



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LAÍS PONTES

VIGILÂNCIA DE RESISTÊNCIA FRENTE A ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Aspergillus fumigatus*

CAMPINAS

2018

LAÍS PONTES

**VIGILÂNCIA DE RESISTÊNCIA FRENTE A ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, Área de Concentração Patologia Clínica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA LAÍS PONTES E ORIENTADO PELA
PROF^a DR^a ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3368/2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P777v Pontes, Laís, 1992-
Vigilância de resistência frente a antifúngicos azólicos de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* / Laís Pontes. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Angélica Zaninelli Schreiber.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Azóis. I. Schreiber, Angélica Zaninelli. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Azole antifungals resistance surveillance in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*

Palavras-chave em inglês:

Aspergillus fumigatus

Azoles

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Angélica Zaninelli Schreiber [Orientador]

Plínio Trabasso

Marilene Rodrigues Chang

Data de defesa: 23-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LAÍS PONTES

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

MEMBROS:

1. PROF^a DR^a ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

2. PROF^o DR^o PLÍNIO TRABASSO

3. PROF^a DR^a MARILENE RODRIGUES CHANG

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 23 de fevereiro de 2018

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Zéca Pontes e Vera Pontes, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Essa conquista não é só minha, mas nossa. Toda a minha jornada até aqui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Me ensinaram acima de tudo a honestidade e a agir com respeito. Graças a nossa união, vários obstáculos foram ultrapassados, muitas vitórias alcançadas e muitas alegrias divididas.

Agradeço pela paciência e compreensão com a minha ausência.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Dr^a Angélica Zaninelli Schreiber pela oportunidade de tê-la como orientadora nesse trabalho e por todos os ensinamentos concedidos. Obrigada por acreditar em mim e me acompanhar nessa jornada científica.

A Prof^a Dr^a Maria Luiza Moretti pelo apoio e pela oportunidade de trabalhar em conjunto.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo apoio concedido para realização dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica –HC-UNICAMP e Laboratório de Investigação em Fungos –LIF/UNICAMP: Em especial a Franqueline Reichert-Lima, Luzia Lyra e Edson Luz.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas – LEMDI/UNICAMP – Cibele Tararam, Larissa Levy, Erivan Olinda Ribeiro, Pamella Stivanelli.

Ao CDC (Centers for Diseases and Control and Prevention) por ter dado a oportunidade ao nosso grupo de pesquisa para trabalhar no maior centro de doenças infecciosas do mundo e disponibilizar equipamentos e reagentes para que pudesse ser feito uma parte deste trabalho nos seus laboratórios.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram, mesmo estando longe e que não me esqueceram mesmo com a minha ausência nesses anos.

Ao meu namorado, Flávio Andrade pela paciência, companheirismo e apoio em todos os dias desse trabalho.

Obrigada por tudo.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

RESUMO

Aspergillus spp. são fungos oportunistas responsáveis por infecções sistêmicas e altas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Voriconazol é a primeira escolha terapêutica e o surgimento de isolados de *A. fumigatus* resistentes aos azóis está sendo investigado em vários países ao redor do mundo. Estes isolados apresentam mutações no gene *cyp51A* que codifica a enzima 14 α -demetilase um dos alvos de ação dos azóis. Estas mutações podem surgir durante o tratamento ou devido à exposição ambiental a fungicidas e herbicidas análogos aos azóis. No Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), muitos pacientes de alto risco são suscetíveis a esses patógenos oportunistas (receptores de transplante de medula óssea, pacientes com fibrose cística e outros pacientes imunocomprometidos) situações que fazem a vigilância da resistência extremamente necessária. Assim, este estudo teve como objetivos avaliar a ocorrência de *A. fumigatus* e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos sequenciais de pacientes tratados neste hospital, bem como a presença de mutações no gene *cyp51A* em isolados resistentes e seus respectivos isolados sequenciais. Foram avaliados 202 isolados de *A. fumigatus* provenientes de 44 pacientes. Para identificação das espécies foi utilizado o sequenciamento do gene da β tubulina 2A/B. Foi realizado um teste de triagem de resistência frente aos antifúngicos itraconazol, voriconazol e posaconazol, por meio de um método de diluição em ágar. Os microrganismos considerados resistentes neste teste e uma porcentagem dos isolados suscetíveis foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com o documento M38-A2 do CLSI. Todos os 202 isolados foram confirmados como sendo pertencentes ao grupo *Aspergillus* seção *Fumigati*. A taxa de resultados falsos-suscetíveis foi de 0%, mostrando-se este um método confiável. Dos 5 isolados resistentes no teste de triagem somente 3 isolados demonstraram resistência no teste de Microdiluição, com valores de CIM $\geq 128\mu\text{g/mL}$ para ITC e $1\mu\text{g/L}$ para PSC para o isolado LIF 2444, CIM: $8\mu\text{g/mL}$ para ITC para o isolado LIF 2328 e por fim, o isolado LIF 2552 com CIM: $32\mu\text{g/mL}$ para VRC, resultando em uma taxa de falsos-resistentes de 0.99%. Isolados com valores de CIM considerados resistentes a um ou mais dos azóis avaliados, foram submetidos à pesquisa de mutações no gene da *cyp51A*. Na busca de mutações no gene *cyp51A* não foram encontradas mutações nos isolados resistentes e seus respectivos isolados sequenciais. A ausência de mutações no gene da *cyp51A* nos isolados considerados resistentes sugere que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos. A identificação precisa e confiável das espécies é de grande importância para o tratamento apropriado das infecções, manejo dos pacientes e desenvolvimento de políticas de controle de infecções hospitalares. Além disso, o monitoramento do possível surgimento de isolados resistentes é de extrema importância devido às altas taxas de mortalidade que podem alcançar 90%. A partir de um melhor conhecimento desses agentes patogênicos, novas técnicas diagnósticas e terapêuticas para utilização local poderão ser aplicadas no atendimento ao paciente com aspergilose.

