 154)

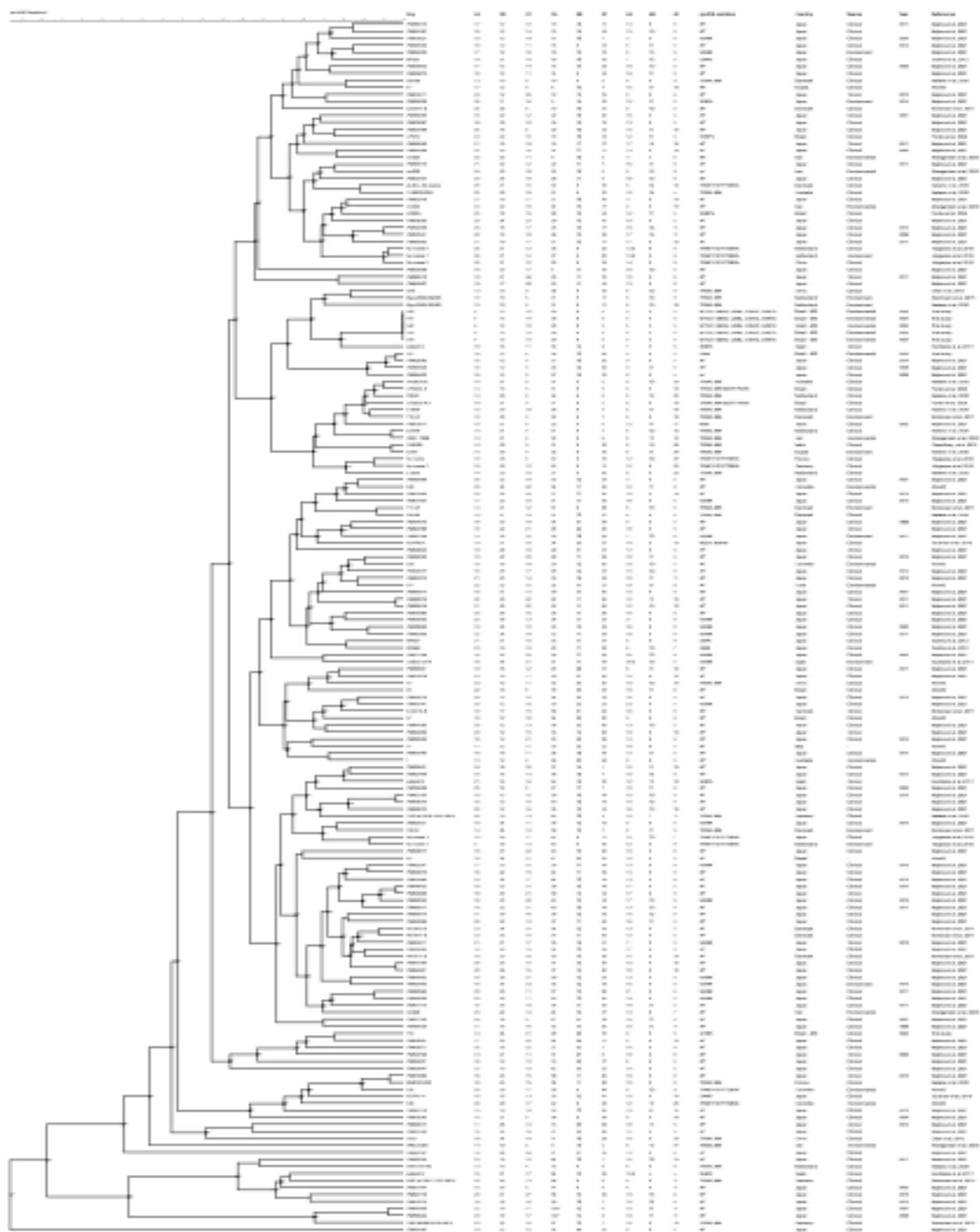
## 8.6 Relação genética entre isolados resistentes a triazóis

Os 5 isolados resistentes ao TEB estão agrupados, indicando alto grau de similaridade genética (Figura 8), com base nas repetições curtas em *tandem*. Todos compartilham o mesmo clado que inclui um isolado da Espanha, que possui mutações *cyp51A-3SNIPs*. O isolado espanhol está identificado no dendrograma como Paciente C, tal qual no estudo de origem (Escribano *et al.*, 2011).

O isolado CMMS 154, do Paciente II, agrupou-se distante dos resistentes ao TEB, posicionando-se próximo a um isolado *wild-type* (WT) descrito por Majima *et al.* (2021). De forma semelhante, o isolado ambiental CMMS 321 também se agrupou de maneira afastada dos demais, mas próximo a outro isolado WT do Japão, reportado no mesmo estudo.

Para melhor visualização no dendrograma, os isolados CMMS 340 a 344 foram grifados em laranja, o CMMS 321 em verde e CMMS 154 em lilás.

Figura 8 – Relação genética de 7 isolados de *A. fumigatus* resistentes a triazóis, com base na análise de 9 marcadores de microssatélite



## 8.7 Mutações em *cyp51A* em isolados resistentes a tebuconazol

A técnica de CRISPR-Cas9 foi realizada a fim de compreender se o conjunto de mutações (M172V, L258L, C454C, G497G G89G) ou a mutação M172V, isoladamente, eram responsáveis pela resistência ao TEB verificada em 5 isolados ambientais.

Os resultados dos testes de sensibilidade, realizados antes e depois da transformação, são apresentados na Tabela 16. O isolado transformante *cyp51A<sup>WT</sup>*, derivado do isolado parental CMMS 340, continuou resistente. Para um dos transformantes (AfS35<sup>340</sup>), derivado de cepa padrão AfS35, observou-se aumento no CIM de TEB.

Tabela 16 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM, mg/L), de dois fármacos e um agrotóxico triazólico, frente a 5 isolados transformantes e 2 parentais, com respectivos genótipos

Isolado	Genótipo	Tebuconazol	Voriconazol	Itraconazol
Parental 340	<i>cyp51A<sup>340</sup></i>	8	2	1
<i>cyp51A<sup>340</sup></i>	$\Delta cyp51A^{340} :: cyp51A^{340} :: hph$	8	2	1
<i>cyp51A<sup>WT</sup></i>	$\Delta cyp51A^{340} :: cyp51A^{WT} :: hph$	8	2	1
Parental AfS35	<i>cyp51A<sup>WT</sup></i>	2	1	0.5
AfS35 <sup>WT</sup>	$\Delta cyp51A^{WT} :: cyp51A^{WT} :: hph$	2	NT	NT
AfS35 <sup>340</sup>	$\Delta cyp51A^{WT} :: cyp51A^{340} :: hph$	4	NT	NT
AfS35 <sup>M172V</sup>	$\Delta cyp51A^{WT} :: cyp51A^{M172V} :: hph$	2	NT	NT

NT - Não testado.  $\Delta$  deleção. Dois pontos (::) Inserção. hph: gene de resistência a higromicina

Para a melhor visuzalizar dos resultados dos testes de sensibilidade realizados por microdiluição em caldo (Tabela 16) foi, também, realizado um teste de disco-difusão. Dois isolados recuperados do transformante AfS35<sup>340</sup> (AfS35<sup>340-1</sup> e AfS35<sup>340-5</sup>) foram analisados. Os achados (Tabela 17) corroboraram os resultados anteriores, evidenciando leve diminuição da sensibilidade ao TEB no isolado transformante em comparação com o isolado parental AfS35.

Tabela 17 – Diâmetros dos halos de disco-difusão (mm) para os isolados parentais e transformantes de *A. fumigatus* sob exposição a tebuconazol.

Genótipo	24 h	Média	40 h	Média	48 h	Média
AfS35	34	33,33	35	35	34	34,33
	32		35		33	
	34		35		36	
AfS35 <sup>340-1</sup>	29	30,5	30	31,5	30	31
	30		30		30	
AfS35 <sup>340-5</sup>	32	30,5	33	31,5	32	31
	31		33		32	
	31		32		31	
	32		33		31	

## 9. DISCUSSÃO

A distribuição das seções e espécies de *Aspergillus* nos 86 isolados clínicos corrobora a dominância de *Fumigati* (62%), sendo *A. fumigatus* (50/86; 58,14%) a quase totalidade dos isolados dentro seção. Este achado é amplamente documentado em estudos epidemiológicos em todo o mundo, os quais consistentemente identificam essa espécie como o principal agente etiológico da AI (Gonzalez-Lara *et al.*, 2019; Patterson *et al.*, 2016; Treviño-Rangel *et al.*, 2021; Vidal-Acuña *et al.*, 2019). Sua alta frequência é atribuída a uma série de fatores de virulência, incluindo a produção de conídios pequenos, capazes de penetrar profundamente no trato respiratório e, ainda, sua facilidade de dispersão no ar atmosférico. Outras características relevantes são a termotolerância e a capacidade de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, mediada pela formação de biofilmes, metabólitos secundários e enzimas extracelulares hidrolíticas (Latgé, 1999).

A preocupação com *A. fumigatus* tem sido intensificada pela crescente emergência de resistência a antifúngicos, particularmente aos azóis, que são a primeira linha de tratamento para aspergilose invasiva (Lockhart; Chowdhary; Gold, 2023). Em nosso estudo foi verificada a taxa de resistência em *A. fumigatus* (4%), ao menos um triazól, nos conjuntos de 153 isolados clínicos e ambientais. Analisando-se apenas os isolados clínicos, a frequência encontrada foi de 2% (1/50), valor próximo aos descritos em estudos brasileiros recentes, como os de Pontes *et al.*, 2024 ( $\approx 2\%$ ), Reichert-Lima *et al.*, 2018 ( $\approx 2\%$ ), Pontes *et al.*, 2020 ( $\approx 1\%$ ) e Negri *et al.*, 2017 (1,8%). Contrariamente, estas frequências se mantém abaixo daquelas observadas em estudos internacionais, como o de Treviño-Rangel *et al.* (2021) no México, que reportou entre 6,1% a 10,2% de isolados resistentes, dependendo do azol avaliado, e o estudo global do *Antifungal Surveillance Program* (SENTRY), que registrou 9,1% (Pfaller, M. A.; Carvalhaes; Castanheira, 2023). É importante notar que, na maioria desses estudos, a amostra biológica mais frequente foi escarro indicando presença de resistência em isolados coletados do sítio topográfico de eleição para aspergilose.

Em relação aos isolados ambientais de *A. fumigatus* foi encontrada uma taxa de (6%; 2/34), considerando que os cinco isolados com altos CIMs para o TEB tem alta similaridade genética e foram considerados como um único genótipo. Pontes *et al.* (2024) analisou isolados de ar atmosférico hospitalar no Brasil e encontrou taxa de  $\approx 1\%$ , Cao *et al.*, 2021 em isolados do solo China encontrou descreveu uma taxa de

8,6% em isolados do solo e Resendiz-Sharpe *et al.* (2021) descreveu taxas que variaram entre  $\approx 7$  a 10% em isolados do México, Paraguai e Peru.

Um percentual de resistência em isolados ambientais acima de 10% é citado como indicativo de alta prevalência (Verweij *et al.*, 2015) e serve como um alerta para a implementação de uma vigilância ambiental constante. Tal medida é crucial para detectar, precocemente, a circulação destes fungos resistentes, em zonas rurais e urbanas, e comunicar os profissionais da saúde e comunidades médicas do Estado do Mato Grosso do Sul sobre possível emergência de resistência clínica. Cao, *et al.* (2020) demonstraram em cinco anos um crescimento de isolados resistentes Cao et que foi de 4,7% a 23,1% em quatro anos, demonstrando que o perfil epidemiológico pode mudar, especialmente em regiões que existe uso de fungicidas.

A prevalência de isolados resistentes a azóis tem crescido globalmente e está relacionada a pior prognóstico clínico e uma mudança epidemiológica que poderá ocorrer nas próximas décadas no Brasil (Cuypers *et al.*, 2025; Lestrade *et al.*, 2020; Pfaller; Carvalhaes; Castanheira, 2023; Risum *et al.*, 2022). Para investigar a rota ambiental na resistência dos isolados clínicos, foi realizada coletas de ar atmosférico nas proximidades das residências de dois pacientes e, de fato, a recuperação de isolados resistentes a TEB foi observada.

Os pacientes I e II residiam em uma área periférica urbana. Não foram identificadas fontes evidentes de exposição direta a fungicidas agrícolas, como jardins ornamentais ou plantações, tornando a origem desses isolados incerta. Os isolados foram obtidos em dias distintos e a cerca de 3 km de distância entre si. Considerando que a aspergilose é tipicamente adquirida pela inalação de esporos presentes no ar, a presença e a circulação desses isolados resistentes nas proximidades de pacientes vulneráveis representam uma preocupação relevante de saúde pública, além disso estudos anteriores já demonstraram que isolados clínicos podem adquirir resistência no ambiente antes mesmo de infectar pacientes sem histórico de uso de azóis (Buil *et al.*, 2016; Rhodes *et al.*, 2022; Snelders *et al.*, 2009), e o padrão observado aqui parece seguir a mesma tendência. Assim, a resistência ao TEB se desenvolveu ambientalmente, o que poderia consequentemente levar a resistência cruzada a outros triazóis como VOR que, junto ao TEB possui cadeia lateral curta e possui a molécula mais semelhante a esse fungicida. (Mullins *et al.*, 2011).

Tebuconazol possui meia-vida longa e, durante a pulverização, mais da metade da dose aplicada pode ser perdida, permitindo que as moléculas se dispersem pelo ar

e atinjam áreas distantes do ponto original de aplicação (Druart *et al.*, 2011). Os conídios de *Aspergillus*, por sua vez, também podem se disseminar a longas distâncias, dependendo das condições climáticas (Cho *et al.*, 2005). Na região Centro-Oeste do Brasil, onde se localiza o estado de MS, já foi relatada contaminação de águas com pesticidas, incluindo o TEB, o que reforça indícios de uso excessivo desses compostos (Finoto Viana *et al.*, 2023; Laabs *et al.*, 2002).

Os cinco isolados resistentes ao TEB e o *A. fumigatus* clínico resistente foram resgatados em meio urbano. Um estudo de Sewell *et al.* (2019) encontrou mais isolados ambientais de *A. fumigatus* resistentes em área urbana (13.8%) que rural (1.1%). Dentre as suposições de nexo causal, uma é que os grandes centros são locais de convergência e através da própria atividade do ser humano, isolados de diferentes genótipos podem ser trazidos de regiões mais afastadas até as cidades. Uma vez introduzidos no meio urbano, existe a oportunidade de alelos de resistência integrar-se a novos *backgrounds* genéticos por meio de recombinação, gerando uma alta diversidade genética e elevando o potencial evolutivo. Outra suposição é a presença e distribuição de culturas hortícolas nas cidades, como flores, plantas ornamentais e vegetais, que necessitam do uso de fungicidas.

Embora a seleção *in vitro* de isolados resistentes já tenha sido documentada, os mecanismos que sustentam a resistência em isolados ambientais tendem a ser mais complexos (Cui *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2017). Esse cenário é agravado pelo uso inadequado de pesticidas em países em desenvolvimento, onde a regulamentação é frequentemente insuficiente, a fiscalização limitada e o emprego de compostos obsoletos são comuns (European Parliament *et al.*, 2021).

Dentre o conjunto de isolados clínicos e ambientais, o valor de MIC<sub>50</sub> para TEB em *A. fumigatus* (1 mg/L) está abaixo de valores (2 e 4 mg/L) de estudos anteriores (Zhou *et al.*, 2021, 2022). Contudo, estes focaram em *A. fumigatus* obtidos de estufas e ambientes controlados com alta exposição a fungicidas, o que difere de nossos isolados, que foram encontrados distantes de ambientes com alta pressão seletiva e evidenciam o potencial de dispersão destes fungos.

Entre os isolados clínicos estudados da seção Fumigati, 6% (3/53; IC 95% 0,0%–12,02%) são espécies crípticas, sendo dois identificados como *A. lentulus* e um como *A. acrenensis*. Esta proporção é comparável a descrita por Imbert *et al.* (2020) ( $p = 0,7$ ) (364/7918; IC 95% 4,14%–5,04%) e ressaltam a importância de métodos moleculares na rotina laboratorial para o diagnóstico precoce (Alcazar-Fuoli *et al.*,

2008; Imbert *et al.*, 2018), pois estas espécies possuem um perfil de sensibilidade diferente de *A. fumigatus* e são associadas à resistência a triazóis e AmB, que podem impactar no desfecho clínico dos pacientes (Watanabe; Yaguchi; Hirose, 2021; Zbinden *et al.*, 2012).