Palavras chave: *Aspergillus fumigatus* e azóis.

ABSTRACT

Aspergillus spp. are opportunistic fungi involved in systemic infections with high mortality rates in immunocompromised patients. Voriconazole is the first therapeutic choice and the emergence of azole resistant isolates of *A. fumigatus* is being investigated in several countries around the world. These isolates show mutations in the *cyp51A* gene encoding the 14 α -demethylase enzyme, one of the azole targets. These mutations may arise during treatment or due to environmental exposure to fungicides and herbicides analogous to azoles. At the Clinical Hospital of the State University of Campinas (UNICAMP), many high-risk patients are susceptible to these opportunistic pathogens (bone marrow transplant recipients, patients with cystic fibrosis and other immunocompromised patients) situations that make resistance surveillance extremely necessary. The aim of this study was to evaluate the occurrence of *A. fumigatus* and the antifungal susceptibility profile of sequential clinical isolates from patients treated in this hospital, as well as the presence of mutations in the *cyp51A* gene in resistant isolates and their respective sequential isolates. A total of 202 *A. fumigatus* isolates from 44 patients were evaluated. Sequencing of the β -tubulin 2A/B gene was used to identify species. A resistance screening test against the antifungals itraconazole, voriconazole and posaconazole was performed by an agar dilution method. The microorganisms considered resistant in this test and a percentage of the susceptible isolates were submitted to the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), according to the document M38-A2 from CLSI All 202 isolates were confirmed to be belonging to the *Aspergillus* section *Fumigati* section. The rate of false-susceptible results was 0%, which proved to be a reliable method. Among the 5 resistant isolates in the screening test only 3 isolates demonstrated resistance in the Microdilution test, with MIC values $\geq 128\mu\text{g/mL}$ for ITC and $1\mu\text{g/L}$ for PSC for isolate LIF2444, MIC: $8\mu\text{g/mL}$ for ITC for isolate LIF2328 and, finally, the LIF 2552 isolate with MIC: $32\mu\text{g/mL}$ for VRC, resulting in a false-resistant rate of 0.99%. Isolates with MIC values considered resistant to one or more of the evaluated azoles were submitted to mutation search in the *cyp51A* gene. In the search for mutations in the *cyp51A* gene, no mutations were found in the resistant isolates and their respective sequential isolates. The absence of mutations in the *cyp51A* gene in isolates considered resistant suggests that other resistance mechanisms may be involved. The accurate and reliable identification of the species is of great importance for the appropriate treatment of infections, patient management and development of hospital infection control policies. In addition, the monitoring of the possible emergence of resistant isolates is of extreme importance due to the high mortality rates that can reach 90%. From a better knowledge of these pathogens, new diagnostic and therapeutic techniques for local use can be applied in the care of patients with aspergillosis.

Key words: *Aspergillus fumigatus* and azoles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Teste de triagem: Placa de Petri contendo Mueller Hinton ágar suplementado com 2% de dextrose 33
- Figura 2:** Espelho de leitura com placa de Microdiluição posicionada 34
- Figura 3:** Características dos 202 isolados de *Aspergillus* seção *Fumigati* 39
- Figura 4:** Teste do controle de crescimento em placas de Petri 90x15mm 41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resultados do sequenciamento de DNA dos 202 *Aspergillus* reativados 40
- Tabela 2:** Resultado do teste de triagem de 202 isolados de *Aspergillus fumigatus* 41
- Tabela 3:** Distribuição de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para 147 *Aspergillus fumigatus* suscetíveis a itraconazol, 138 isolados suscetíveis ao voriconazol e 146 isolados suscetíveis ao posaconazol e respectivas taxas de falso-suscetíveis no teste de triagem 41
- Tabela 4:** Isolados resistentes e isolados sequenciais dos mesmos pacientes submetidos a busca de mutações nucleotídicas e substituições nos aminoácidos 43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros utilizados na reação de PCR β tubulina 2A/B.....	30
Quadro 2: Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento	31
Quadro 3: Parâmetros utilizados na reação de PCR da <i>cyp51A</i>	36
Quadro 4: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento do gene <i>cyp51A</i>	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMB: anfotericina B

ASD: ágar Sabouraud dextrose

ATCC: *American Type Culture Collection*

BLAST: *Basic Local Alignment Tool*

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenoaminotetracético

FCL: fluconazol

FCM: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

HC-UNICAMP: Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas– UNICAMP

h: horas

ISHAM: *International Society for Human and Animal Mycology*

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

ITC: itraconazol

LEMDI: Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas– FCM/UNICAMP

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos–FCM/UNICAMP

MOPS: ácido morfolinopropanosulfônico

mL: mililitro

mM: milimolar

µL: microlitro

µg: micrograma

ng: nanograma

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

rDNA: DNA ribossômico

rpm: rotações por minuto

UFC: unidades formadoras de colônia

VRC: voriconazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. <i>Aspergillus spp.</i>	16
1.2. Epidemiologia	17
1.3. Aspergilose: formas clínicas	18
1.4. Diagnóstico clínico.	20
1.5. Diagnóstico laboratorial	21
1.6. Tratamento.	22
1.7. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos	23
1.8. Resistência aos antifúngicos azólicos	23
1.9. Justificativa	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral.	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Local de Trabalho.....	28
3.2. Isolados Clínicos para o Estudo	28
3.2.1. Reativação dos isolados clínicos	28
3.2.2. Identificação dos isolados clínicos	29
3.3. Extração de DNA	29
3.3.1. Amplificação do DNA alvo por PCR	29
3.3.1. Purificação dos produtos da PCR	30
3.3.3. Reação de sequenciamento	30
3.3.4. Análise.....	31
3.4. Triagem de Resistência	32
3.4.1. Inóculo.....	32
3.4.2. Leitura do teste e validação do método	32
3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	33
3.5.1. Inóculo.....	33
3.5.2. Preparo das placas de microdiluição	34
3.5.3. Leitura de CIM	34
3.5.4. Controle de qualidade	35
3.6. Detecção de Mutações no gene <i>cyp51A</i>	35

3.6.1. Extração de DNA	36
3.6.2. Amplificação do DNA por PCR	36
3.6.3. Purificação dos produtos de PCR	36
3.6.4. Reação de Sequenciamento	37
3.6.5. Análise.....	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Reativação dos Isolados Clínicos	39
4.2. Identificação Macromorfológica e Micromorfológica	39
4.3. Sequenciamento de DNA	39
4.4. Triagem de Resistencia	40
4.5. Testes de Suscetibilidade.....	41
4.6. Análises de Mutações no gene <i>cyp51A</i>	42
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERENCIAS.....	53
8. ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

As Infecções fúngicas invasivas (IFIs) podem afetar hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos, sendo estes últimos mais frequentemente afetados por agentes oportunistas. Essas são de difícil manejo, exigem altas doses de antifúngicos e tratamentos de longa duração. Em hospedeiros imunocomprometidos, as IFIs são frequentemente fatais, tendo como agentes etiológicos envolvidos leveduras, fungos filamentosos e fungos dimórficos (1).

1.1. *Aspergillus* spp.

Espécies do gênero *Aspergillus* têm emergido como importantes agentes causais de infecções, que podem se apresentar como aspergilomas, reações alérgicas e infecções invasivas agudas ou crônicas (2). Esses fungos filamentosos podem causar infecções fatais em pacientes imunocomprometidos, particularmente pacientes neutropênicos, com doenças hematológicas malignas, submetidos a transplante halogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e a transplantes de órgãos sólidos, pacientes em tratamento em unidades de terapia intensiva e os infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) em estágio avançado (3, 4). A alta taxa de mortalidade pode ser reduzida com diagnóstico precoce e tratamento adequado. Sem o diagnóstico acurado, pacientes são muitas vezes submetidos a tratamentos empíricos que podem não ser efetivos e causar diversos efeitos colaterais (5, 6).

O gênero *Aspergillus* engloba fungos filamentosos que estão entre os mais abundantes no mundo. O sucesso de adaptação das espécies do gênero *Aspergillus* é explicado pelo fato de estes não serem seletivos no que diz respeito às suas condições de crescimento, uma vez que degradam uma ampla variedade de moléculas orgânicas e crescem em ampla faixa de temperatura. Além disso, espécies de *Aspergillus* produzem um elevado número de conídios que são dispersos no ar e podem percorrer longas distâncias (7).

Aspergillus são patógenos oportunistas ubiqüitários, cosmopolitamente distribuídos e são responsáveis por altas taxas de mortalidade (8).

Embora mais de 20 espécies de *Aspergillus* já tenham sido descritas como possíveis agentes causais de infecção em seres humanos, a principal espécie é *Aspergillus fumigatus* (9). A identificação correta e confiável das espécies é de

extrema importância para o tratamento e manejo de cada paciente e para o desenvolvimento de políticas de controle de infecção. Espécies de *Aspergillus* apresentam variação na suscetibilidade inata frente aos agentes antifúngicos, tornando a identificação de espécies fundamental na escolha da terapêutica antifúngica apropriada (10).

Historicamente, o gênero *Aspergillus* é classificado em oito subgêneros, subdivididos em vários complexos de espécies que, por sua vez, incluem muitas espécies. Para a identificação dos isolados até espécie-complexo, micologistas têm confiado em observação das características macroscópicas e microscópicas. No entanto, atualmente, a posição precisa de uma espécie dentro de um complexo de espécies requer técnicas de biologia molecular, como sequenciamento de DNA (11).

Com a introdução da identificação molecular, pode-se perceber que vários fungos identificados morfologicamente como *A. fumigatus*, estão agora sendo classificados como subespécies, assim, sendo possível fazer a diferenciação entre eles. Esses fungos macroscopicamente idênticos ao *A. fumigatus* estão dentro da seção *Fumigati* que compreende as seguintes subespécies, sendo a forma anamorfa: *A. brevipes*, *A. duricaulis*, *A. fumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, *A. unilateralis*, *A. viridinutans*, *A. felis* e *A. franktonensis*; e a forma teleomorfa: *Neorsartorya aurata*, *N. aureola*, *N. coreana*, *N. fennelliae*, *N. fischeri*, *N. glabra*, *N. lacinosa*, *N. spinosa*, *N. quadricincta*, *N. stramenia*, *N. spathulata*, *N. hiratsukae*, *N. pseudofischeri*, *N. tetenoi*, *N. multiplicata*, *N. udagawae* e *N. sublevispora*. (12, 13). Estes não possuem o mesmo perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos atualmente utilizados, itraconazol (ITC), voriconazol (VRC) e posaconazol (PSC). Desta forma, a discriminação entre as espécies é muito importante (14).

1.2. Epidemiologia

As espécies de *Aspergillus* são frequentemente encontradas em ambientes úmidos e também tem predileção por solos férteis em que haja matéria em decomposição. Suas formas infectantes são os conídios veiculados pelo ar. Não há predileção por zonas climáticas, sexo, idade e etnia, sendo uma doença de ocorrência universal (15).

A exposição ao patógeno também pode ocorrer após o consumo ou inalação de produtos contaminados com esporos do fungo. A aspergilose cutânea primária foi

relatada em pacientes com violação na barreira protetora da pele, como em vítimas de queimaduras e locais próximos de vasos sanguíneos em neonatos. A contaminação de água também tem sido considerada uma fonte de aspergilose nosocomial e outras infecções por esse patógeno (16).