As espécies pertencentes à seção Nigri representaram proporção significativa dos isolados clínicos obtidos neste estudo (20/86; 23,25%), sendo identificadas principalmente como *A. tubingensis* (9/86; 10,46%) e *A. niger* (8/86; 9,31%), além de outras espécies crípticas menos frequentes, como *A. aculeatus*, *A. luchuensis* e *A. pseudoluchuensis*. A predominância de *A. niger* e *A. tubingensis* configurando uma das espécies mais comum dentro da seção está em consonância com estudos prévios (Gonzalez-Lara *et al.*, 2019; Howard, Susan J. *et al.*, 2011; Treviño-Rangel *et al.*, 2021).

Embora *A. niger* seja classicamente reconhecido por sua ampla distribuição ambiental, ele também está envolvido em diferentes formas clínicas de aspergilose, incluindo aspergilose pulmonar, otomicose e infecções sinusais. Casos de aspergilose invasiva por *A. niger* têm sido relatados, especialmente em pacientes imunocomprometidos, embora com menor frequência e gravidade quando comparado a *A. fumigatus* (Fiema *et al.*, 2022; Person *et al.*, 2010; Vermeulen *et al.*, 2014).

Entre as espécies dos isolados clínicos, *A. tubingensis* foi relatada como agente de diversas formas clínicas da aspergilose, incluindo a invasiva (Born *et al.*, 2022; Gautier *et al.*, 2016; Hase *et al.*, 2022; Janani *et al.*, 2024). No Brasil, foi relatado um caso de aspergilose causada por *A. tubingensis* associada à influenza (Saad *et al.*, 2025).

Dois isolados clínicos de *A. niger* (2/16; 12,5%) apresentaram perfil *non-wild type* para ITC (MIC, 4 e 16 mg/L) e valores elevados também foram observados entre três isolados de *A. tubingensis* (MIC, 8–16 mg/L). Esses achados vão ao encontro com evidências crescentes de que algumas espécies da seção Nigri apresentam resistência intrínseca ou adquirida ao ITC (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2009; Howard, S. J.; Pasqualotto; Denning, 2010). Alguns estudos relataram uma maior proporção de resistência em *A. tubingensis* comparado as outras espécies dentro da sua seção, como demonstrado em estudo de Howard *et al.* (2011), em que 90% dos isolados dessa espécie apresentaram resistência ao ITC em comparação com apenas 33% dos isolados *A. niger*, e em estudo de Takeda *et al.* (2023) onde todos os isolados de *A. tubingensis* estudados tinham altas CIMs a ITC ou VOR. Além disso, *A. tubingensis*

mostrou-se menos sensível ao VOR em relação às demais espécies da seção Nigri (Hashimoto *et al.*, 2017; Howard, Susan J. *et al.*, 2011). Não foi encontrada diferença estatística entre a proporção de resistentes de *A. niger* (1/16; IC 95% 0,16 - 30,2%) e de *A. tubingensis* (3/11; 6,0 - 61,0%) ( $p = 0,27$ ) em nosso estudo.

Dentre os isolados clínicos analisados, *A. flavus* configurou a terceira espécie mais frequente ( $n = 8$ ; 9,31%), juntamente com *A. niger* ( $n = 8$ ; 9,31%). Globalmente, *A. flavus* é o segundo agente etiológico mais comum da aspergilose invasiva (AI), responsável por aproximadamente 15–20% dos casos, ficando atrás apenas de *A. fumigatus*, especialmente, nas formas extrapulmonares (Krishnan; Manavathu; Chandrasekar, 2009; Rudramurthy *et al.*, 2019). No entanto, *A. flavus* emergiu como um patógeno predominante em pacientes com rinosinusite e ceratite fúngica (Yu *et al.*, 2005). Em países com condições áridas e secas, como grande parte do Oriente Médio, África e Sudeste Asiático, *A. flavus* é o patógeno predominante, respondendo por 50-80% dos casos de sinusite, ceratite e infecções cutâneas em humanos. (Krishnan; Manavathu; Chandrasekar, 2009).

Quando considerados em conjunto os isolados clínicos e ambientais de *A. flavus*, observou-se uma frequência de resistência aos triazóis de 7% (1/15; IC 95% 0,17 - 31,9%). Comparando com Pfaller, *et al.*, (2011), que reportaram 0,8% (1/120; IC 95% 0,02 - 4,6%) de isolados *non-wild type* da seção Flavi para o ITC, não houve diferença estatística significativa ( $p=0,21$ ). Esses dados vão de encontro a Rudramurthy *et al.* (2019), que classificam a resistência em *A. flavus* como um evento raro.

As espécies crípticas da seção Flavi têm pouca notoriedade como agente da aspergilose, mas ampla relevância no meio agrícola, devido a capacidade de produzir aflatoxinas que podem infestar produtos alimentícios e causar perdas econômicas. Há relatos documentados de infecções causadas por *A. tamarii*, como a descrição de um caso de aspergilose cutânea primária em um recém-nascido de muito baixo peso (Kimura *et al.*, 2018) e outro estudo no sul da Índia que identificou esta espécie em seis pacientes de ceratite fúngica. Assim, *A. tamarii* embora pouco frequente, pode atuar como patógeno humano (Homa *et al.*, 2019).

A frequência de *A. terreus* entre os isolados clínicos foi baixa, representando 1,2% da amostra (1/86; IC 95% 0,03% – 6,3%), divergindo significativamente de outros centros que a relatam como uma das espécies mais comuns em casos de AI. Foram observadas diferenças estatísticas em comparação aos dados de Baddley *et al.*

(2003), que reportaram 12,0% (104/869; IC 95% 9,9% - 14,3%;  $p=0,0008$ ), Franconi *et al.* (2024), com 10,6% (119/1126; IC 95% 8,8% - 12,5%;  $p=0,0021$ ), e Gonzalez-Lara *et al.* (2019), com 14,0% (6/43; IC 95% 5,3% - 28,0%;  $p=0,0056$ ). Embora seja reconhecida por sua resistência intrínseca à AmB, esta espécie pode também apresentar resistência a triazóis, não confirmada neste estudo. Zoran *et al.* (2018) relataram resistência a triazóis em 5,4% dos isolados da seção Terrei, a maioria correspondendo a *A. terreus*. No mesmo estudo, as taxas de resistência variaram significativamente entre países, entre 0% na Grécia a 13,7% na Alemanha. Os autores concluíram com seus achados que a resistência é rara em espécies crípticas, mas ainda assim, denotando o achado de um *A. citrinoterreus* e um *A. alabamensis* com altas CIMs, sendo *A. alabamensis*, espécie também encontrada entre os isolados ambientais deste estudo ( $n = 2$ ; 3%).

O sequenciamento da  $\beta$ -tubulina alinhado à filogenia identificou um isolado de *A. recifensis* ( $n = 1$ ; 1,5 %), também pertencente à seção Terrei. Todavia, a  $\beta$ -tubulina não pode definir com certeza as espécies de dois isolados e, para tal, será necessário o emprego de uma abordagem *multi loci*. Sem o auxílio da filogenia, também não seria possível identificar *A. acrensis*, neste estudo, e a investigação dos dois isolados de *Aspergillus* spp., pertencentes à seção Terrei se limitaria, possivelmente impedindo a descoberta futura de novas espécies ou raras, uma vez que o BLAST identificou com confiança estas espécies.

São poucos os estudos em micologia médica que utilizam a filogenia em conjunto com o sequenciamento para a identificação das espécies. Takeda *et al.* (2022) ressaltam a importância do uso do sequenciamento e citam como exemplo a seção Nigri, na qual 96,8 % das espécies analisadas foram crípticas. No entanto, não mencionam que o uso isolado de ferramentas como o BLAST pode levar à identificação equivocada. Embora o BLAST seja amplamente utilizado para a identificação de espécies, trata-se de uma ferramenta baseada em similaridade pareada, e a definição taxonômica final depende da interpretação do usuário. Entre suas principais limitações está o fato de utilizar um banco de dados sem curadoria, no qual podem ser incluídas sequências de baixa qualidade ou com classificações taxonômicas desatualizadas. Além disso, os melhores resultados apresentados pelo BLAST nem sempre correspondem às sequências mais relacionadas biologicamente, e a ferramenta não distingue, adequadamente, regiões altamente conservadas, que

tendem a ser semelhantes entre diferentes espécies, mas não indicam necessariamente identidade taxonômica (Lücking *et al.*, 2020).

A própria definição de espécies dentro do gênero *Aspergillus* é complexa. Em nosso trabalho, seguimos o consenso proposto por Visagie *et al.* (2024) que reconhece 453 espécies no gênero e atualiza o estudo anterior de Houbraken *et al.* (2020). Além disso, ao revisar a taxonomia do gênero, Visagie e colaboradores sinonimizaram 28 espécies, como *A. welwitschiae*, *A. vinaceus* e *A. chiangmaiensis*, sob o nome de *A. niger*. Ao reagrupar e reclassificar como *A. niger* alguns isolados deste estudo, anteriormente denominados *A. welwitschiae*, foi possível aprimorar os resultados de sensibilidade antifúngica e aplicar os pontos de corte disponíveis. Isso não seria viável para *A. welwitschiae*, uma vez que os documentos do EUCAST e do CLSI ainda oferecem pouquíssimos pontos de corte para espécies críticas como essa.

O estudo contribuiu para conhecimento das mutações no gene *cyp51A* relacionadas à resistência em triazóis, em espécies da seção Fumigati, no estado de MS. De modo inédito no Brasil, mutação pontual G138S foi encontrada em um isolado clínico (CMMS 154). A mutação foi consistente para resistência a ITC e POS e, embora tenha sido descrita em outros estudos, ainda não havia sido relatada no Brasil (He *et al.*, 2024; Mann *et al.*, 2003). Apesar de ser considerada mutação, tipicamente, encontrada em isolados clínicos, ela também está associada ao uso de fungicidas (Chassot *et al.*, 2008).

A mutação G54A detectada é bem conhecida em *A. fumigatus* de origem clínica. As mutações G54 por algum tempo foram associadas apenas ao uso clínico de triazóis e associadas à resistência a ITC e POS (Bustamante *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2018; Leonardelli *et al.*, 2017; Risum *et al.*, 2022). O encontro em isolado ambiental (CMMS 321) obtido em área rural, sem dados sobre atividade agrícola recente, é intrigante; porém, mutações G54 (G54W e G54E) já foram encontradas em isolados ambientais da Índia, Tanzânia e Romênia (Sharma *et al.*, 2015). Para tais isolados, altos valores de MIC de azóis, clínicos e agrícolas, além das mutações TR podem ocorrer após o uso de fungicidas agrícolas (Sharma *et al.*, 2015).

A mutação M172V, acompanhada por quatro mutações silenciosas (L358L, C454C, G497G e G89G), foi demonstrada nos cinco isolados resistentes a TEB. A mutação M172V é uma das que compõe o conjunto dos *cyp51A*-3SNIPs e 5SNIPs que, usualmente, também são acompanhadas pelas mutações silenciosas

encontradas (Garcia-Rubio *et al.*, 2018). Mutações pontuais como G54, M220 e G448, por exemplo, são frequentemente encontradas isoladamente, mas em contraste, as mutações que compõem os perfis *cyp51A*-3SNIPs e 5SNIPs costumam aparecer em combinações (Escribano *et al.*, 2011; Garcia-Rubio *et al.*, 2018). A mutação M172V foi relatada isoladamente em um isolado da Nigéria, proveniente de um canteiro de flores, que apresentou resistência a TEB e ITC (Resendiz-Sharpe *et al.*, 2021). No Brasil, um estudo anterior descreveu sete isolados clínicos contendo apenas a substituição M172V e, entre eles, seis apresentaram perfil *non wild-type* para ITC, VOR e POS, alternadamente, porém não foram determinados as CIMs de TEB (Fonseca *et al.*, 2023). Fonseca *et al.* (2023), neste mesmo estudo, descreveram um isolado portando M172V sensível aos azóis e ilustra a grande discussão sobre as mutações *cyp51A*-3SNPs e de 5SNPs, pois são encontradas tanto em isolados resistentes quanto sensíveis aos azóis, levantando questões sobre o impacto destas no resistência antifúngica (Escribano *et al.*, 2011; Garcia-Rubio *et al.*, 2018; Pontes; Arai; *et al.*, 2024; Snelders *et al.*, 2009).

A fim de compreender melhor a influência da mutação M172V e das mutações silenciosas L358L, C454C, G497G e G89G, foram realizados experimentos utilizando a técnica de CRISPR-Cas9. Demonstrou-se que essas mutações contribuem para a redução da sensibilidade ao TEB, embora de forma parcial, indicando que outros mecanismos de resistência estão presentes nestes isolados.

O Brasil é o país da América Latina com o maior número de publicações relatando mutações no gene *cyp51A* em *A. fumigatus*. A Figura 9 reúne todos os estudos realizados na América do Sul, até o momento, que descreveram mutações no gene *cyp51A* em *A. fumigatus*. Reichert-Lima *et al.* (2018) descreveram seis isolados clínicos com mutações do tipo *cyp51A*-5SNIPs. Um grupo da Universidade de Campinas (SP) publicou uma série de estudos, relatando em 2020 dois isolados clínicos com as mutações TR34/L98H/S297T/F495I (Pontes *et al.*, 2020), em 2022 um caso clínico com a mutação G448S (Pontes *et al.*, 2022). Em 2024, dois novos estudos foram publicados pelo mesmo grupo, um descrevendo seis isolados com mutações *cyp51A*-SNIPs e N248K e outro relatando dois isolados clínicos com TR34/L98H/S297T/F495I, quatro com *cyp51A*-5SNIPs e um isolado ambiental coletado em ambiente hospitalar com TR46/F495I (Pontes; Arai; *et al.*, 2024; Pontes; *et al.*, 2024). Outro estudo conduzido em hospital de São Paulo, em 2023, identificou

17 isolados resistentes, incluindo oito *cyp51A*-5SNIPs, um *cyp51A*-3SNIPs, um com F46Y e E427K, dois com N248K e cinco com M172V (Fonseca *et al.*, 2023).

Figura 9 – Panorama das mutações em *cyp51A* descritas em *A. fumigatus* na América do Sul



Fonte: autor

Na Argentina, Leonardelli *et al.* (2017) descreveram o primeiro isolado no continente portando a mutação G54E, associada à resistência ao ITC, proveniente de um caso clínico, enquanto Isla *et al.* (2018) relataram, pela primeira vez no país, a presença das mutações TR46/Y121F/T289A em um isolado clínico. Macedo *et al.* (2020) identificaram as mutações TR34/L98H em dois isolados de um paciente com fibrose cística e um isolado com uma nova combinação de mutações TR34/R65K/L98H/S297.

No Chile, em 2024 foram relatados três isolados clínicos, um com mutações TR34/L98H e outros dois com *cyp51A*-3SNIPs (Álvarez Duarte; Cepeda; Miranda, 2024).

Um estudo multinacional que recebeu isolados do solo do Paraguai encontrou um isolado com *cyp51A*-3SNIPs e outro com *cyp51A*-5SNIPs (Resendiz-Sharpe *et al.*,

2021). Neste mesmo estudo também foram recuperados isolados do solo do Peru e foram encontrados 6 isolados com as mutações TR34/L98H e TR34/L98H/S297T/F495I (Resendiz-Sharpe *et al.*, 2021). Além deste, outro estudo no Peru descreveu três isolados, um com mutações M220K, outro com N248K e G54E e por fim um com TR34/L98H (Bustamante *et al.*, 2020).

Na Colômbia, há três estudos que descreveram mutações em *A. fumigatus* resistentes, todos provenientes de amostras de solo, sendo o primeiro, em 2016, realizado por Pape *et al.* (2016), que identificaram 17 isolados com as mutações TR46/Y121F/T289A, um com TR34/L98H e um com TR53; posteriormente, Alvarez-Moreno *et al.* (2017, 2019) relataram em 2017, 17 isolados com TR46/Y121F/T289A, dois com TR53 e um com TR34/L98H; e, por fim, em 2019, outro estudo dos mesmos autores descreveu um isolado com TR34/L98H, quatro com TR46/Y121F/T289A e um com TR53.

Em contraste com outros dados da América do Sul, em nosso estudo, de modo surpreendente, não foram identificadas as mutações TR nos isolados resistentes a TEB, sabendo que estas mutações são reconhecidamente associadas à resistência ambiental e aos fungicidas agrícolas (Ren *et al.*, 2017; Snelders *et al.*, 2009). Toyotome *et al.* (2021), por meio de seleção *in vitro*, observaram o surgimento de mutações em vários genes, mas não conseguiram induzir as alterações clássicas no *cyp51A* ou inserções TR no promotor, como descrito anteriormente (Snelders *et al.*, 2012), ainda que, descreveram mecanismos adjacentes envolvidos na resistência ao TEB, o que provavelmente é o caso dos isolados deste trabalho.