Como existem numerosas fontes de fungos no ambiente, devem ser feitos esforços razoáveis para diminuir a exposição aos esporos fúngicos em pacientes imunocomprometidos. Foram publicadas diretrizes detalhadas sobre o modelo e ventilação do quarto hospitalar para reduzir a exposição ao mofo entre os receptores de medula. É recomendado um “ambiente protegido”, que inclui filtragem de ar particulado de alta eficiência (HEPA) (e/ ou fluxo de ar laminar), manutenção de sala de pressão positiva e um número mínimo de trocas de ar por hora. Para outros grupos em risco, como os receptores de órgãos sólidos e os pacientes queimados, é recomendado que sejam colocados em salas filtradas por HEPA. Essas diretrizes podem ser aplicadas a outros pacientes imunocomprometidos (17).

1.3. Aspergilose: formas clínicas

A infecção por espécies de *Aspergillus*, ocorre por meio da inalação dos conídios presentes no ar. Estes podem penetrar nos alvéolos e se não forem removidos pelo organismo, podem germinar e proliferar. Sendo as principais síndromes relacionadas à aspergilose: aspergilose invasiva, formas pulmonares e extrapulmonares. No que se refere às formas pulmonares há o aspergiloma, a doença brônquica superficial, a alveolite alérgica extrínseca e a doença broncopulmonar alérgica. Entre as manifestações extrapulmonares pode-se observar a sinusite, a otite, a endoftalmite e a endocardite em valva protética (18).

Em indivíduos com algum comprometimento no sistema imunológico, como por exemplo, pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes submetidos a transplante de medula óssea, pacientes com câncer e com alguma doença pulmonar obstrutiva, esses microrganismos podem causar aspergilose invasiva (AI) (19). A AI é predominantemente uma doença do trato respiratório, envolvendo o parênquima pulmonar, porém também pode envolver pleura, traqueia e brônquios. A partir desses locais, pode haver disseminação para outros órgãos como cérebro, fígado, rins, intestino e pele. Sinusites e otites também são importantes possíveis apresentações da infecção por *Aspergillus* (20, 21).

Além da AI, que acomete até 10% dos indivíduos submetidos a transplante de medula óssea (22), outras importantes formas clínicas da aspergilose são: aspergiloma, ou bola fúngica, e as reações ou infecções encontradas em pacientes fibrocísticos (20,21, 23). O primeiro processo geralmente ocorre após a colonização de cavidades pós-tuberculose. A tuberculose é considerada a principal doença promotora do aspergiloma, sendo a causa em 32 a 45% dos casos (24-26). Nesses indivíduos, a colonização por *A. fumigatus* pode levar a aspergilose pulmonar, no caso, o aspergiloma. Estudos vêm demonstrando que pacientes podem estar colonizados e até mesmo infectados por mais de um genótipo ou mais de um isolado ao mesmo tempo. Além disso, sabe-se que isolados ou até mesmo genótipos diferentes podem apresentar diferentes perfis de suscetibilidade frente a antifúngicos (20, 27, 28).

Pacientes portadores de fibrose cística (FC), doença genética autossômica recessiva, que afeta principalmente os pulmões, pâncreas e o sistema digestivo, tem o pulmão altamente vulnerável a infecções respiratórias que promovem a inflamação e a remodelação das vias aéreas. Diversos microrganismos podem causar a colonização e/ou infecção no pulmão desses pacientes, sendo o principal patógeno fúngico isolado o *Aspergillus*, principalmente *A. fumigatus* (20). Pacientes em estágio avançado da doença podem vir a ser submetidos ao transplante de pulmão. Protocolos internacionais recomendam que esse procedimento cirúrgico não seja realizado em pacientes infectados ou colonizados com *Aspergillus*, sendo indicado então o tratamento desses processos antes do transplante. No entanto, da mesma forma que no aspergiloma, estudos recentes vêm demonstrando que em colonizações e infecções por *A. fumigatus* pode não ser isolado um único genótipo desse patógeno (21). Técnicas como a de microssatélites permitem que esses isolados sejam caracterizados quanto sua origem clonal. Essa informação é de extrema importância para todos os tipos de infecções causadas por *A. fumigatus*, pois em um único paciente diversos isolados com diferentes origens clonais podem ser encontrados, sendo que a suscetibilidade frente aos agentes antifúngicos também pode ser diferente, podendo em um mesmo paciente serem encontrados isolados suscetíveis e isolados resistentes (27-29).

Por sua vez, pacientes receptores de transplante pulmonar representam uma população particular de pacientes com FC, devido à imunossupressão relacionada ao tratamento anti-rejeição. Como consequência, esses pacientes estão em alto risco de

desenvolverem aspergilose invasiva, sendo necessária a vigilância de possíveis colonizações no pulmão destes pacientes, indicando que a terapia antifúngica se inicie no período pós-transplante em pacientes colonizados por *Aspergillus* (21).

Tendo em vista que em um mesmo paciente, independentemente da apresentação clínica da aspergilose, diversos isolados com diferentes perfis frente aos antifúngicos podem ser encontrados, a vigilância dos isolados seriados desses pacientes quanto a sua caracterização clonal é muito importante para que se possa entender melhor esses processos de colonização e infecção nesse grupo de pacientes para que uma adequada abordagem terapêutica seja efetuada no pré e pós-operatório (20, 30).

Estudos demonstram que a técnica de microssatélites não é capaz de diferenciar entre colonização ou infecção, porém permite discriminar os diferentes isolados de um mesmo paciente, ou até mesmo relacionar os isolados de diferentes pacientes, sendo importante para determinar se indivíduos estão colonizados ou infectados por micro-organismos com a mesma origem clonal. Para obter mais informações sobre as relações epidemiológicas entre isolados de *A. fumigatus*, obtidos de várias origens (com diferentes origens clonais), a determinação dos genótipos permite abordar a elucidação de surtos, transmissões nosocomiais, rotas de infecção e correlações genótipo-fenótipo. É necessário um melhor conhecimento da população de *A. fumigatus* em todas as formas de aspergilose, e, para este fim, a genotipagem usando marcadores de microssatélites se mostra apropriada (31, 32).

1.4. Diagnóstico clínico

O manejo efetivo de IFIs depende de vários fatores como dados epidemiológicos, fatores de risco envolvidos em cada caso e, principalmente, do diagnóstico precoce para que o tratamento ideal seja empregado (1).

O diagnóstico da aspergilose é de realização mais difícil e complexa pois seus sinais e sintomas são inespecíficos, pela ocorrência muitas vezes tardia dos infiltrados pulmonares, ou mesmo por conta da dificuldade de estabelecer a diferenciação se o agente fúngico é, naquele momento, patógeno ou colonizante. Além disso, o isolamento do fungo nas amostras clínicas é raramente positivo. Os critérios de diagnóstico são as provas laboratoriais e os exames de imagem pulmonar, combinados aos achados clínicos (2).

É sempre necessário fazer o diagnóstico diferencial dessa patogenia, pois a fibrose cística e a asma são condições clínicas que podem estar associadas a aspergilose ou até mesmo podem ser confundidas (33).

1.5. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial de aspergilose pode ser realizado a partir de identificação dos isolados em culturas de materiais clínicos, detecção de antígenos circulantes ou através de sequenciamento de DNA (11, 34).

O diagnóstico a partir dos isolados em culturas ou materiais clínicos é baseado em observações de características macroscópicas e microscópicas de cada fungo. Macroscopicamente *A. fumigatus* apresentam colônias de crescimento rápido, ilimitadas, planas e aveludadas, começam com tonalidades verdes com um halo branco na margem externa e que, com o tempo, ficam cinzentas e escuras. As características microscópicas mostram micélio liso, septado, hialino, com conidióforos cenocíticos curtos, vesículas subclávias de 20-30µm, com conídios redondos de 2,5-3µm (34).

A detecção de antígenos circulantes para o diagnóstico de aspergilose invasiva foi primeiramente relatada em 1978. O primeiro *kit* de detecção de antígenos do *Aspergillus* era baseado na técnica de aglutinação indireta com partículas de látex para detecção de galactomanana, sendo substituído em 1995 com a disponibilização do Enzimo imunoensaio ELISA (*Platelia Aspergillus EIA*), que foi aprovado pela ANVISA em 2006 para utilização no diagnóstico da aspergilose invasiva quando realizado com amostras de soro (35). A galactomanana é um polissacarídeo que faz parte da camada externa da parede celular de *Aspergillus*, sendo liberada durante seu crescimento. A técnica baseia-se em um ELISA sanduíche e utiliza anticorpos monoclonais (EB-A2) de ratos que foram imunizados ao entrar em contato com cepas de *Aspergillus fumigatus*. Tais anticorpos reconhecem o epítipo de galactofuranose da galactomanana, ligando-se a eles. Estes anticorpos reagem com diversas espécies de *Aspergillus*, incluindo *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* e *A. terreus*, além de reconhecerem exoantígenos presentes em cepas de gêneros fúngicos como, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, entre outros (36).

É possível fazer o diagnóstico laboratorial de aspergilose por técnicas moleculares, como sequenciamento de DNA da cultura ou do material clínico. Mais

recentemente, um teste comercial para detecção rápida de *Aspergillus* em material clínico foi lançado comercialmente, o AsperGenious®. Esse teste é baseado em um PCR em tempo real que identifica todas as espécies relevantes de *Aspergillus* e também identifica se as cepas têm ou não mutações no gene *cyp51A* (37). Porém, essas técnicas moleculares são restritas a centros de diagnóstico de referências e a instituições de pesquisa.

1.6. Tratamento

Para o tratamento da aspergilose são utilizados principalmente os derivados azólicos Itaconazol (ITC), Voriconazol (VRC) e Posaconazol (PSC). O antifúngico fluconazol (FLC) não pode ser utilizado, pois o gênero *Aspergillus* é intrinsecamente resistente a este antifúngico específico. Uma diretriz publicada em 2016, cita que a primeira linha de tratamento de aspergilose é o antifúngico VRC (17, 38, 39).

Os azóis e seus respectivos derivados atuam com base na inibição de algum dos passos na biossíntese de ergosterol na membrana. A inibição da síntese de ergosterol é feita por meio do bloqueio da enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica. O ergosterol é o maior componente da membrana celular fúngica e é essencial na biorregulação da fluidez, assimetria e integridade da membrana celular (40).

Outros medicamentos podem ser utilizados no tratamento da aspergilose como caspofungina (CFG) e micafungina (MFG), que pertencem à classe das equinocandinas. Segundo manuais internacionais, as equinocandinas devem ser utilizadas apenas quando ocorrerem falhas terapêuticas e, de preferência, associadas a outra classe de antifúngicos (41).

As equinocandinas têm como mecanismo de ação a inibição não competitiva da enzima β -1,3-glicano sintase, que catalisa a polimerização da glicose-uridina-difosfato (UDP-glicose) em β -1,3-glicano. Quando a síntese deste polímero é inibida, ocorre o extravasamento de componentes da célula, como resposta à alta pressão osmótica exercida sobre a membrana enfraquecida. Ao contrário de outras classes de fármacos antifúngicos, que atuam em membranas celulares fúngicas, as equinocandinas inibem a síntese da parede celular do fungo (42).