Uma limitação deste estudo foi a ausência do sequenciamento genômico dos isolados com altos valores de CIM para TEB, o que teria permitido investigar mecanismos de resistência complementares. Essa abordagem representa uma perspectiva importante para nossos trabalhos futuros. Alguns estudos, relataram isolados com altas CIMs ao TEB mas sem mutações no *cyp51A* (Wang *et al.*, 2024) e com superexpressão de *cyp51A*, *cyp51B* e das bombas de efluxo AfuMDR1 e AfuMDR4 (Cui *et al.*, 2019).

A genotipagem das regiões microssatélites dos isolados mostraram que os cinco isolados com altas CIMs ao TEB (CMMS 340–344), além de compartilharem o mesmo fenótipo e perfil de sensibilidade antifúngica, são geneticamente idênticos. Embora tenham sido coletados em locais e dias diferentes, todos eram da mesma vizinhança. Amostras adicionais foram coletadas na mesma cidade, mas nenhum

outro isolado com o mesmo perfil foi encontrado. O tamanho da amostra é muito pequeno para tirar conclusões abrangentes, mas é possível que esses isolados tenham sido submetidos a alguma forma de pressão seletiva e tenham começado a se expandir nessa região, configurando um risco à saúde pública local.

O dendrograma construído a partir dos marcadores de microssatélites mostrou que os cinco isolados (CMMS 340-344) se agruparam no mesmo *cluster* que um isolado chamado "Paciente C" de um estudo espanhol de Escribano *et al.* (2011). O isolado do Paciente C possui os *cyp51A*-3SNPs (M172V, F46Y, E427K) e as mutações silenciosas (L358L, C454C, G497G, G89G). Uma análise genômica dos isolados revelou que os *cyp51A*-3SNIPs e 5SNIPs formaram dois clados monofiléticos irmãos, distintos dos isolados *wild-type* e dos mutantes TR (Majima *et al.*, 2021). Futuramente, estudos do genoma destes isolados (CMMS 340-344) podem elucidar se a mutação M172V é naturalmente encontrada na natureza ou se representa um estágio inicial de uma linhagem evolutiva, potencialmente, acumulando mutações que culminariam nos conjuntos de mutações observados nos 3SNIPs e 5SNIPs. Além disso, a ausência da mutação silenciosa G497G nos isolados com 5SNIPs, em contraste com sua presença nos 3SNIPs e nos isolados portando apenas M172V (Escribano *et al.*, 2011), pode constituir um marcador distintivo entre essas populações.

Isolados que carregam polimorfismos de resistência aos triazóis exibem uma estrutura populacional clara, não são misturadas aleatoriamente, tem baixa diversidade genética, estreita relação genética e exibem seleção rápida para mutações benéficas que facilitam sua expansão e reprodução clonal (Bottery *et al.*, 2024; Lofgren *et al.*, 2022; Rhodes *et al.*, 2022). Além disso, como observado nos isolados deste estudo (CMMS 340-344), certas mutações no gene *cyp51A* não afetam a aptidão ou o fenótipo, que associados a reprodução assexual, pode explicar sua persistência no ambiente.

A resolução dessas questões requer estudos genômicos mais abrangentes, envolvendo os genótipos *cyp51A*-3SNPs e -5SNPs, bem como os isolados portadores apenas da mutação M172V. Investigações que incluam uma coleção maior de isolados, provenientes de diferentes regiões geográficas, poderão contribuir para compreensão maior dos mecanismos adicionais de resistência presentes nesses isolados e de suas relações genéticas.

## 10. CONCLUSÕES

- Este estudo a contribuiu para a epidemiologia molecular da resistência antifúngica em *Aspergillus* spp. no Centro-Oeste brasileiro, particularmente, no estado de Mato Grosso do Sul, uma região de intensa atividade agroindustrial que pode justificar o encontro da rota ambiental;
- Identificou-se grande diversidade de espécies de *Aspergillus* em ar atmosférico, mas com predominância de *A. fumigatus* evidenciando o risco de aquisição inalatória do principal agente causal da aspergilose;
- Confirmou-se a presença de isolados clínicos resistentes, especialmente, em *A. fumigatus*, alertando para a possibilidade de falha clínica na vigência de terapia triazólica nos casos de doença;
- Demonstrou-se a circulação de isolados do ar, resistentes ao tebuconazol, próxima à residência de pacientes. Esses isolados apontam que o uso massivo de triazólicos agrícolas no estado de MS está, possivelmente, selecionando fungos resistentes, podendo levar à resistência cruzada a fármacos da mesma classe química.
- Descreveu-se em um isolado de *A. fumigatus*, recuperado de ar atmosférico e resistente à itraconazol e posaconazol, a mutação G54A, documentando pela primeira vez na América Latina em isolado ambiental, esse mecanismo de resistência, já conhecido em outros continentes por induzir resistência a fármacos triazólicos;
- Constatou-se, também de modo inédito na América Latina, a ocorrência da mutação G138S em um isolado clínico de *A. fumigatus* resistente à itraconazol e voriconazol, o que sugere limitação das opções terapêuticas para aspergilose invasiva e crônica.
- Através dos experimentos de edição gênica, confirmou-se, pela primeira vez, que a mutação M172V, em combinação com L358L, C454C, G497G e G89G, influencia na redução parcial da sensibilidade ao tebuconazol, sendo que, o papel das mutações que compunham o perfil *cyp51A-3* e 5-SNIPs ainda era debatido. O achado prova que outros mecanismos estão envolvidos na resistência ao tebuconazol. Os achados sugerem a circulação, e possível expansão inicial, de isolados ambientais sob forte pressão de azóis agrícolas em região agroindustrial de destaque, o que ressalta a urgência e importância crítica de se estabelecerem programas robustos de vigilância, não apenas em MS, mas em toda a América do Sul, para subsidiar medidas eficazes de prevenção da aspergilose resistente.

- Esses dados são de importância para a saúde pública regional e motivam estudos sobre resistência, essenciais para acompanhar o perfil epidemiológico da aspergilose que, em poucas décadas, pode ser alterado agravando o desafio de seu controle e manejo clínico.

## 11. REFERÊNCIAS

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Aspergillus Section Fumigati: Antifungal Susceptibility Patterns and Sequence-Based Identification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 1244–1251, abr. 2008. DOI: 10.1128/aac.00942-07. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00942-07>. Acesso em: 18 out. 2025.

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Species Identification and Antifungal Susceptibility Patterns of Species Belonging to Aspergillus Section Nigri. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 4514–4517, out. 2009. DOI: 10.1128/aac.00585-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00585-09>. Acesso em: 19 out. 2025.

ÁLVAREZ DUARTE, E.; CEPEDA, N.; MIRANDA, J. Azole resistance in a clinical isolate of Aspergillus fumigatus from Chile. **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 7–12, jan. 2024. DOI: 10.1016/j.riam.2024.04.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S113014062400007X>. Acesso em: 30 set. 2025.

ALVAREZ-MORENO, C.; LAVERGNE, R.-A.; HAGEN, F.; MORIO, F.; MEIS, J. F.; LE PAPE, P. Azole-resistant Aspergillus fumigatus harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 45631, 30 mar. 2017. DOI: 10.1038/srep45631. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep45631>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ALVAREZ-MORENO, C.; LAVERGNE, R.-A.; HAGEN, F.; MORIO, F.; MEIS, J. F.; LE PAPE, P. Fungicide-driven alterations in azole-resistant Aspergillus fumigatus are related to vegetable crops in Colombia, South America. **Mycologia**, [S. l.], v. 111, n. 2, p. 217–224, 2019. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1557796>.

ARAI, T.; UMEYAMA, T.; MAJIMA, H.; INUKAI, T.; WATANABE, A.; MIYAZAKI, Y.; KAMEI, K. Hmg1 mutations in Aspergillus fumigatus and their contribution to triazole susceptibility. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 59, n. 10, p. 980–984, 1 out. 2021. DOI: 10.1093/mmy/myab026. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myab026>. Acesso em: 11 mar. 2025.

BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G.; SMITH, A. C.; MOSER, S. A. Epidemiology of Aspergillus terreus at a University Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 5525–5529, dez. 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.12.5525-5529.2003. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC308992/>. Acesso em: 19 out. 2025.

BALAJEE, S. A.; BORMAN, A. M.; BRANDT, M. E.; CANO, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DANNAOUI, E.; GUARRO, J.; HAASE, G.; KIBBLER, C. C.; MEYER, W.; O'DONNELL, K.; PETTI, C. A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; SUTTON, D.; VELEGRAKI, A.; WICKES, B. L. Sequence-Based Identification of Aspergillus, Fusarium, and Mucorales Species in the Clinical Mycology Laboratory: Where Are

We and Where Should We Go from Here? **Journal of Clinical Microbiology**, [S. I.], v. 47, n. 4, p. 877–884, abr. 2009. DOI: 10.1128/jcm.01685-08. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.01685-08>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BASSETTI, M.; AZOULAY, E.; KULLBERG, B.-J.; RUHNKE, M.; SHOHAM, S.; VAZQUEZ, J.; GIACOBBE, D. R.; CALANDRA, T. EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Diseases: Summary of Activities of the Intensive Care Unit Working Group. **Clinical Infectious Diseases**, [S. I.], v. 72, n. Supplement\_2, p. S121–S127, 12 mar. 2021. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1751>.

BEDIN DENARDI, L.; HOCH DALLA-LANA, B.; PANTELLA KUNZ DE JESUS, F.; BITTENCOURT SEVERO, C.; MORAIS SANTURIO, J.; ZANETTE, R. A.; HARTZ ALVES, S. In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. I.], v. 22, n. 1, p. 30–36, 1 jan. 2018. DOI: 10.1016/j.bjid.2017.10.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867017308449>. Acesso em: 11 jun. 2024.

BORN, T.; ARUANNO, M.; KAMPOURI, E.; MOMBELLI, M.; MONNEY, P.; TOZZI, P.; LAMOTH, F. *Aspergillus tubingensis* Endocarditis: A Case Report and Review of the Literature. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 187, n. 2, p. 249–258, 1 jun. 2022. DOI: 10.1007/s11046-022-00621-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-022-00621-0>. Acesso em: 19 out. 2025.

BOTTERY, M. J.; VAN RHIJN, N.; CHOWN, H.; RHODES, J. L.; CELIA-SANCHEZ, B. N.; BREWER, M. T.; MOMANY, M.; FISHER, M. C.; KNIGHT, C. G.; BROMLEY, M. J. Elevated mutation rates in multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* drive rapid evolution of antifungal resistance. **Nature Communications**, [S. I.], v. 15, n. 1, p. 10654, 16 dez. 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-54568-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-54568-5>. Acesso em: 20 maio 2025.

BRYSON, R. (org.). **Challenges and prospects for fungicidal control of wheat diseases**. Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing, 2019. 346 p. (19).

BUEID, A.; HOWARD, S. J.; MOORE, C. B.; RICHARDSON, M. D.; HARRISON, E.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. I.], v. 65, n. 10, p. 2116–2118, 1 out. 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq279. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq279>. Acesso em: 11 mar. 2025.

BUIL, J. B.; MEIS, J. F.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. Are the TR46/Y121F/T289A Mutations in Azole-Resistant Aspergillosis Patient Acquired or Environmental? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 60, n. 5, p. 3259–3260, 22 abr. 2016. DOI: 10.1128/aac.00256-16. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00256-16>. Acesso em: 22 maio 2025.

BUSTAMANTE, B.; ILLESCAS, L. R.; POSADAS, A.; CAMPOS, P. E. Azole resistance among clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* in Lima-Peru. **Medical Mycology**, [S. I.], v. 58, n. 1, p. 54–60, 1 jan. 2020. DOI: 10.1093/mmy/myz032.

Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/58/1/54/5477366>. Acesso em: 23 jun. 2024.

CAMPS, S. M. T.; DUTILH, B. E.; ARENDRUP, M. C.; RIJS, A. J. M. M.; SNELDERS, E.; HUYNEN, M. A.; VERWEIJ, P. E.; MELCHERS, W. J. G. Discovery of a hapE Mutation That Causes Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* through Whole Genome Sequencing and Sexual Crossing. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. e50034, 30 nov. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0050034. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050034>. Acesso em: 13 mar. 2025.

CAO, D.; WANG, F.; YU, S.; DONG, S.; WU, R.; CUI, N.; REN, J.; XU, T.; WANG, S.; WANG, M.; FANG, H.; YU, Y. Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* is Highly Associated with Azole Fungicide Residues in the Fields. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 55, n. 5, p. 3041–3049, 2 mar. 2021. DOI: 10.1021/acs.est.0c03958. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.0c03958>. Acesso em: 29 fev. 2024.

CAO, D.; WU, R.; DONG, S.; WANG, F.; JU, C.; YU, S.; XU, S.; FANG, H.; YU, Y. Five-Year Survey (2014 to 2018) of Azole Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 64, n. 10, p. e00904-20, 21 set. 2020. DOI: 10.1128/AAC.00904-20. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00904-20>. Acesso em: 29 fev. 2024.

CAO, D.; YAO, S.; ZHANG, H.; WANG, S.; JIN, X.; LIN, D.; FANG, H.; YU, Y. Mutation in cyp51A and high expression of efflux pump gene of *Aspergillus fumigatus* induced by propiconazole in liquid medium and soil. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 256, p. 113385, jan. 2020. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113385. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749118352977>. Acesso em: 29 fev. 2024.

CARMONA, E. M.; LIMPER, A. H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clinics in Chest Medicine**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 393–402, 1 set. 2017. DOI: 10.1016/j.ccm.2017.04.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272523117300382>. Acesso em: 7 ago. 2024.

CHASSOT, C.; HUGELSHOFER, U.; SIEROTZKI, H.; GISI, U. Sensitivity of CYP51 Genotypes to DMI Fungicides in *Mycosphaerella graminicola*. **Modern Fungicides and Antifungal Compounds**. [S. l.]: [S. n.], 2008. v. 5.

CHEN, M.; ZHONG, G.; WANG, S.; CHEN, P.; LI, L. Deletion of cox7c Results in Pan-Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. e00151-22, 2022. DOI: 10.1128/aac.00151-22. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9211413/>. Acesso em: 13 mar. 2025.

CHEN, Y.; LI, Z.; HAN, X.; TIAN, S.; ZHAO, J.; CHEN, F.; SU, X.; ZHAO, J.; ZOU, Z.; GONG, Y.; QU, F.; QIU, G.; WANG, S.; JIA, X.; LU, Z.; HU, M.; HUANG, L.; VERWEIJ, P. E.; HAN, L. Elevated MIC Values of Imidazole Drugs against *Aspergillus fumigatus* Isolates with TR<sub>34</sub>/L98H/S297T/F495I Mutation.

**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 62, n. 5, p. e01549-17, maio 2018. DOI: 10.1128/AAC.01549-17. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01549-17>. Acesso em: 29 fev. 2024.

CHO, S.-H.; SEO, S.-C.; SCHMECHEL, D.; GRINSHPUN, S.; REPONEN, T. Aerodynamic characteristic and respiratory deposition of fungal particles. **Atmospheric Environment**, [S. I.], v. 39, p. 5454–5465, 1 set. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.05.042>.

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

CLSI, C. and laboratory standards institute. M51-A. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. [S. I.], v. 30, n. 11, 2010.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, [S. I.], v. 2013, p. 1–23, 2013. DOI: 10.1155/2013/675213. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2013/675213/>. Acesso em: 7 abr. 2024.

COLEMAN, J. J.; MYLONAKIS, E. Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. **PLOS Pathogens**, [S. I.], v. 5, n. 6, p. e1000486, 26 jun. 2009. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000486. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000486>. Acesso em: 11 mar. 2025.

COMMISION, E. EU Pesticides Database - Active substances. 2024. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>. Acesso em: 20 ago. 2024.

CUI, N.; HE, Y.; YAO, S.; ZHANG, H.; REN, J.; FANG, H.; YU, Y. Tebuconazole induces triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* in liquid medium and soil. **Science of The Total Environment**, [S. I.], v. 648, p. 1237–1243, jan. 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.247. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896971833211X>. Acesso em: 29 fev. 2024.

CUYPERS, L.; AERTS, R.; GAER, O. V. de; VINKEN, L.; MERCKX, R.; GERILS, V.; VELDE, G. V.; RESÉNDIZ-SHARPE, A.; MAERTENS, J.; LAGROU, K. Doubling of triazole resistance rates in invasive aspergillosis over a 10-year period, Belgium, 1 April 2022 to 31 March 2023. **Eurosurveillance**, [S. I.], v. 30, n. 18, p. 2400559, 8 maio 2025. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2025.30.18.2400559. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2025.30.18.2400559>. Acesso em: 9 out. 2025.