Além das equinocandinas, a anfotericina B (AMB), de preferência sob a forma lipídica também é utilizada em casos onde não se tem boa resposta terapêutica com os azóis. O mecanismo de ação da AMB está relacionado a interação com a

membrana celular fúngica na qual promove a formação de poros e consequente extravasamento de substâncias intracelulares levando à morte celular (43).

Infecções fúngicas requerem, geralmente, longos períodos de terapia antifúngica. Esses esquemas terapêuticos muitas vezes acarretam muitos efeitos colaterais e podem induzir a resistência de alguns fungos aos agentes em uso. Essas razões enfatizam a necessidade de realização de testes de suscetibilidade *in vitro* para avaliar o comportamento desses microrganismos frente às opções disponíveis.

1.7. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Testes de suscetibilidade aos antifúngicos têm grande importância no direcionamento das decisões clínicas com o objetivo de promover terapêutica adequada e melhores resultados para o paciente. Tem também a função de possibilitar o acompanhamento do possível surgimento de isolados resistentes (39).

Os testes de suscetibilidade padronizados para fungos filamentosos são: disco difusão em ágar, E-test e Microdiluição em caldo. O teste de disco difusão utiliza discos de papel-filtro, impregnados com antifúngicos em concentrações fixas, sobre a placa de ágar após a semeadura do inóculo fúngico e a leitura é feita após o crescimento fúngico medindo-se o halo e inibição de crescimento. O E-test se baseia na mesma metodologia, o inóculo fúngico é semeado na placa de ágar e é anexado uma fita plástica contendo diversas concentrações de antifúngico; sua leitura é feita a partir do halo de inibição de crescimento que indica diretamente a Concentração Inibitória Mínima (CIM). O padrão de suscetibilidade e resistência é obtido através da medida do halo de inibição de crescimento do microrganismo e comparado e com diretrizes internacionais, como o CLSI e EUCAST (44).

O método padrão ouro para teste de suscetibilidade é o de Microdiluição em caldo (CLSI M-38 A2) (45) e, embora os pontos de corte ainda não estejam bem definidos, oferece resultados importantes para a orientação da terapêutica antifúngica, permitindo a vigilância do aparecimento de isolados resistentes. No entanto, ainda não é realizado rotineiramente em todos os laboratórios de Microbiologia diagnóstica.

1.8. Resistência aos antifúngicos azólicos

O primeiro relato de caso de *A. fumigatus* resistente a outro azól, que não fluconazol, foi descrito em 1997, com isolados que apresentavam resistência frente a ITC (46). A partir de então foi tornando-se necessária a investigação do surgimento

de possíveis isolados resistentes. Os isolados resistentes a azólicos podem apresentar uma grande variedade de mutações no gene *cyp51A*, que codifica a 14- α lanosterol demetilase do citocromo P450, o principal alvo para estes compostos (47).

As mutações que acarretam resistência em *A. fumigatus* foi primeiramente relatada na Europa, e mais recentemente nos Estados Unidos, América do Sul, China, Japão, Irã e Índia (48-52).

Essas mutações foram identificadas no gene *cyp51A* e podem estar associadas a longos tratamentos com antifúngicos azólicos (53), indicando que, em pacientes em tratamento, o fungo é capaz de se adaptar rapidamente a presença do antifúngico e desenvolver resistência a ele (54). Também pode ocorrer o aparecimento de isolados resistentes aos derivados azólicos sem exposição prévia (55). Essa via de desenvolvimento de resistência pode acontecer devido à exposição ambiental do fungo aos inibidores da enzima 14 α -demetilase tais como fungicidas e herbicidas utilizados na agricultura (56).

Na Holanda, resistência aos derivados azólicos já foi relatada em pacientes que não foram expostos a esta classe de medicamentos. Snelders et al. em 2012 demonstraram um aumento de isolados de *A. fumigatus* resistentes e os pesquisadores concluíram que a resistência é devida, principalmente, à mutação TR₃₄/L98H derivada de fontes ambientais. Este mecanismo é composto por uma inserção de 34 pb na região promotora do gene *cyp51A* combinada com uma substituição no códon 98 de leucina para uma histidina (TR₃₄/L98H) (57). Estas mutações são identificadas e caracterizadas por sequenciamento de todo o gene *cyp51A* ou partes dele.

Outra mutação no gene *cyp51A* (TR₄₆/Y121F/T289A) foi relatada em isolados de *A. fumigatus* provenientes de 15 pacientes na Holanda, contendo as mesmas mutações, que também foram detectadas em isolados coletados no interior de casas e nos quintais dos pacientes (58). Além do isolamento na Holanda, isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* possuindo as mutações TR₄₆/Y121F/T289A também foram identificados na Bélgica (59), na Índia (60), na Colômbia (49), no Reino Unido (61) e nos Estados Unidos (52).

Existe outra mutação no gene *cyp51A* (TR₅₃) que também foi descoberta na Holanda (62), não usualmente encontrada, porém já descrita na Colômbia (49) em isolados ambientais.

A causa mais frequente de resistência ao VRC (VRC-R) inclui mutações sítio-alvo do gene *cyp51A*. É provável que certos isolados de *A. fumigatus* VRC-R possam ser suscetíveis a outros derivados azólicos. *Aspergillus fumigatus* com mutações de ponto envolvendo G54R, G54K, G54V, e G54W demonstraram resistência fenotípica para ITC e PSC, mas suscetibilidade a VRC; aqueles com mutações L98H são resistentes a todos os azólicos e isolados com M220I demonstraram padrões de suscetibilidade a VRC variáveis, mas são resistentes a ITC e PSC (63). Um isolado contendo mutações de ponto no gene *cyp51A* foi relatado na Argentina, isolado este que apresentava uma mutação na *cyp51A* com substituição G54E e resistência ao antifúngico ITC (51).