DA FONSECA, L. M. M.; BRAGA, V. F.; TONANI, L.; GRIZANTE BARIÃO, P. H.; NASCIMENTO, E.; MARTINEZ, R.; VON ZESKA KRESS, M. R. Surveillance of Amphotericin B and Azole Resistance in *Aspergillus* Isolated from Patients in a Tertiary Teaching Hospital. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 9, n. 11, p. 1070, n. 11, nov.

2023. DOI: 10.3390/jof9111070. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/11/1070>. Acesso em: 27 mar. 2025.

DE VALK, H. A.; MEIS, J. F. G. M.; CURFS, I. M.; MUEHLETHALER, K.; MOUTON, J. W.; KLAASSEN, C. 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**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 4112–4120, ago. 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4112-4120.2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.43.8.4112-4120.2005>. Acesso em: 29 fev. 2024.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. e428–e438, 1 jul. 2024. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473-3099\(23\)006928](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473-3099(23)006928). Acesso em: 21 jul. 2024.

DENNING, D. W.; CADRANEL, J.; BEIGELMAN-AUBRY, C.; ADER, F.; CHAKRABARTI, A.; BLOT, S.; ULLMANN, A. J.; DIMOPOULOS, G.; LANGE, C. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. **European Respiratory Journal**, [S. l.], v. 47, n. 1, Seção Task Force Report, p. 45–68, 31 dez. 2015. DOI: 10.1183/13993003.00583-2015. Disponível em: <https://publications.ersnet.org/content/erj/47/1/45>. Acesso em: 3 set. 2025.

DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET, F.; DUFAYARD, J.-F.; GUINDON, S.; LEFORT, V.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J.-M.; GASCUEL, O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 36, n. Web Server issue, p. W465-469, 1 jul. 2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>.

DIRECTORATE-GENERAL FOR EXTERNAL POLICIES OF THE UNION (EUROPEAN PARLIAMENT); SARKAR, S.; DIAS, J.; GIL, B.; KEELEY, J.; MÖHRING, N.; JANSEN, K. **The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food**. [S. l.]: Publications Office of the European Union, 2021. Disponível em: <https://data.europa.eu/doi/10.2861/28995>. Acesso em: 16 abr. 2025.

DONNELLY, J. P.; CHEN, S. C.; KAUFFMAN, C. A.; STEINBACH, W. J.; BADDLEY, J. W.; VERWEIJ, P. E.; CLANCY, C. J.; WINGARD, J. R.; LOCKHART, S. R.; GROLL, A. H.; SORRELL, T. C.; BASSETTI, M.; AKAN, H.; ALEXANDER, B. D.; ANDES, D.; AZOULAY, E.; BIALEK, R.; BRADSHER, R. W.; BRETAGNE, S.; CALANDRA, T.; CALIENDO, A. M.; CASTAGNOLA, E.; CRUCIANI, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DECKER, C. F.; DESAI, S. R.; FISHER, B.; HARRISON, T.; HEUSSEL, C. P.; JENSEN, H. E.; KIBBLER, C. C.; KONTOYIANNIS, D. P.; KULLBERG, B.-J.; LAGROU, K.; LAMOTH, F.; LEHRNBECHER, T.; LOEFFLER, J.; LORTHOLARY, O.; MAERTENS, J.; MARCHETTI, O.; MARR, K. A.; MASUR, H.; MEIS, J. F.; MORRISEY, C. O.; NUCCI, M.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAGANO, L.; PATTERSON, T. F.; PERFECT, J. R.; RACIL, Z.; ROILIDES, E.; RUHNKE, M.; PROKOP, C. S.; SHOHAM, S.; SLAVIN, M. A.; STEVENS, D. A.; THOMPSON, G. R.; VAZQUEZ, J. A.; VISCOLI, C.; WALSH, T. J.; WARRIS, A.; WHEAT, L. J.; WHITE, P. L.; ZAOUTIS, T. E.; PAPPAS, P. G. Revision and Update of the

Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. **Clinical Infectious Diseases**, [S. I.], v. 71, n. 6, p. 1367–1376, 12 set. 2020. DOI: 10.1093/cid/ciz1008. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/71/6/1367/5645434>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DORNELES, F. **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**. 2022. 84 f. Dissertação Mestrado – UFMS, Campo Grande, 2022. Acesso em: 27 mar. 2025.

DOS SANTOS, A. P.; AMORIM, B. C.; DA SILVA, D. G.; DE RODRIGUES, D. K. B.; DA COSTA MARQUES, A. P.; GASPAROTO, A. L. D. B.; DA COSTA ALVARENGA DE BRITO, E.; FAVA, W. S.; DE OLIVEIRA, C. T. F.; CANASSA, A. L.; GONÇALVES, C. C. M.; GRANDE, A. J.; DE SOUZA CARVALHO MELHEM, M.; PANIAGO, A. M. M.; VOLPE-CHAVES, C. E.; VENTURINI, J. Performance of the IMMY® sona Aspergillus lateral flow assay for the detection of galactomannan in tracheal aspirate samples from Brazilian patients with COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: Cross-sectional and systematic review of literature. **Mycoses**, [S. I.], v. 67, n. 8, p. e13789, 2024. DOI: 10.1111/myc.13789. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13789>. Acesso em: 1 jun. 2025.

DRUART, C.; MILLET, M.; SCHEIFLER, R.; DELHOMME, O.; RAEPPPEL, C.; DE VAUFLEURY, A. Snails as indicators of pesticide drift, deposit, transfer and effects in the vineyard. **Science of The Total Environment**, [S. I.], v. 409, n. 20, p. 4280–4288, 15 set. 2011. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969711007224>. Acesso em: 16 abr. 2025.

ELSAMAN, H.; GOLUBTSOV, E.; BRAZIL, S.; NG, N.; KLUGHERZ, I.; MARTIN, R.; DICHTL, K.; MÜLLER, C.; WAGENER, J. Toxic eburicol accumulation drives the antifungal activity of azoles against *Aspergillus fumigatus*. **Nature Communications**, [S. I.], v. 15, n. 1, p. 6312, 26 jul. 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-50609-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-50609-1>. Acesso em: 3 abr. 2025.

ESCRIBANO, P.; RECIO, S.; PELÁEZ, T.; BOUZA, E.; GUINEA, J. *Aspergillus fumigatus* Strains with Mutations in the cyp51A Gene Do Not Always Show Phenotypic Resistance to Itraconazole, Voriconazole, or Posaconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 55, n. 5, p. 2460–2462, 28 abr. 2011. DOI: 10.1128/aac.01358-10. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.01358-10>. Acesso em: 11 mar. 2025.

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

**EUCAST. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures v 6.0.** [S. I.]: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [S. d.].

EZEONUEGBU, B. A.; ABDULLAHI, M. D.; WHONG, C. M. Z.; SOHUNAGO, J. W.; KASSEM, H. S.; YARO, C. A.; HETTA, H. F.; MOSTAFA-HEDEAB, G.; ZOUGANELIS, G. D.; BATIHA, G. E.-S. Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. **Scientific Reports**, [S. I.], v. 12, n. 1, p. 2094, 8 fev. 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-05820-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-05820-9>. Acesso em: 21 jul. 2024.

FIEMA, M.; WLODARCZYK, A.; WOJKOWSKA-MACH, J.; GARLICKI, J.; GREGORCZYK-MAGA, I. Atypical Presentation of *Aspergillus niger* Infection in the Oral Cavity as a Prediction of Invasive Pulmonary Aspergillosis in a Patient with COVID-19: Case Report and Literature Review. **Microorganisms**, [S. I.], v. 10, n. 8, p. 1630, ago. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10081630. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/8/1630>. Acesso em: 19 out. 2025.

FINOTO VIANA, L.; DO AMARAL CRISPIM, B.; KUMMROW, F.; ALICE DE LIMA, N.; AMARAL DIAS, M.; CAROLINA MONTAGNER, C.; HENRIQUE GENTIL PEREIRA, R.; DE BARROS, A.; BARUFATTI, A. Occurrence of contaminants of emerging concern and their risks to the Pantanal Sul-Mato-Grossense aquatic biota, Brazil. **Chemosphere**, [S. I.], v. 337, p. 139429, 1 out. 2023. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.139429. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565352301696X>. Acesso em: 6 maio 2025.

FOCACCI, R. **Tratado de infectologia**. 5. ed. [S. I.]: Editora Atheneu, 19 out. 2021.

FRANCONI, I.; RIZZATO, C.; GHELARDI, E.; LUPETTI, A. Hospital distribution, seasonality, time trends and antifungal susceptibility profiles of all *Aspergillus* species isolated from clinical samples from 2015 to 2022 in a tertiary care hospital. **BMC Microbiology**, [S. I.], v. 24, n. 1, p. 111, 3 abr. 2024. DOI: 10.1186/s12866-024-03267-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03267-8>. Acesso em: 29 set. 2025.

GARCIA-RUBIO, R.; ALCAZAR-FUOLI, L.; MONTEIRO, M. C.; MONZON, S.; CUESTA, I.; PELAEZ, T.; MELLADO, E. Insight into the Significance of *Aspergillus fumigatus* cyp51A Polymorphisms. [S. I.], v. 63, n. 6, p. 10–1128, 2018. DOI: 10.1128/aac.00241-18. Disponível em: [https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aac.00241-18?src=getftr&utm\\_source=wiley&getft\\_integrator=wiley](https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aac.00241-18?src=getftr&utm_source=wiley&getft_integrator=wiley). Acesso em: 11 mar. 2025.

GAUTIER, M.; NORMAND, A.-C.; L'OLLIVIER, C.; CASSAGNE, C.; REYNAUD-GAUBERT, M.; DUBUS, J.-C.; BRÉGEON, F.; HENDRICKX, M.; GOMEZ, C.; RANQUE, S.; PIARROUX, R. *Aspergillus tubingensis* : a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. **Medical Mycology**, [S. I.], v. 54, n. 5, p. 459–470, 1 jul. 2016. DOI: 10.1093/mmy/myv118. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myv118>. Acesso em: 19 out. 2025.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A.; DENNING, D. W.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. C.; PROGRAM, in association with the L. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, [S. I.], v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016. DOI: 10.1111/myc.12427. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.12427>. Acesso em: 2 set. 2025.

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**, [S. I.], v. 61, n. 4, p. 1323–1330, abr. 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167388/>. Acesso em: 23 jul. 2024.

GONZALEZ-LARA, M. F.; ROMAN-MONTES, C. M.; DIAZ-LOMELI, P.; RANGEL-CORDERO, A.; VALENZUELA, M. O.; PONCE-DE-LEON, A.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; MARTINEZ-GAMBOA, A. Azole resistance and cyp51A mutation screening in *Aspergillus fumigatus* in Mexico. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. I.], v. 74, n. 7, p. 2047–2050, 1 jul. 2019. DOI: 10.1093/jac/dkz121. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz121>. Acesso em: 24 jun. 2024.

HÄRTLE, S.; VERVELDE, L.; KASPERS, B. Chapter 11.2 - The avian respiratory immune system. In: KASPERS, B.; SCHAT, K. A.; GÖBEL, T. W.; VERVELDE, L. (org.). **Avian Immunology (Third Edition)**. Boston: Academic Press, 1 jan. 2022. p. 327–341. DOI: 10.1016/B978-0-12-818708-1.00007-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187081000075>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HASE, I.; KAGATANI, J.; SUZUKI, S.; YOSHIDA, S.; SAKAMOTO, K.; MAITANI, F.; HORINOUCHI, H.; KAMEI, K.; TATENO, H. Successfully treated bronchopulmonary oxalosis caused by *Aspergillus tubingensis* in a non-neutropenic patient: A case report and review of the literature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [S. I.], v. 28, n. 2, p. 299–303, 1 fev. 2022. DOI: 10.1016/j.jiac.2021.10.019. Disponível em: [https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X\(21\)00292-0/abstract](https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X(21)00292-0/abstract). Acesso em: 3 set. 2025.

HASHIMOTO, A.; HAGIWARA, D.; WATANABE, A.; YAHIRO, M.; YIKELAMU, A.; YAGUCHI, T.; KAMEI, K. Drug Sensitivity and Resistance Mechanism in *Aspergillus* Section Nigri Strains from Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 61, n. 8, p. 10.1128/aac.02583-16, 25 jul. 2017. DOI: 10.1128/aac.02583-16. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.02583-16>. Acesso em: 19 out. 2025.

HAUCK, R.; CRAY, C.; FRANÇA, M. Spotlight on avian pathology: aspergillosis. **Avian Pathology**, [S. I.], v. 49, n. 2, p. 115–118, 3 mar. 2020. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1696946>.

HE, X.; KUSUYA, Y.; HAGIWARA, D.; TOYOTOME, T.; ARAI, T.; BIAN, C.; NAGAYAMA, M.; SHIBATA, S.; WATANABE, A.; TAKAHASHI, H. Genomic diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* in Japan reveals the complex genomic basis of azole resistance. **Communications Biology**, [S. I.], v. 7, n. 1, p. 1–

10, 14 mar. 2024. DOI: 10.1038/s42003-024-05902-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-024-05902-6>. Acesso em: 22 abr. 2025.

HEALD, C. L.; SPRACKLEN, D. V. Atmospheric budget of primary biological aerosol particles from fungal spores. **Geophysical Research Letters**, [S. I.], v. 36, n. 9, 2009. DOI: 10.1029/2009GL037493. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1029/2009GL037493>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HOLLOMON, D. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? **Pest Management Science**, [S. I.], v. 73, n. 10, p. 1987–1993, 2017. DOI: 10.1002/ps.4607. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.4607>. Acesso em: 11 mar. 2025.

HOMA, M.; MANIKANDAN, P.; SZEKERES, A.; KISS, N.; KOCSUBÉ, S.; KREDICS, L.; ALSHEHRI, B.; DUKHYIL, A. A. B.; REVATHI, R.; NARENDRAN, V.; VÁGVÖLGYI, C.; SHOBANA, C. S.; PAPP, T. Characterization of *Aspergillus tamarii* Strains From Human Keratomycoses: Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Patterns and Cyclopiazonic Acid Producing Abilities. **Frontiers in Microbiology**, [S. I.], v. 10, 9 out. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02249. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.02249/full>. Acesso em: 19 out. 2025.

HONG, S.-B.; CHO, H.-S.; SHIN, H.-D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. I.], v. 56, n. 2, p. 477–486, 2006. DOI: 10.1099/ijss.0.63980-0. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijss.0.63980-0>. Acesso em: 14 set. 2024.

HORIUCHI, H.; WATANABE, A.; YAGUCHI, T.; BAN, S.; OTSUKA, T.; MIYAZAKI, H.; FURUYA, R. Superficial abdominal surgical site infection caused by *Aspergillus welwitschiae*: a case report. **BMC Infectious Diseases**, [S. I.], v. 24, n. 1, p. 990, 17 set. 2024. DOI: 10.1186/s12879-024-09919-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09919-4>. Acesso em: 3 set. 2025.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; WANG, X.-C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENNSCH, K.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, [S. I.], v. 95, p. 5–169, 27 jun. 2020. DOI: 10.1016/j.simyco.2020.05.002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7426331/>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HOWARD, S. J.; PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* bronchitis. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. I.], v. 16, n. 6, p. 683–688, 1 jun. 2010. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02911.x. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.org/article/S1198-743X\(14\)61712-2/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.org/article/S1198-743X(14)61712-2/fulltext). Acesso em: 19 out. 2025.

HOWARD, Susan J.; HARRISON, E.; BOWYER, P.; VARGA, J.; DENNING, D. W. Cryptic Species and Azole Resistance in the *Aspergillus niger* Complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 55, n. 10, p. 4802–4809, 15 set. 2011. DOI: 10.1128/aac.00304-11. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00304-11>. Acesso em: 19 out. 2025.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **IBAMA**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 20 ago. 2024.

IMBERT, S.; NORMAND, A. C.; CASSAING, S.; GABRIEL, F.; KRISTENSEN, L.; BONNAL, C.; LACHAUD, L.; COSTA, D.; GUITARD, J.; HASSEINE, L.; PALOUS, M.; PIARROUX, M.; HENDRICKX, M.; PIARROUX, R.; FEKKAR, A. Multicentric Analysis of the Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Cryptic Isolates from *Aspergillus* Section Fumigati. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 64, n. 12, p. 10.1128/aac.01374-20, 17 nov. 2020. DOI: 10.1128/aac.01374-20. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.01374-20>. Acesso em: 19 ago. 2025.

IMBERT, S.; NORMAND, A. C.; RANQUE, S.; COSTA, J. M.; GUITARD, J.; ACCOCEBERRY, I.; BONNAL, C.; FEKKAR, A.; BOURGEOIS, N.; HOUZÉ, S.; HENNEQUIN, C.; PIARROUX, R.; DANNAOUI, 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**, [S. I.], v. 62, n. 5, p. 10.1128/aac.02315-17, 26 abr. 2018. DOI: 10.1128/aac.02315-17. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02315-17>. Acesso em: 19 ago. 2025.

ISLA, G.; LEONARDELLI, F.; TIRABOSCHI, I. N.; REFOJO, N.; HEVIA, A.; VIVOT, W.; SZUSZ, W.; CÓRDOBA, S. B.; GARCÍA-EFFRON, G. First Clinical Isolation of an Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Isolate Harboring a TR46 Y121F T289A Mutation in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 62, n. 10, p. 10.1128/aac.00872-18, 24 set. 2018. DOI: 10.1128/aac.00872-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00872-18>. Acesso em: 11 jun. 2024.

IUPAC-IUB. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides (Recommendations 1983). **Pure and Applied Chemistry**, [S. I.], v. 56, n. 5, p. 595–624, 1 jan. 1984. DOI: 10.1351/pac198456050595. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac198456050595/html>. Acesso em: 11 mar. 2025.

JANANI, R. S.; XESS, I.; DAS, B. K.; CS, S.; BORDOLOI, T.; PANDEY, M.; AHMED, J.; SINGH, G. Invasive aspergillosis due to cryptic *Aspergillus* species: A prospective study from a single centre in India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [S. I.], v. 51, p. 100708, 1 set. 2024. DOI: 10.1016/j.ijmm.2024.100708. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025508572400183X>. Acesso em: 19 out. 2025.

JIN, F.-J.; WANG, B.-T.; WANG, Z.-D.; JIN, L.; HAN, P. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing and Its Application in Aspergillus Species. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 8, n. 5, p. 467, n. 5, maio 2022. DOI: 10.3390/jof8050467. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/5/467>. Acesso em: 13 mar. 2025.

JØRGENSEN, L. N.; HEICK, T. M. Azole Use in Agriculture, Horticulture, and Wood Preservation – Is It Indispensable? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. I.], v. 11, 7 set. 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.730297. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2021.730297/full>. Acesso em: 20 ago. 2024.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, [S. I.], v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 19 jul. 2019. DOI: 10.1093/bib/bbx108. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/bib/bbx108>. Acesso em: 9 out. 2025.

KIMURA, H.; MITSUTO, I.; TAGUCHI, R.; ANZAWA, K.; MOCHIZUKI, T. Primary cutaneous aspergillosis caused by Aspergillus tamarii in a premature infant with extremely low birthweight: A case report with short review. **The Journal of Dermatology**, [S. I.], v. 45, n. 5, p. 622–625, 2018. DOI: 10.1111/1346-8138.14263. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1346-8138.14263>. Acesso em: 19 out. 2025.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E. K.; CHANDRASEKAR, P. H. Aspergillus flavus: an emerging non-fumigatus Aspergillus species of significance. **Mycoses**, [S. I.], v. 52, n. 3, p. 206–222, 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x>. Acesso em: 19 out. 2025.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, [S. I.], v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 1 jul. 2016. DOI: 10.1093/molbev/msw054. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>. Acesso em: 19 jun. 2025.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A. A.; WANTZEN, M.; DA SILVA, C. J.; ZECH, W. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, [S. I.], v. 31, n. 5, p. 1636–1648, 2002. DOI: 10.2134/jeq2002.1636. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/jeq2002.1636>. Acesso em: 6 maio 2025.

LATGÉ, J.-P. **Aspergillus fumigatus and Aspergillosis**. [S. I.]: CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, 1999. DOI: 10.1128/cmrr.12.2.310. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/cmrr.12.2.310>. Acesso em: 8 out. 2025.

LEMOS, M. S. C. de; HIGA JUNIOR, M. G.; PANIAGO, A. M. M.; MELHEM, M. de S. C.; TAKAHASHI, J. P. F.; FAVA, W. S.; VENANCIO, F. A.; MARTINS, N. M.; CHANG, M. R. Aspergillus in the Indoor Air of Critical Areas of a Tertiary Hospital in Brazil. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 10, n. 8, p. 538, n. 8, ago. 2024. DOI:

10.3390/jof10080538. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/10/8/538>. Acesso em: 27 mar. 2025.

LEONARDELLI, F.; THEILL, L.; NARDIN, M. E.; MACEDO, D.; DUDIUK, C.; MENDEZ, E.; GAMARRA, S.; GARCIA-EFFRON, G. First itraconazole resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolate harbouring a G54E substitution in Cyp51Ap in South America. **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. I.], v. 34, n. 1, p. 46–48, 1 jan. 2017. DOI: 10.1016/j.riam.2016.05.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140616300572>. Acesso em: 11 jun. 2024.

LESTRADE, P. P. A.; BUIL, J. B.; VAN DER BEEK, M. T.; KUIJPER, E. J.; VAN DIJK, K.; KAMPINGA, G. A.; RIJNDERS, B. J. A.; VONK, A. G.; DE GREEFF, S. C.; SCHOFFELEN, A. F.; VAN DISSEL, J.; MEIS, J. F.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. Paradoxal Trends in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in a National Multicenter Surveillance Program, the Netherlands, 2013–2018. **Emerging Infectious Diseases**, [S. I.], v. 26, n. 7, p. 1447–1455, jul. 2020. DOI: 10.3201/eid2607.200088. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7323544/>. Acesso em: 9 jun. 2024.

LOCKHART, S. R.; BEER, K.; TODA, M. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*: What You Need To Know. **Clinical Microbiology Newsletter**, [S. I.], v. 42, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2019.12.003>.

LOCKHART, S. R.; CHOWDHARY, A.; GOLD, J. A. W. The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. **Nature Reviews Microbiology**, [S. I.], v. 21, n. 12, p. 818–832, dez. 2023. DOI: 10.1038/s41579-023-00960-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-023-00960-9>. Acesso em: 20 mar. 2025.

LOCKHART, S. R.; GHANNOUM, M. A.; ALEXANDER, B. D. Establishment and Use of Epidemiological Cutoff Values for Molds and Yeasts by Use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. I.], v. 55, n. 5, p. 1262–1268, 25 abr. 2017. DOI: 10.1128/jcm.02416-16. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.02416-16>. Acesso em: 20 mar. 2025.

LOFGREN, L. A.; ROSS, B. S.; CRAMER, R. A.; STAJICH, J. E. The pan-genome of *Aspergillus fumigatus* provides a high-resolution view of its population structure revealing high levels of lineage-specific diversity driven by recombination. **PLOS Biology**, [S. I.], v. 20, n. 11, p. e3001890, 17 nov. 2022. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001890. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3001890>. Acesso em: 22 maio 2025.

LÜCKING, R.; AIME, M. C.; ROBBERTSE, B.; MILLER, A. N.; ARIYAWANSA, H. A.; AOKI, T.; CARDINALI, G.; CROUS, P. W.; DRUZHININA, I. S.; GEISER, D. M.; HAWKSWORTH, D. L.; HYDE, K. D.; IRINYI, L.; JEEWON, R.; JOHNSTON, P. R.; KIRK, P. M.; MALOSSO, E.; MAY, T. W.; MEYER, W.; ÖPIK, M.; ROBERT, V.; STADLER, M.; THINES, M.; VU, D.; YURKOV, A. M.; ZHANG, N.; SCHOCH, C. L. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? **IMA Fungus**, [S. I.], v. 11, n. 1, p. 14, dez. 2020.

DOI: 10.1186/s43008-020-00033-z. Disponível em:  
<https://IMAFungus.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43008-020-00033-z>. Acesso em: 28 out. 2025.

MACEDO, D.; BRITO DEVOTO, T.; POLA, S.; FINQUELIEVICH, J. L.; CUESTAS, M. L.; GARCIA-EFFRON, G. A Novel Combination of CYP51A Mutations Confers Pan-Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 64, n. 8, p. 10.1128/aac.02501-19, 22 jul. 2020. DOI: 10.1128/aac.02501-19. Disponível em:  
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02501-19>. Acesso em: 16 jun. 2024.

MAJIMA, H.; ARAI, T.; KUSUYA, Y.; TAKAHASHI, H.; WATANABE, A.; MIYAZAKI, Y.; KAMEI, K. Genetic differences between Japan and other countries in cyp51A polymorphisms of *Aspergillus fumigatus*. **Mycoses**, [S. I.], v. 64, n. 11, p. 1354–1365, 2021. DOI: 10.1111/myc.13370. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13370>. Acesso em: 11 mar. 2025.

MANN, P. A.; PARMEGIANI, R. M.; WEI, S.-Q.; MENDRICK, C. A.; LI, X.; LOEBENBERG, D.; DIDOMENICO, B.; HARE, R. S.; WALKER, S. S.; MCNICHOLAS, P. M. Mutations in *Aspergillus fumigatus* Resulting in Reduced Susceptibility to Posaconazole Appear To Be Restricted to a Single Amino Acid in the Cytochrome P450 14α-Demethylase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 47, n. 2, p. 577–581, fev. 2003. DOI: 10.1128/aac.47.2.577-581.2003. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.47.2.577-581.2003>. Acesso em: 22 abr. 2025.

MELLADO, E.; DIAZ-GUERRA, T. M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Identification of Two Different 14-α Sterol Demethylase-Related Genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. I.], v. 39, n. 7, p. 2431–2438, jul. 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88166/>. Acesso em: 9 ago. 2024.

MITTAL, N.; DUBEY, A.; DUBEY, A.; DUBEY, A. Microsatellite Markers- A New Practice of DNA Based Markers in Molecular Genetics. **Pharmacognosy Reviews**, [S. I.], v. 3, n. 6, p. 235–246, 2009.

MULLINS, J. G. L.; PARKER, J. E.; COOLS, H. J.; TOGAWA, R. C.; LUCAS, J. A.; FRAAIJE, B. A.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. Molecular Modelling of the Emergence of Azole Resistance in *Mycosphaerella graminicola*. **PLOS ONE**, [S. I.], v. 6, n. 6, p. e20973, 27 jun. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0020973. Disponível em:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020973>. Acesso em: 16 abr. 2025.

NEGRI, C. E.; GONÇALVES, S. S.; SOUSA, A. C. P.; BERGAMASCO, M. D.; MARTINO, M. D.; QUEIROZ-TELLES, F.; AQUINO, V. R.; CASTRO, P. de T. O.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; COLOMBO, A. L. Triazole Resistance Is Still Not Emerging in *Aspergillus fumigatus* Isolates Causing Invasive Aspergillosis in Brazilian Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 61, n. 11, p.

10.1128/aac.00608-17, 24 out. 2017. DOI: 10.1128/aac.00608-17. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00608-17>. Acesso em: 11 jun. 2024.

NGUYEN, L.-T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, [S. I.], v. 32, n. 1, p. 268–274, 1 jan. 2015. DOI: 10.1093/molbev/msu300. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>. Acesso em: 19 jun. 2025.

NORMAND, A.-C.; CASSAGNE, C.; GAUTIER, M.; BECKER, P.; RANQUE, S.; HENDRICKX, M.; PIARROUX, R. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. **BMC Microbiology**, [S. I.], v. 17, n. 1, p. 25, 31 jan. 2017. DOI: 10.1186/s12866-017-0937-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0937-2>. Acesso em: 12 abr. 2024.

PAGE, I. D.; BYANYIMA, R.; HOSMANE, S.; ONYACHI, N.; OPIRA, C.; RICHARDSON, M.; SAWYER, R.; SHARMAN, A.; DENNING, D. W. Chronic pulmonary aspergillosis commonly complicates treated pulmonary tuberculosis with residual cavitation. **The European Respiratory Journal**, [S. I.], v. 53, n. 3, p. 1801184, 19 mar. 2019. DOI: 10.1183/13993003.01184-2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6422837/>. Acesso em: 3 set. 2025.

PAPE, P. L.; LAVERGNE, R.-A.; MORIO, F.; ALVAREZ-MORENO, C. Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015 - Volume 22, Number 1—January 2016 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [S. I.], jan. 2016. DOI: 10.3201/eid2201.150978. Disponível em: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/1/15-0978\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/1/15-0978_article). Acesso em: 6 nov. 2025.

PATTERSON, T. F.; THOMPSON, G. R.; DENNING, D. W.; FISHMAN, J. A.; HADLEY, S.; HERBRECHT, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARR, K. A.; MORRISON, V. A.; NGUYEN, M. H.; SEGAL, B. H.; STEINBACH, W. J.; STEVENS, D. A.; WALSH, T. J.; WINGARD, J. R.; YOUNG, J.-A. H.; BENNETT, J. E. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [S. I.], v. 63, n. 4, p. e1–e60, 15 ago. 2016. DOI: 10.1093/cid/ciw326. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/63/4/e1/2595039>. Acesso em: 7 ago. 2024.

PAUL, R. A.; RUDRAMURTHY, S. M.; DHALIWAL, M.; SINGH, P.; GHOSH, A. K.; KAUR, H.; VARMA, S.; AGARWAL, R.; CHAKRABARTI, A. Magnitude of Voriconazole Resistance in Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus flavus* and Investigation into the Role of Multidrug Efflux Pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 62, n. 11, p. 10.1128/aac.01022-18, 24 out. 2018. DOI: 10.1128/aac.01022-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.01022-18>. Acesso em: 11 mar. 2025.

PERSON, A. K.; CHUDGAR, S. M.; NORTON, B. L.; TONG, B. C.; STOUT, J. E. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of Medical Microbiology**, [S. I.], v. 59, n. 7, p. 834–838, 2010. DOI: 10.1099/jmm.0.018309-0. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.018309-0>. Acesso em: 19 out. 2025.

PFALLER, M. A.; CARVALHAES, C. G.; CASTANHEIRA, M. Susceptibility patterns of amphotericin B, itraconazole, posaconazole, voriconazole and caspofungin for isolates causing invasive mould infections from the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2018–2021) and application of single-site epidemiological cutoff values to evaluate amphotericin B activity. **Mycoses**, [S. I.], v. 66, n. 10, p. 854–868, 2023. DOI: 10.1111/myc.13620. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13620>. Acesso em: 9 out. 2025.

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**, [S. I.], v. 49, n. 2, p. 586–590, fev. 2011. DOI: 10.1128/jcm.02136-10. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.02136-10>. Acesso em: 19 out. 2025.

PONTES, L.; ARAI, T.; GUALTIERI BERAQUET, C. A.; GIORDANO, A. L. P. L.; REICHERT-LIMA, F.; DA LUZ, E. A.; FERNANDA DE SÁ, C.; ORTOLAN LEVY, L.; TARARAM, C. A.; WATANABE, A.; MORETTI, M. L.; ZANINELLI SCHREIBER, A. Uncovering a Novel cyp51A Mutation and Antifungal Resistance in *Aspergillus fumigatus* through Culture Collection Screening. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 10, n. 2, p. 122, n. 2, fev. 2024. DOI: 10.3390/jof10020122. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/2309-608X/10/2/122>. Acesso em: 16 jun. 2024.

PONTES, L.; BERAQUET, C. A. G.; ARAI, T.; PIGOLLI, G. L.; LYRA, L.; WATANABE, A.; MORETTI, M. L.; SCHREIBER, A. Z. *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Carrying CYP51A with TR34/L98H/S297T/F495I Substitutions Detected after Four-Year Retrospective Azole Resistance Screening in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 64, n. 3, p. 10.1128/aac.02059-19, 21 fev. 2020. DOI: 10.1128/aac.02059-19. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.02059-19>. Acesso em: 11 jun. 2024.

PONTES, L.; GUALTIERI BERAQUET, C. A.; ARAI, T.; WATANABE, A.; MORETTI, M. L.; SCHREIBER, A. Z. Selection of *Aspergillus fumigatus* isolates carrying the G448S substitution in CYP51A gene after long-term treatment with voriconazole in an immunocompromised patient. **Medical Mycology Case Reports**, [S. I.], v. 36, p. 5–9, 1 jun. 2022. DOI: 10.1016/j.mmcr.2022.02.002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211753922000094>. Acesso em: 20 jun. 2024.

PONTES, L.; PERINI LEME GIORDANO, A. L.; REICHERT-LIMA, F.; GUALTIERI BERAQUET, C. A.; LEITE PIGOLLI, G.; ARAI, T.; RIBEIRO, J. D.; GONÇALVES, A. C.; WATANABE, A.; GOLDMAN, G. H.; MORETTI, M. L.; ZANINELLI SCHREIBER, A. Insights into *Aspergillus fumigatus* Colonization in Cystic Fibrosis and Cross-Transmission between Patients and Hospital Environments. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 10, n. 7, p. 461, n. 7, jul. 2024. DOI: 10.3390/jof10070461. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/2309-608X/10/7/461>. Acesso em: 27 mar. 2025.

QIAO, J.; KONTOYIANNIS, D. P.; WAN, Z.; LI, R.; LIU, W. Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species. **Medical Mycology**, [S. I.], v. 45, n. 7, p. 589–593, 1 nov. 2007. DOI: 10.1080/13693780701397673. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13693780701397673>. Acesso em: 12 jun. 2025.