Além das mutações encontradas no gene *cyp51A*, outras mutações que levam a resistência aos azóis estão sendo descritas (64). Estudos recentes comprovam que cerca de 40% dos isolados resistentes aos azóis não tem mutações no gene *cyp51A*. Isso pode ser explicado pelo fato dos isolados desenvolverem biofilmes e terem atividade da bomba de efluxo para regular a homeostase intracelular. Além disso, esses patógenos podem infectar e colonizar o hospedeiro superando o acúmulo de toxina intercelular pela ativação de bombas de efluxo (65). Outras mutações podem ser encontradas no gene *cyp51B* (*cdr1B*), e podem estar ligadas à substituição do gene *cyp51A* que é o principal alvo de ação na biossíntese de ergosterol, essas mutações podem ser causadas pela superexpressão do gene, assim oferecendo um mecanismo efetivo de resistência aos azóis (66).

1.9. Justificativa

O Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC-UNICAMP) é uma instituição terciária de referência, que atende a milhões de pacientes da região e também pacientes oriundos de outros estados próximos. No HC-UNICAMP muitos pacientes de alto risco são tratados e estão suscetíveis a agentes infecciosos oportunistas como os do gênero *Aspergillus*. Nosso grupo de pesquisa realizou estudo anterior para comparar as características de *Aspergillus* a partir de amostras clínicas e ambientais da unidade de transplante de medula óssea em nossa instituição (67). Comparando-se a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos e ambientais, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas para os antifúngicos AMB, nistatina, cetoconazol (KTC), fluconazol (FCL) e 5-flucitosina (5FC) entre os dois grupos. Para os antifúngicos miconazol (MCL) e ITC, verificou-se que os isolados ambientais foram

estatisticamente menos suscetíveis do que os isolados clínicos. *A.fumigatus* resistentes aos antifúngicos não foram identificados em nossa instituição naquele momento. Estudo mais recente já detectou mutações de ponto em cepas resistentes, isolados no período de 1998 a 2013 (dados ainda não publicados). Assim, a vigilância continua para o possível surgimento de espécimes resistentes, é cada vez mais necessário.

Com estudos dessa natureza, nossa instituição poderá se beneficiar ao desenvolver uma forma de identificar e determinar a suscetibilidade aos antifúngicos deste grupo de patógenos fúngicos de importância médica. Ao adquirir maior conhecimento sobre esses agentes patogênicos, novas técnicas diagnósticas e terapêuticas para aplicação local poderão ser implementadas no atendimento ao paciente com aspergilose ou na prevenção de infecções em pacientes suscetíveis a agentes oportunistas como os das espécies de *Aspergillus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* e estudar o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos azólicos de espécimes obtidos a partir de amostras clínicas sequenciais de pacientes com aspergilose tratados no Hospital de Clinicas – UNICAMP.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar as espécies, através de características morfológicas e sequenciamento de DNA, de *A.fumigatus* obtidos a partir de amostras clínicas sequenciais de pacientes com aspergilose tratados no HC-UNICAMP, a partir de março de 2014 até janeiro de 2017.
- Desenvolver um teste de triagem para detecção de isolados resistentes aos azóis.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* dos isolados frente aos antifúngicos itraconazol (ITC), voriconazol (VRC) e posaconazol (PSC).
- Analisar a presença de mutações no gene *cyp51A* nos isolados que apresentarem resistência aos antifúngicos azólicos avaliados e seus respectivos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de trabalho

Os locais de desenvolvimento deste estudo foram o Laboratório de Investigação em Fungos (LIF), do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM/UNICAMP), e o Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI), da Disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM/UNICAMP).

3.2. Isolados clínicos para o estudo

Para a realização desse trabalho, 202 isolados clínicos de *A. fumigatus* mantidos na Micoteca do LIF, previamente isolados de pacientes a partir dos exames de rotina foram selecionados para serem reativados. Os isolados clínicos foram provenientes de 44 pacientes atendidos no HC-UNICAMP no período de março de 2014 a janeiro de 2017, armazenados pelo método de Castellani (68), sendo conservados à temperatura ambiente em frascos de vidro contendo água destilada estéril. Somente foram selecionados pacientes que tinham 2 ou mais culturas positivas para espécies de *Aspergillus*. A identificação até gênero foi realizada no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia, da Divisão de Patologia Clínica-HC-UNICAMP por metodologia clássica (34), utilizando a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas, previamente ao armazenamento.

3.2.1. Reativação dos isolados clínicos

Para a etapa de reativação, os isolados armazenados em água destilada estéril nos frascos de vidro foram levemente agitados e uma alíquota de 1mL foi transferida para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD), sendo inoculados em três pontos na placa. As placas contendo os repiques foram incubadas durante 72h a 35°C e, posteriormente, deixadas em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por mais 24h para viabilizar o crescimento das colônias.

3.2.2. Identificação dos isolados clínicos

Para a identificação macromorfológica e micromorfológica foram utilizados parâmetros descritos na literatura (34).

Todos os isolados foram inoculados em três pontos em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA) e foram incubados a 35°C por sete dias para análise da pureza da colônia.

Para identificação morfológica das espécies de *A. fumigatus* foram analisadas características macroscópicas, como cor da colônia, micélio, presença ou ausência de exsudado, cor do reverso, diâmetro da colônia, presença ou ausência de pigmentação solúvel conforme Lacaz (34).

3.3. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído após 72 horas de crescimento em placas contendo ASD, utilizando o QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen Sciences, Maryland USA) com pequenas modificações (*Pham et al*, dados ainda não publicados).

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

Foram utilizados os *primers* das regiões β -tubulina 2A (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e β -tubulina 2B (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') para amplificação dos fragmentos de DNA a partir dos isolados de *Aspergillus*, de acordo com Glass e colaboradores e Henry e colaboradores (11, 69, 70).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA). Os parâmetros da reação de PCR estão descritos no quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros utilizados na reação de PCR com os primers β tubulina 2A/B.

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

3.3.2. Purificação dos produtos de PCR

Foi realizada a purificação dos produtos de PCR pela adição de 2 μ L da enzima Exosap-IT (USB®Corporation, Cleveland, OH, EUA) a cada 5 μ L de produto de PCR. A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos e a 80°C por 15 minutos para inativar a enzima Exosap-IT. A reação de purificação foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, em corrida a 100V por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram observadas em iluminação ultravioleta.

3.3.3. Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados com os iniciadores β -tubulina 2A/B utilizando o Big Dye™ Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, foram preparadas reações contendo 1 μ L de Big Dye Terminator, 1 μ L de tampão, 1 μ L dos iniciadores β tubulina 2A/B (cada iniciador em tubo diferente) a 1,6mM, 2 μ L do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10 μ L. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por precipitação e lavagem com etanol. Na primeira etapa, em cada amostra foram

adicionados 5µL de EDTA (125mM) e 60µL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 60µL de etanol 70% às amostras que foram centrifugadas a 13.000 rpm, a temperatura de 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras passaram por secagem a vácuo. Após a precipitação e lavagem com etanol, foram acrescentados 10µL de formamida HI-DI® (Applied Biosystems, Warrington, UK) às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo durante 2 minutos. As amostras foram aplicadas na placa de sequenciamento e levadas ao Laboratório de Genética FCM da UNICAMP. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os parâmetros utilizados na reação de sequenciamento estão descritos no quadro 2.

Quadro 2: Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento

Reação de sequenciamento			
Passos	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	10s	25
Anelamento	50	5s	
Extensão	60	4 min	
Refrigeração	4	X	

3.3.4. Análise

As sequências de DNA forward e reverse de cada isolado para cada um dos dois pares de iniciadores (β2A/B) foram editadas e alinhadas no programa Geneious® versão 9 (<http://www.geneious.com>) (71). A sequência consenso foi alinhada com sequências padrão de *Aspergillus fumigatus* com a ferramenta Clustal W (72) no próprio programa Geneious® e, posteriormente, foram inseridas nos bancos de dados GenBank, ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology ITS

Database) e CBS (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre) para verificação da espécie.

3.4. Triagem de resistência

As colônias de *Aspergillus* que cresceram após a reativação e estavam puras nas culturas primárias, foram semeadas em uma placa de Petri. Todas as placas continham Ágar Mueller Hinton suplementado com 2% de dextrose, e suplementados com azóis: itraconazol (2µg/mL), voriconazol (2µg/mL) e posaconazol (0,5µg/mL). Foi utilizada uma placa sem adição de antifúngico como controle de crescimento. As placas foram incubadas a 35°C e o crescimento foi avaliado após 48 horas. As espécies de *Aspergillus* que foram capazes de crescer em placas contendo azólico, foram investigadas e submetidas a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

3.4.1. Inóculo

Após o crescimento fúngico de 48 horas a 35°C em tubos contendo ágar batata (PDA; Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA), o inóculo foi preparado usando um swab úmido estéril para realizar movimentos circulares delicados sobre o crescimento fúngico, afim da obtenção somente de conídios. O swab contendo os conídios foi mergulhado em um tubo contendo 5mL de solução salina a 0,85%. Após uma agitação mecânica vigorosa, transferiram-se 500µL para um segundo tubo contendo 4,5mL de solução salina a 0,85%. A suspensão de conídios proporcionou um inóculo final de $5,5 \times 10^4$ - 2×10^5 UFC/m. Para os testes, adicionou-se 20µL da suspensão contendo o inóculo as placas contendo o antifúngico diluído em ágar e, no controle positivo, sem a presença de antifúngicos, para confirmar a viabilidade dos microrganismos.

3.4.2. Leitura do Teste e Validação do Método

A leitura do teste de triagem foi feita após 48h de incubação das placas a 35°C. Foi realizado um cálculo amostral para a validação do método. Todos os isolados capazes de crescer no teste e uma porcentagem de isolados suscetíveis no teste de triagem foram submetidos ao teste de Microdiluição de caldo de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) M38-A2. A concentração inibitória mínima (CIM) de ITC, VRC e PSC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi

determinada visualmente como a menor concentração de fármaco causando uma inibição completa do crescimento de fungos. *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 e *A. flavus* ATCC204304 foram incluídos como controles de qualidade em cada teste.

A análise estatística foi feita para estabelecer as taxas de resultados falso-resistentes e falso-suscetíveis de acordo com Fonseca 1994.

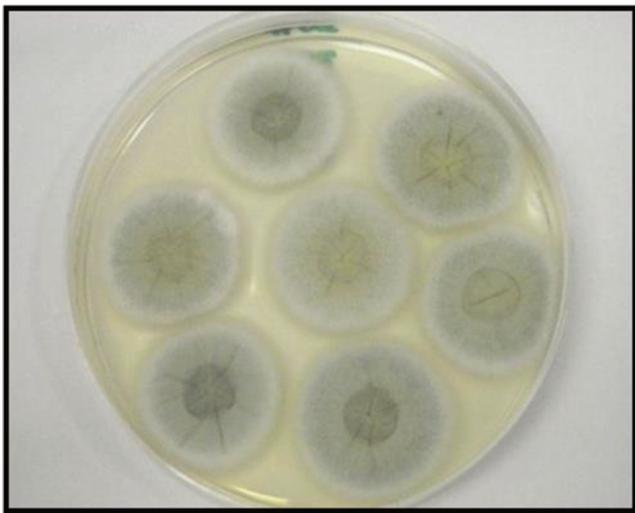


Figura 1. Teste de triagem: Placa de Petri contendo Mueller Hinton ágar suplementado com 2% de dextrose, sem a adição de antifúngicos para controle positivo. É possível observar o crescimento de 7 