REDMAN, M.; KING, A.; WATSON, C.; KING, D. What is CRISPR/Cas9? [S. I.], Seção Research in practice, 1 ago. 2016. DOI: 10.1136/archdischild-2016-310459. Disponível em: <https://ep.bmjjournals.org/content/101/4/213.full>. Acesso em: 13 mar. 2025.

REICHERT-LIMA, F.; LYRA, L.; PONTES, L.; MORETTI, M. L.; PHAM, C. D.; LOCKHART, S. R.; SCHREIBER, A. Z. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, [S. I.], v. 61, n. 6, p. 360–365, 2018. DOI: 10.1111/myc.12759. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.12759>. Acesso em: 8 out. 2025.

REN, J.; JIN, X.; ZHANG, Q.; ZHENG, Y.; LIN, D.; YU, Y. Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. **Journal of Hazardous Materials**, [S. I.], v. 326, p. 54–60, 15 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.12.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389416311451>. Acesso em: 16 abr. 2025.

RESENDIZ-SHARPE, A.; DEWAELE, K.; MERCKX, R.; BUSTAMANTE, B.; VEGA-GOMEZ, M. C.; ROLON, M.; JACOBS, J.; VERWEIJ, P. E.; MAERTENS, J.; LAGROU, K. Triazole-Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* in Latin American and African Countries. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 7, n. 4, p. 292, n. 4, abr. 2021. DOI: 10.3390/jof7040292. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/4/292>. Acesso em: 20 jun. 2024.

RESENDIZ-SHARPE, A.; HOKKEN, M. W. J.; MERCIER, T.; MERCKX, R.; VERHAGEN, K.; DEWITTE, L.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.; MAERTENS, J.; LAGROU, K. Hmg1 Gene Mutation Prevalence in Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 6, n. 4, p. 227, 16 out. 2020. DOI: 10.3390/jof6040227. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/4/227>. Acesso em: 29 fev. 2024.

RHODES, J.; ABDOLRASOULI, A.; DUNNE, K.; SEWELL, T. R.; ZHANG, Y.; BALLARD, E.; BRACKIN, A. P.; VAN RHIJN, N.; CHOWN, H.; TSITSOPOULOU, A.; POSSO, R. B.; CHOTIRMALL, S. H.; MCELVANEY, N. G.; MURPHY, P. G.; TALENT, A. F.; RENWICK, J.; DYER, P. S.; SZEKELY, A.; BOWYER, P.; BROMLEY, M. J.; JOHNSON, E. M.; LEWIS WHITE, P.; WARRIS, A.; BARTON, R. C.; SCHELENZ, S.; ROGERS, T. R.; ARMSTRONG-JAMES, D.; FISHER, M. C. Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. **Nature Microbiology**, [S. I.], v. 7, n. 5, p. 663–674, maio 2022. DOI: 10.1038/s41564-022-01091-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-022-01091-2>. Acesso em: 20 jul. 2024.

RISUM, M.; HARE, R. K.; GERTSEN, J. B.; KRISTENSEN, L.; ROSENVINGE, F. S.; SULIM, S.; ABOU-CHAKRA, N.; BANGSBORG, J.; RØDER, B. L.; MARMOLIN, E.

S.; ASTVAD, K. M. T.; PEDERSEN, M.; DZAJIC, E.; ANDERSEN, S. L.; ARENDRUP, M. C. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. The first 2-year's Data from the Danish National Surveillance Study, 2018–2020. **Mycoses**, [S. I.], v. 65, n. 4, p. 419–428, abr. 2022. DOI: 10.1111/myc.13426. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.13426>. Acesso em: 29 fev. 2024.

RISUM, M.; HARE, R. K.; GERTSEN, J. B.; KRISTENSEN, L.; ROSENVINGE, F. S.; SULIM, S.; ABOU-CHAKRA, N.; BANGSBORG, J.; RØDER, B. L.; MARMOLIN, E. S.; ASTVAD, K. M. T.; PEDERSEN, M.; DZAJIC, E.; ANDERSEN, S. L.; ARENDRUP, M. C. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. The first 2-year's Data from the Danish National Surveillance Study, 2018–2020. **Mycoses**, [S. I.], v. 65, n. 4, p. 419–428, 2022. <https://doi.org/10.1111/myc.13426>.

RUDRAMURTHY, S. M.; PAUL, R. A.; CHAKRABARTI, A.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. F. Invasive Aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management. **Journal of Fungi**, [S. I.], v. 5, n. 3, p. 55, set. 2019. DOI: 10.3390/jof5030055. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/5/3/55>. Acesso em: 19 out. 2025.

SAAD, B. A. A.; DE OLIVEIRA, C. T. F.; FAVA, W. S.; LACERDA, M. L. G. G.; BERTUCCI, A. A.; MOTTI, P. R.; AMORIM, B. C.; DE OLIVEIRA, S. M. do V. L.; MELHEM, M. de S. C.; VENTURINI, J.; VOLPE-CHAVES, C. E.; PANIAGO, A. M. M. Fatal *Aspergillus tubingensis* Infection in an H3N2 Influenza Case in Brazil. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 190, n. 5, p. 70, 12 ago. 2025. <https://doi.org/10.1007/s11046-025-00983-1>.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBREAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, [S. I.], v. 78, p. 141–173, jun. 2014. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260807/>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SEWELL, T. R.; ZHANG, Y.; BRACKIN, A. P.; SHELTON, J. M. G.; RHODES, J.; FISHER, M. C. Elevated Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Urban versus Rural Environments in the United Kingdom. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. I.], v. 63, n. 9, p. 10.1128/aac.00548-19, 23 ago. 2019. DOI: 10.1128/aac.00548-19. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00548-19>. Acesso em: 19 ago. 2025.

SHARMA, C.; HAGEN, F.; MOROTI, R.; MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A. Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. I.], v. 3, n. 2, p. 69–74, jun. 2015. DOI: 10.1016/j.jgar.2015.01.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716515000077>. Acesso em: 30 set. 2025.

SILVA, D.; SANTOS, G.; BARROCA, M.; COLLINS, T. Inverse PCR for Point Mutation Introduction. In: DOMINGUES, L. (org.). **PCR: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer, 2017. p. 87–100. DOI: 10.1007/978-1-4939-7060-5\_5.

Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_5). Acesso em: 9 abr. 2025.

SIOPI, M.; RIVERO-MENENDEZ, O.; GKOTYSIS, G.; PANARA, A.; THOMAIDIS, N. S.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; POURNARAS, S.; MELETIADIS, J. Nationwide surveillance of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* environmental isolates in Greece: detection of pan-azole resistance associated with the TR46/Y121F/T289A cyp51A mutation. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. I.], v. 75, n. 11, p. 3181–3188, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa316>.

SNELDERS, E.; CAMPS, S. M. T.; KARAWAJCZYK, A.; SCHAFTEAAR, G.; KEMA, G. H. J.; LEE, H. A. van der; KLAASSEN, C. H.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PLOS ONE**, [S. I.], v. 7, n. 3, p. e31801, 1 mar. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0031801. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031801>. Acesso em: 15 abr. 2025.

SNELDERS, E.; HUIS IN 'T VELD, R. A. G.; RIJS, A. J. M. M.; KEMA, G. H. J.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 75, n. 12, p. 4053–4057, 15 jun. 2009. DOI: 10.1128/AEM.00231-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00231-09>. Acesso em: 29 fev. 2024.

SONG, J.; ZHANG, S.; LU, L. Fungal cytochrome P450 protein Cyp51: What we can learn from its evolution, regulons and Cyp51-based azole resistance. **Fungal Biology Reviews**, [S. I.], v. 32, n. 3, p. 131–142, 1 jun. 2018. DOI: 10.1016/j.fbr.2018.05.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174946131730091X>. Acesso em: 11 mar. 2025.

TAKAHASHI, H.; OIKI, S.; KUSUYA, Y.; URAYAMA, S.; HAGIWARA, D. Intimate genetic relationships and fungicide resistance in multiple strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from a plant bulb. **Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 23, n. 9, p. 5621–5638, 2021. DOI: 10.1111/1462-2920.15724. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1462-2920.15724>. Acesso em: 13 mar. 2025.

TAKEDA, K.; SUZUKI, J.; SASAKI, Y.; WATANABE, A.; KAMEI, K. Importance of Accurate Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* Species in Clinical Settings. **Medical Mycology Journal**, [S. I.], v. 64, n. 4, p. 95–98, 31 out. 2023. DOI: 10.3314/mmj.23-004. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/mmj/64/4/64\\_95/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/mmj/64/4/64_95/_article). Acesso em: 28 out. 2025.

TAKEDA, K.; SUZUKI, J.; WATANABE, A.; SEKIGUCHI, R.; SANO, T.; WATANABE, M.; NARUMOTO, O.; KAWASHIMA, M.; FUKAMI, T.; SASAKI, Y.; TAMURA, A.; NAGAI, H.; MATSUI, H.; KAMEI, K. The accuracy and clinical impact of the morphological identification of *Aspergillus* species in the age of cryptic species: A single-centre study. **Mycoses**, [S. I.], v. 65, n. 2, p. 164–170, 2022. DOI:

10.1111/myc.13397. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.13397>. Acesso em: 1 set. 2025.

TAMIYA, H.; OCHIAI, E.; KIKUCHI, K.; YAHIRO, M.; TOYOTOME, T.; WATANABE, A.; YAGUCHI, T.; KAMEI, K. Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, and *Aspergillus viridinutans*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 385–391, 1 maio 2015. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.01.005. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X15000203>. Acesso em: 10 nov. 2023.

TOYOTOME, T.; ONISHI, K.; SATO, M.; KUSUYA, Y.; HAGIWARA, D.; WATANABE, A.; TAKAHASHI, H. Identification of Novel Mutations Contributing to Azole Tolerance of *Aspergillus fumigatus* through In Vitro Exposure to Tebuconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 65, n. 9, p. 10.1128/aac.02657-20, 17 ago. 2021. DOI: 10.1128/aac.02657-20. Disponível em:  
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02657-20>. Acesso em: 15 abr. 2025.

TREVÍÑO-RANGEL, R. de J.; VILLANUEVA-LOZANO, H.; BONIFAZ, A.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; ANDRADE, A.; BECERRIL-GARCÍA, M. A.; MARTÍNEZ-RESÉNDEZ, M. F.; AYALA-GAYTÁN, J.; MONTOYA, A. M.; GONZÁLEZ, G. M. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Aspergillus* isolates from clinical specimens and soil samples in Mexico. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 59, n. 10, p. 1006–1014, 1 out. 2021. DOI: 10.1093/mmy/myab031. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myab031>. Acesso em: 8 out. 2025.

TRIFINOPoulos, J.; NGUYEN, L.-T.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W232–W235, 8 jul. 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw256. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>. Acesso em: 23 jul. 2024.

UFFREDI, M. L.; MANGIAPAN, G.; CADRANEL, J.; KAC, G. Significance of *Aspergillus fumigatus* Isolation from Respiratory Specimens of Nongranulocytopenic Patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 457–462, 1 ago. 2003. DOI: 10.1007/s10096-003-0970-y. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-003-0970-y>. Acesso em: 3 set. 2025.

ULLOA-AVELLÁN, O.; CALDERÓN-HERNÁNDEZ, A.; RUBÍ-CHACÓN, R.; VARGAS-LEITÓN, B. *Aspergillus* spp. Isolated from Lungs of Poultry (*Gallus gallus*) at the Mycology Laboratory, School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica between 2008 and 2021 and Associated Factors. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 58, n. 1, jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9010058>.

UMEYAMA, T.; HAYASHI, Y.; SHIMOSAKA, H.; INUKAI, T.; YAMAGOE, S.; TAKATSUKA, S.; HOSHINO, Y.; NAGI, M.; NAKAMURA, S.; KAMEI, K.; OGAWA, K.; MIYAZAKI, Y. CRISPR/Cas9 Genome Editing To Demonstrate the Contribution of Cyp51A Gly138Ser to Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 62, n. 9, p. 10.1128/aac.00894-18, 27 ago.

2018. DOI: 10.1128/aac.00894-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00894-18>. Acesso em: 3 abr. 2025.

VEERDONK, F. L.; GRESNIGT, M. S.; ROMANI, L.; NETEA, M. G.; LATGÉ, J.-P. *Aspergillus fumigatus morphology and dynamic host interactions*. **Nature Reviews Microbiology**, [S. I.], v. 15, n. 11, p. 661–674, nov. 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.90. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.90>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VERMEULEN, E.; MAERTENS, J.; MEERSSEMAN, P.; SAEGEMAN, V.; DUPONT, L.; LAGROU, K. Invasive *Aspergillus niger* complex infections in a Belgian tertiary care hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. I.], v. 20, n. 5, p. O333–O335, 1 maio 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12394. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14600975>. Acesso em: 19 out. 2025.

VERWEIJ, P. E.; ANANDA-RAJAH, M.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C.; BRÜGGEMANN, R. J.; CHOWDHARY, A.; CORNELY, O. A.; DENNING, D. W.; GROLL, A. H.; IZUMIKAWA, K.; KULLBERG, B. J.; LAGROU, K.; MAERTENS, J.; MEIS, J. F.; NEWTON, P.; PAGE, I.; SEYEDMOUSAVID, S.; SHEPPARD, D. C.; VISCOLI, C.; WARRIS, A.; DONNELLY, J. P. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resistance Updates**, [S. I.], v. 21–22, p. 30–40, 1 jul. 2015. DOI: 10.1016/j.drup.2015.08.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764615000357>. Acesso em: 9 out. 2025.

VERWEIJ, P. E.; SNELDERS, E.; KEMA, G. H.; MELLADO, E.; MELCHERS, W. J. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? **The Lancet Infectious Diseases**, [S. I.], v. 9, n. 12, p. 789–795, dez. 2009. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70265-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309909702658>. Acesso em: 11 mar. 2025.

VIDAL-ACUÑA, M. R.; RUIZ, M.; TORRES, M. J.; AZNAR, J. Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of cryptic species of the genus *Aspergillus* isolated in clinical samples. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [S. I.], v. 37, n. 5, p. 296–300, 1 maio 2019. DOI: 10.1016/j.eimc.2018.07.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X18302544>. Acesso em: 8 out. 2025.

VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; KOCSUBÉ, S.; FRISVAD, J. C.; HUBKA, V.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other Eurotiales species. **Studies in Mycology**, [S. I.], v. 107, p. 1–66, mar. 2024. DOI: 10.3114/sim.2024.107.01. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11003441/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

WALSH, T. H.; HAYDEN, R. T.; LARONE, D. **Larone's Medically Important Fungi**. [S. I.]: ASM Press, 2018. Disponível em: <https://mail.google.com/mail/u/0/#search/laron/QgrcJHrtsHHmFQsSwqMnhsqjPZFJNFDZIgQ?projector=1&messagePartId=0.1>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WANG, C.; MILLER, N.; VINES, D.; SEVERNS, P. M.; MOMANY, M.; BREWER, M. T. Azole resistance mechanisms and population structure of the human pathogen *Aspergillus fumigatus* on retail plant products. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 90, n. 5, p. e02056-23, 23 abr. 2024. DOI: 10.1128/aem.02056-23. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.02056-23>. Acesso em: 28 out. 2025.

WATANABE, K.; YAGUCHI, T.; HIROSE, D. Ubiquitous Distribution of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*- Related Species in Outdoor Environments in Japan. **Medical Mycology Journal**, [S. I.], v. 62, n. 4, p. 71–78, 2021. DOI: 10.3314/mmj.21-00014. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/mmj/62/4/62\\_21-00014/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/mmj/62/4/62_21-00014/_article). Acesso em: 18 out. 2025.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. I.], v. 93, n. 3, p. 965–974, 1 fev. 2012. DOI: 10.1007/s00253-011-3783-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>. Acesso em: 21 jul. 2024.

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERNAN, W. C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. I.], v. 22, n. 4, p. 194–202, 1 dez. 2005. DOI: 10.1016/S1130-1406(05)70043-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140605700437>. Acesso em: 19 out. 2025.

ZBINDEN, A.; IMHOF, A.; WILHELM, M. j.; RUSCHITZKA, F.; WILD, P.; BLOEMBERG, G. v.; MUELLER, N. j. Fatal outcome after heart transplantation caused by *Aspergillus lentulus*. **Transplant Infectious Disease**, [S. I.], v. 14, n. 5, p. E60–E63, 2012. DOI: 10.1111/j.1399-3062.2012.00779.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3062.2012.00779.x>. Acesso em: 18 out. 2025.

ZHANG, J.; LI, L.; LV, Q.; YAN, L.; WANG, Y.; JIANG, Y. The Fungal CYP51s: Their Functions, Structures, Related Drug Resistance, and Inhibitors. **Frontiers in Microbiology**, [S. I.], v. 10, 24 abr. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00691. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00691/full>. Acesso em: 23 ago. 2025.

ZHOU, D.; KORFANTY, G. A.; MO, M.; WANG, R.; LI, X.; LI, H.; LI, S.; WU, J.-Y.; ZHANG, K.-Q.; ZHANG, Y.; XU, J. Extensive Genetic Diversity and Widespread Azole Resistance in Greenhouse Populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. **mSphere**, [S. I.], v. 6, n. 1, p. e00066-21, 24 fev. 2021. DOI: 10.1128/mSphere.00066-21. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00066-21>. Acesso em: 28 out. 2025.

ZHOU, D.; WANG, R.; LI, X.; PENG, B.; YANG, G.; ZHANG, K.-Q.; ZHANG, Y.; XU, J. Genetic Diversity and Azole Resistance Among Natural *Aspergillus fumigatus* Populations in Yunnan, China. **Microbial Ecology**, [S. I.], v. 83, n. 4, p. 869–885,

maio 2022. DOI: 10.1007/s00248-021-01804-w. Disponível em:  
<https://link.springer.com/10.1007/s00248-021-01804-w>. Acesso em: 28 out. 2025.

ZORAN, T.; SARTORI, B.; SAPPL, L.; AIGNER, M.; SÁNCHEZ-REUS, F.; REZUSTA, A.; CHOWDHARY, A.; TAJ-ALDEEN, S. J.; ARENDRUP, M. C.; OLIVERI, S.; KONTOYIANNIS, D. P.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; LAGROU, K.; CASCIO, G. L.; MEIS, J. F.; BUZINA, W.; FARINA, C.; DROGARI-APIRANTHITOU, M.; GRANCINI, A.; TORTORANO, A. M.; WILLINGER, B.; HAMPRECHT, A.; JOHNSON, E.; KLINGSPOR, L.; ARSIC-ARSENIEVIC, V.; CORNELY, O. A.; MELETIADIS, J.; PRAMMER, W.; TULLIO, V.; VEHRESCHILD, J.-J.; TROVATO, L.; LEWIS, R. E.; SEGAL, E.; RATH, P.-M.; HAMAL, P.; RODRIGUEZ-IGLESIAS, M.; ROILIDES, E.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; CHAKRABARTI, A.; COLOMBO, A. L.; FERNÁNDEZ, M. S.; MARTIN-GOMEZ, M. T.; BADALI, H.; PETRIKKOS, G.; KLIMKO, N.; HEIMANN, S. M.; UZUN, O.; ROUBARY, M.; DE LA FUENTE, S.; HOUBREAKEN, J.; RISSLECKER, B.; LASS-FLÖRL, C.; LACKNER, M. Azole-Resistance in *Aspergillus terreus* and Related Species: An Emerging Problem or a Rare Phenomenon? **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, 28 mar. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00516. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.00516/full>. Acesso em: 27 set. 2025.

## APÊNDICES

### Apêndice 1 – Lista de primers usados nas reações de PCR

Primer	Sequencia (5' to 3')	Aplicação
2A_F	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	<i>BenA</i> β-tubulina
2B_R	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	<i>BenA</i> β-tubulina
CDM 5_F	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	<i>CAM</i> Camodulina
CDM 6_R	CCGATAGAGGTATAACGTGG	<i>CAM</i> Camodulina
<i>cyp51A</i> _SQ1F	GAAGCGGTTAAGGCAGGAATAGACG	<i>cyp51A</i>
<i>cyp51A</i> _SQ2F	GAATAATTTACACTGTTCTCCTCTAG	<i>cyp51A</i>
<i>cyp51A</i> _SQ3F	GGTGCCGATGCTATGGCTTACGGCCTAC	<i>cyp51A</i>
<i>cyp51A</i> _SQ4F	CGGATCGGACGTGGTGTATGATTG	<i>cyp51A</i>
<i>cyp51A</i> _SQ5F	CTTGACGGTGACAAGGACTCTCAG	<i>cyp51A</i>
<i>cyp51A</i> _SQ6F	CGCGTGCTCCTGCTTACCTGGAG	<i>cyp51A</i>
<i>cyp51A</i> _R	CAGGTTTCGACGAGCTTCTCC	<i>cyp51A</i>
2A_FW	GGACTGTCGACAAGACCGTCGCC	Microssatélites
2A_RV	GACCTCCAGGCAAAATGAGA	Microssatélites
2B_FW	GCCGCCGGCCAGAACGACGCTCC	Microssatélites
2B_RV	GAGATCATGCCAAGGATGT	Microssatélites
2C_FW	GAATAACTCGACGACGGACTGGATGC	Microssatélites
2C_RV	AACCGTCCTAGAATGTTGC	Microssatélites
3A_FW	CTCCGTCTCGTCTGCCGATGC	Microssatélites
3A_RV	GTACCGCTGCAAAGGACAGT	Microssatélites
3B_FW	GGCTACCTGCTAAGCAAGGTTG	Microssatélites
3B_RV	GAGGTACCACAACACAGCACA	Microssatélites
3C_FW	GATTAGCAGGAGAGTGGTCGAGG	Microssatélites
3C_RV	GTACACAAAGGGTGGATGG	Microssatélites
4A_FW	GTAGAGCTCGTACTGCCGGTTG	Microssatélites
4A_RV	GACCCAGCGCCTATAAATCA	Microssatélites
4B_FW	CTGACATGAACATGCATCAATGCC	Microssatélites
4B_RV	SGAAGGCTCTACCCTCAATCT	Microssatélites
4C_FW	CTGGCGAGAGAAAGCCACTCTTG	Microssatélites
4C_RV	ATCCAACCCATCCAATTCTGAA	Microssatélites
LFH3	GTTGTCGACGGCCATCTAGGCCAGTTTGATAGTCTCAAAAGTCAG	Construção do <i>repair template</i>

LFH6	GATATCGGCCTGAGTGGCCTCCAGGTTTCGACCGAGCTTCTCC	Construção do <i>repair templade</i>
Mut1-3	CGGCCATATACGCGGTAAAGCCATAGCATCGGCAC	Construção do <i>repair templade</i>
Mut1-5	GGCTTACCGCGTATATGCCGTTGCGGTGCTGAC	Construção do <i>repair templade</i>
Mut2-3	AGTCAGTCTCTGGCACTCCTTCTTCCATCCAC	Construção do <i>repair templade</i>
Mut2-5	AAGGAGTGCCAGAGACTGACTATTCCATCCCTC	Construção do <i>repair templade</i>
LFH1	GCGAGCCATGCTGGGAGGAATCTC	Construção do <i>repair templade</i>
LFH4	CGTATTGGTGAGCTGATGATCATC	Construção do <i>repair templade</i>
HPH-5	GAGGCCACTCAGGCCGATATCACC	Construção do <i>repair templade</i>
HPH-3	CTGGCCTAGATGGCCGTCGACAAAC	Construção do <i>repair templade</i>

**Apêndice 2 – Dados de concentração inibitória mínima, espécie e origem biológica dos 153 isolados de *Aspergillus* spp.**

ISOLADOS CLÍNICOS							AMOSTRA BIOLÓGICA
ID CMMS	VOR	POS	ITC	TEB	ISA	ESPÉCIE	
8	0,5	0,06	0,12	0,03	0,12	<i>A. niger</i>	Escarro
9	0,25	0,12	0,12	0,06	0,5	<i>A. niger</i>	Escarro
10	0,5	0,03	0,015	0,06	0,5	<i>A. tubingensis</i>	Aspirado traqueal
11	2	0,06	1	4	1	<i>A. tubingensis</i>	Escarro
12	1	0,12	0,5	0,03	0,5	<i>A. tubingensis</i>	Escarro
13	1	0,12	0,015	1	1	<i>A. tubingensis</i>	Escarro
14	0,12	0,03	0,5	1	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
6	1	0,03	0,5	0,03	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Biópsia
15	0,5	0,03	0,015	2	ND	<i>A. flavus</i>	Aspirado traqueal
151	0,25	0,12	0,06	0,03	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
16	0,12	0,03	0,015	0,03	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
17	0,3	0,015	0,03	0,03	0,06	<i>A. aculeatus</i>	Escarro
18	1	0,015	0,5	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
19	1	0,06	0,5	0,03	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
20	0,12	0,06	0,015	0,12	0,5	<i>A. fumigatus</i>	LCR
152	0,25	0,015	0,25	1	2	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
21	0,5	0,12	0,015	0,12	2	<i>A. niger</i>	Escarro
22	0,5	0,12	0,12	2	1	<i>A. flavus</i>	Aspirado traqueal
23	1	0,12	16	0,12	1	<i>A. pseudoluchensis</i>	Aspirado traqueal
24	0,12	0,06	0,06	2	0,5	<i>A. tubingensis</i>	Não determinado
26	1	0,03	0,015	0,12	2	<i>A. luchensis</i>	Escarro
27	0,5	0,12	0,03	2	0,5	<i>A. flavus</i>	Escarro
28	0,5	0,12	0,5	0,12	1	<i>A. niger</i>	Aspirado traqueal
29	1	0,06	0,12	4	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
30	0,5	0,03	0,015	0,03	0,12	<i>A. flavus</i>	Escarro
31	0,25	0,12	0,015	0,03	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
32	1	0,06	0,06	0,03	0,25	<i>A. flavus</i>	Aspirado traqueal
33	0,25	0,06	0,06	0,03	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
34	0,5	0,12	0,03	0,03	0,25	<i>A. tamarii</i>	Aspirado traqueal
35	1	0,12	0,03	0,03	0,5	<i>A. flavus</i>	Aspirado traqueal
36	0,25	0,06	0,03	0,03	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
37	1	0,12	0,5	4	0,5	<i>A. tubingensis</i>	Frag. PLeural
38	1	0,015	0,03	0,03	1	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
39	1	0,06	0,06	0,03	1	<i>A. flavus</i>	Sangue
40	0,5	0,015	0,06	0,03	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
41	0,5	0,03	0,03	0,03	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Líquido Pleural
42	1	0,015	0,015	0,03	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Líquido Pleural
43	0,03	0,015	0,015	0,03	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal

44	0,5	0,03	0,015	0,03	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
45	1	0,03	0,015	0,03	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
153	0,25	0,25	0,25	0,03	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
46	0,5	0,03	0,015	0,03	0,5	<i>A. pseudocaelatus</i>	Escarro
47	1	0,06	0,03	2	1	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
48	0,5	0,015	0,015	0,03	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
49	0,25	0,06	0,06	0,12	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
50	1	0,25	8	4	2	<i>A. tubingensis</i>	Escarro
51	4	0,03	0,03	0,03	8	<i>A. lentulus</i>	Aspirado traqueal
52	0,25	0,12	0,03	0,03	1	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
53	0,5	0,015	0,06	0,03	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
54	4	0,06	0,5	2	2	<i>A. lentulus</i>	Escarro
55	1	0,03	0,015	1	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
56	1	0,06	0,015	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
57	0,25	0,12	0,015	1	1	<i>A. fumigatus</i>	LCR
58	0,12	0,25	16	4	2	<i>A. tubingensis</i>	Fragmento Osseo
59	1	0,015	0,015	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
60	0,03	0,25	0,06	2	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
61	1	0,12	0,03	16	1	<i>A. acrenus</i>	Escarro
62	2	0,015	0,06	2	0,25	<i>A. tamarii</i>	Aspirado traqueal
63	0,25	0,12	0,06	0,03	1	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
64	1	0,25	16	2	1	<i>A. niger</i>	Escarro
65	1	0,06	0,03	2	0,5	<i>A. niger</i>	Líquido pleural
66	1	0,25	4	2	1	<i>A. niger</i>	Escarro
67	0,25	0,25	0,12	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
68	2	0,12	0,12	2	0,5	<i>A. tubingensis</i>	Escarro
69	1	0,06	0,06	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>	LCR
70	0,5	0,03	0,06	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
71	0,5	0,015	0,03	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
72	0,5	0,25	0,25	4	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
154	4	0,06	>16	4	2	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
73	0,5	0,25	16	2	1	<i>A. flavus</i>	Escarro
74	1	0,12	0,03	2	1	<i>A. niger</i>	Escarro
75	0,25	0,12	0,25	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
80	1	0,12	0,25	0,12	0,25	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
81	0,5	0,12	0,03	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
89	2	0,06	1	4	0,5	<i>A. terreus</i>	Escarro
92	0,25	0,06	0,03	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
94	0,5	0,25	0,25	2	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
95	ND	ND	0,25	ND	1	<i>A. clavatus</i>	Escarro
98	0,5	0,12	0,03	0,5	1	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal
181	1	0,12	0,5	2	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
182	0,5	0,25	0,25	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro

202	0,5	0,12	0,25	2	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
204	1	0,06	0,25	1	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
206	0,5	0,06	0,25	2	1	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
228	0,5	0,12	0,12	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro
229	0,5	0,25	0,25	2	1	<i>A. fumigatus</i>	Aspirado traqueal

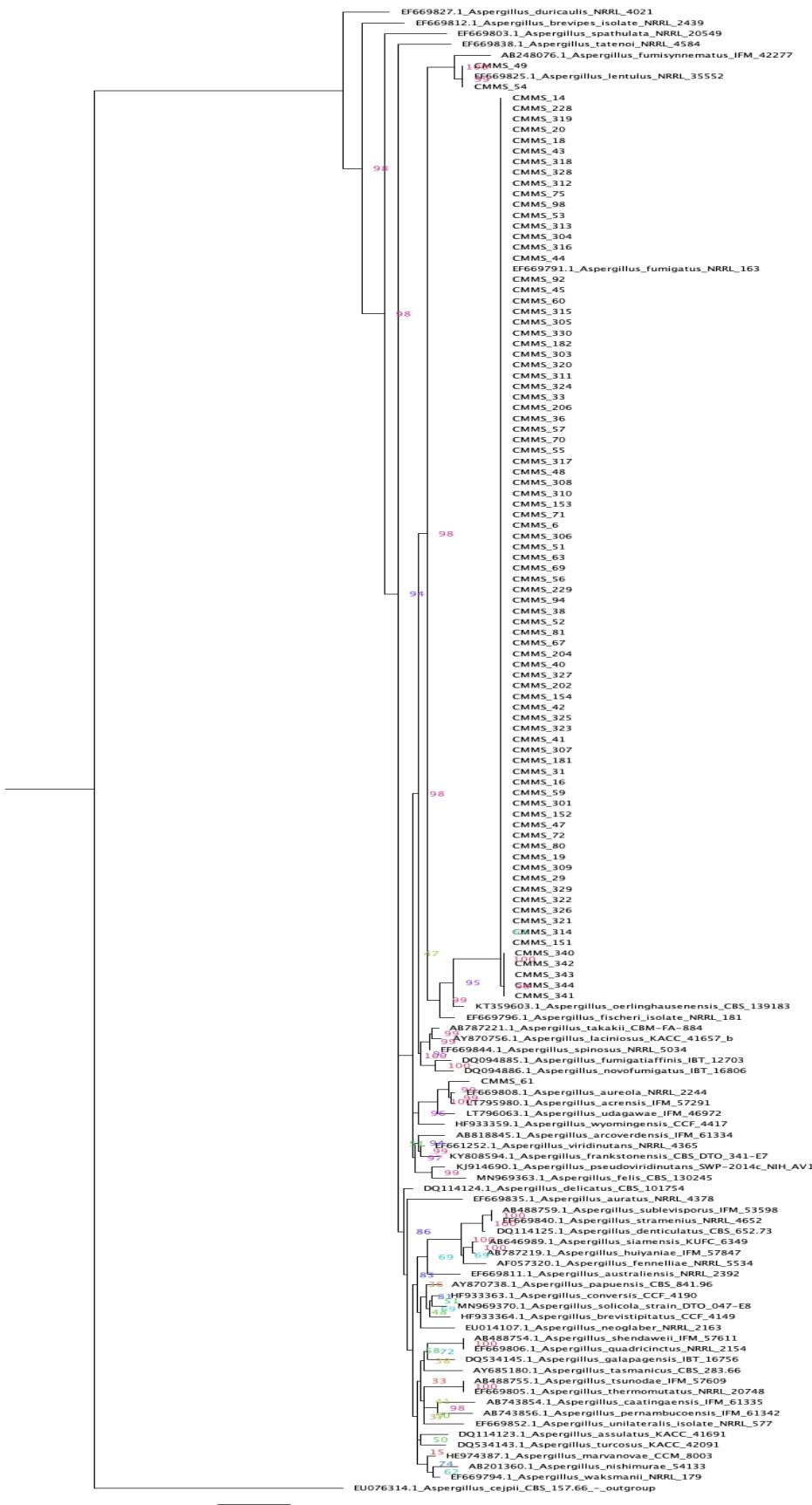
### ISOLADOS AMBIENTAIS DE AR ATMOSFÉRICO

ID CMMS	VOR	POS	ITC	TBZ	ISA	Espécie
169	0,5	0,06	0,12	1	0,5	<i>A. niger</i>
170	0,5	0,06	0,12	2	0,5	<i>A. niger</i>
171	0,12	0,03	0,25	0,5	0,25	<i>A. flavus</i>
172	0,5	ND	0,12	2	1	<i>A. niger</i>
173	0,12	ND	0,25	0,5	0,25	<i>A. flavus</i>
174	0,5	0,06	0,12	1	0,5	<i>A. niger</i>
175	ND	0,25	0,25	1	0,5	<i>A. niger</i>
176	ND	ND	ND	1	1	<i>A. niger</i>
177	0,5	0,06	0,25	1	0,5	<i>A. niger</i>
178	0,25	0,03	0,03	1	0,12	<i>A. tamarii</i>
179	0,12	0,03	0,25	1	0,5	<i>A. flavus</i>
180	0,25	ND	0,25	1	ND	<i>Aspergillus sp.</i>
183	0,25	0,03	0,03	0,03	4	<i>A. japonicus</i>
184	0,5	0,06	0,5	2	0,25	<i>A. tubingensis</i>
185	2	0,06	1	2	0,25	<i>A. pseudodeflectus</i>
186	8	2	16	0,5	2	<i>A. pseudodeflectus</i>
187	0,25	0,03	0,25	2	0,12	<i>A. pseudocaelatus</i>
188	0,03	0,03	0,03	0,03	0,12	<i>A. brunneoviolaceus</i>
189	0,12	0,12	0,12	0,5	0,5	<i>A. alabamensis</i>
190	0,25	0,03	0,12	2	0,5	<i>A. recifensis</i>
191	0,12	0,03	0,25	2	0,5	<i>A. parasiticus</i>
192	0,5	0,06	0,03	1	0,25	<i>A. parasiticus</i>
193	0,5	0,06	0,12	0,12	0,5	<i>A. flavus</i>
194	0,25	0,06	0,12	1	0,25	<i>A. parasiticus</i>
195	0,5	0,12	0,5	1	0,5	<i>A. niger</i>
196	1	0,12	16	4	1	<i>A. tubingensis</i>
197	0,5	0,06	0,5	1	0,25	<i>Aspergillus sp.</i>
198	1	0,25	1	4	2	<i>A. luchensis</i>
199	0,5	0,06	0,5	2	0,5	<i>A. flavus</i>
200	0,5	0,12	0,12	0,25	1	<i>A. alabamensis</i>
201	0,25	0,06	0,03	1	0,25	<i>A. flavus</i>
205	0,25	0,03	0,03	0,5	0,12	<i>A. pseudocaelatus</i>
207	0,25	0,03	0,03	1	0,25	<i>A. flavus</i>
301	0,25	0,25	0,12	1	0,25	<i>A. fumigatus</i>
303	0,12	0,06	0,5	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>
304	0,25	0,06	0,12	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>

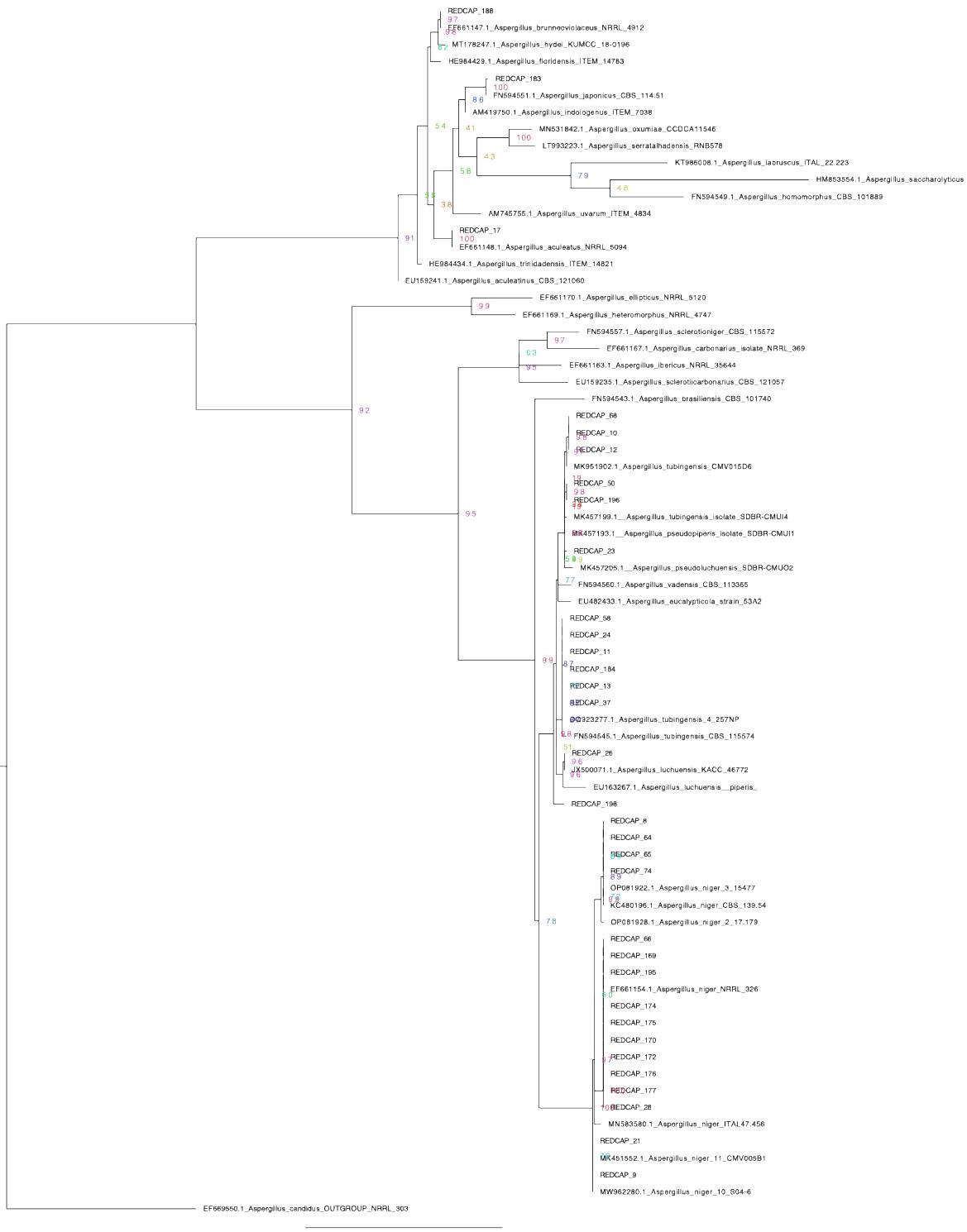
305	0,5	0,06	0,03	0,5	0,25	<i>A. fumigatus</i>
306	0,5	0,06	0,12	2	0,25	<i>A. fumigatus</i>
307	0,25	0,25	0,5	0,12	0,5	<i>A. fumigatus</i>
308	0,25	0,12	0,25	1	0,06	<i>A. fumigatus</i>
309	1	0,12	0,25	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>
310	0,5	0,12	0,25	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>
311	ND	0,12	0,5	1	ND	<i>A. fumigatus</i>
312	0,5	0,12	0,5	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>
313	0,5	0,12	0,25	1	1	<i>A. fumigatus</i>
314	0,5	0,25	0,5	4	2	<i>A. fumigatus</i>
315	0,5	0,12	0,25	2	2	<i>A. fumigatus</i>
316	0,5	0,12	0,5	2	1	<i>A. fumigatus</i>
317	0,5	0,12	0,25	2	1	<i>A. fumigatus</i>
318	0,5	0,12	0,5	1	2	<i>A. fumigatus</i>
319	0,5	0,12	0,12	2	1	<i>A. fumigatus</i>
320	1	0,12	0,25	2	1	<i>A. fumigatus</i>
321	1	8	>16	0,5	1	<i>A. fumigatus</i>
322	0,5	0,12	0,25	2	1	<i>A. fumigatus</i>
323	0,5	0,12	0,5	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>
324	0,5	0,12	0,25	2	0,25	<i>A. fumigatus</i>
325	0,5	0,12	0,25	2	0,25	<i>A. fumigatus</i>
326	0,5	0,12	0,25	2	0,25	<i>A. fumigatus</i>
327	1	0,12	0,12	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>
328	0,5	0,12	0,5	2	0,5	<i>A. fumigatus</i>
329	0,25	0,12	1	4	1	<i>A. fumigatus</i>
330	0,5	0,25	1	1	0,5	<i>A. fumigatus</i>
340	1	0,25	1	8	1	<i>A. fumigatus</i>
341	0,5	0,25	1	8	0,25	<i>A. fumigatus</i>
342	1	0,25	0,5	8	1	<i>A. fumigatus</i>
343	0,5	0,25	1	8	0,25	<i>A. fumigatus</i>
344	0,5	0,25	0,5	8	0,25	<i>A. fumigatus</i>

Legenda: ND: não determinado

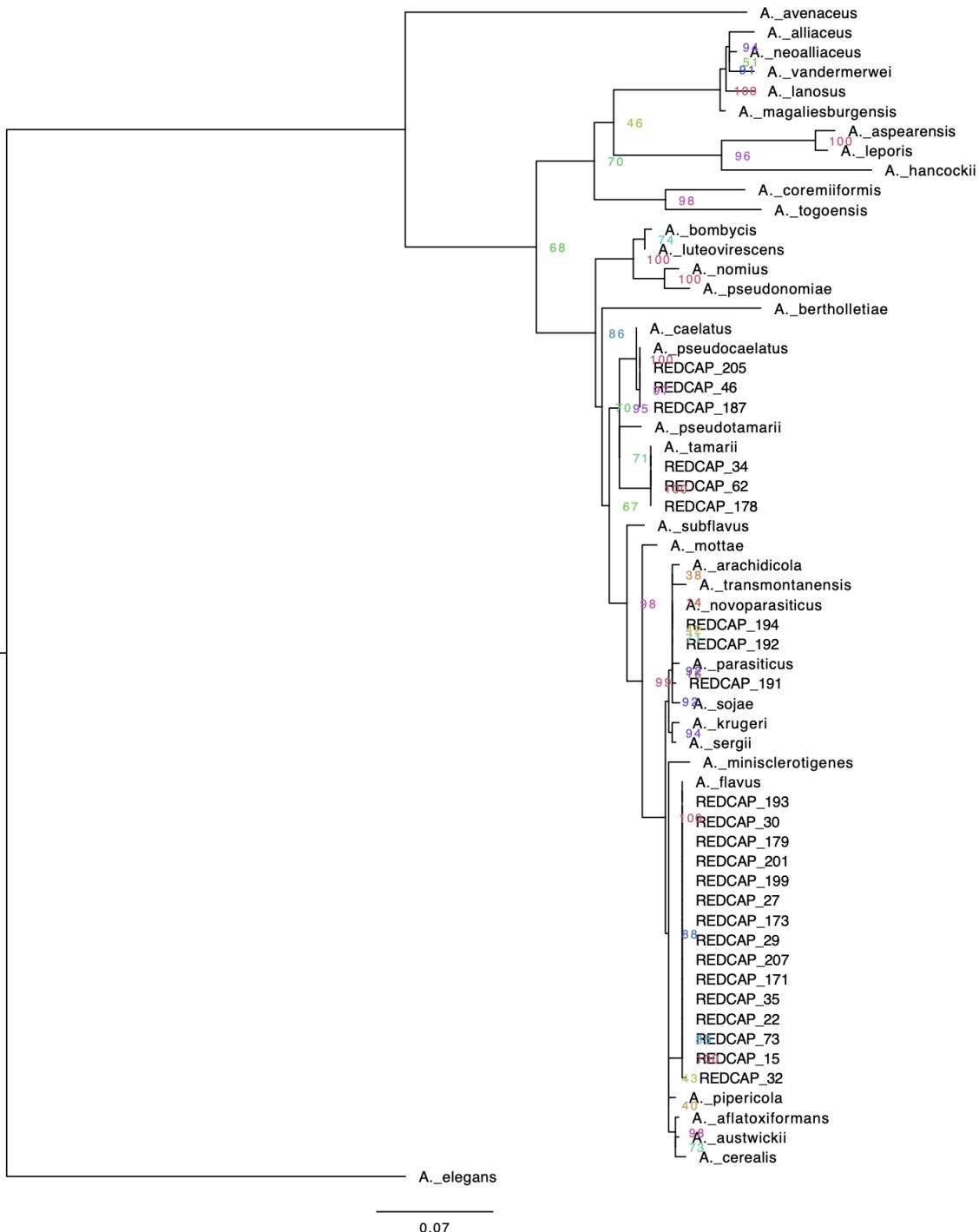
### Apêndice 3 – Análise filogenética de 87 isolados, clínicos e ambientais, da seção Fumigati com base no gene da $\beta$ -tubulina, identificados como CMMS



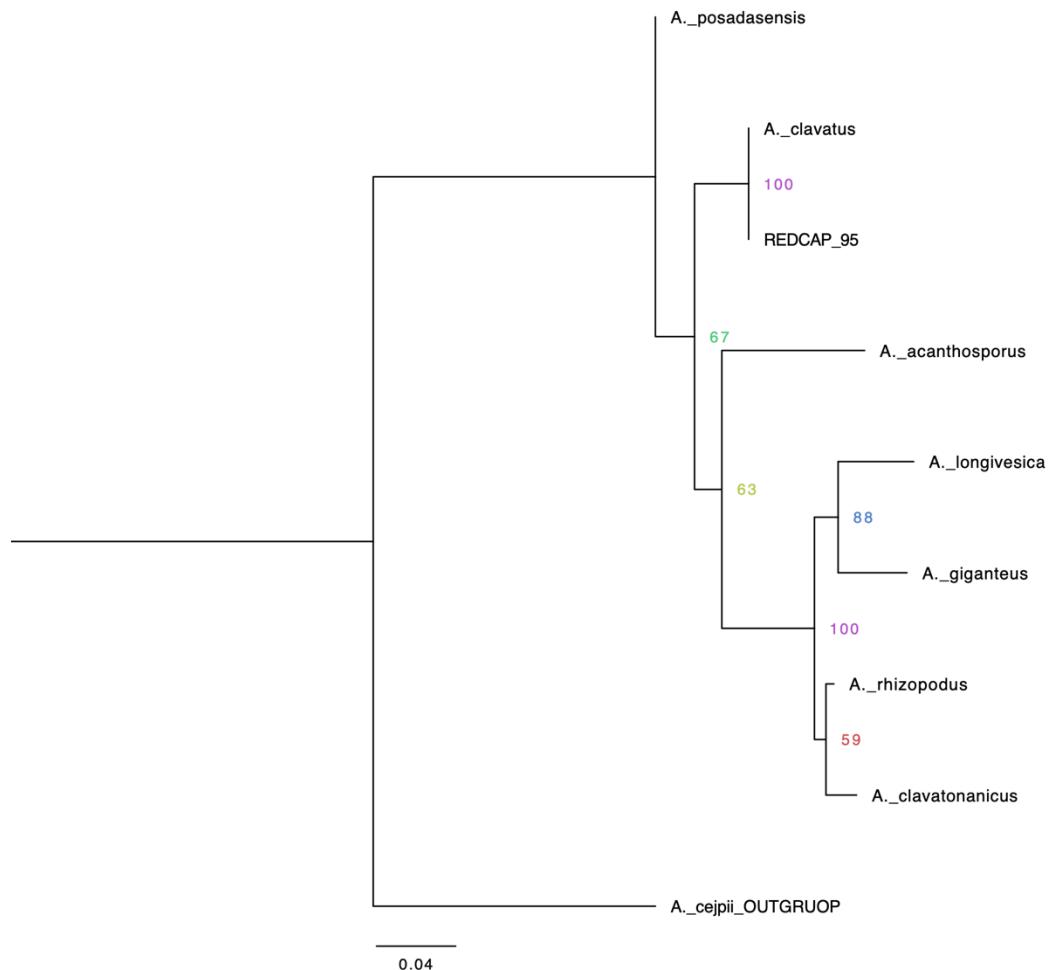
**Apêndice 4 – Análise filogenética de 33 isolados, clínicos e ambientais, da seção Nigri inferida a partir do gene da calmodulina, identificados com numeração REDCap**



**Apêndice 5 – Análise filogenética de 24 isolados, clínicos e ambientais, da seção Flavi com base no gene  $\beta$ -tubulina, identificados com numeração REDCap**



**Apêndice 6 – Análise filogenética de 1 isolados clínicos da seção Clavati, com base no gene  $\beta$ -tubulina, identificados com numeração REDCap**



**Apêndice 7 – Análise filogenética de 2 isolados ambientais da seção Usti, com base no gene  $\beta$ -tubulina, identificados com numeração REDCap**

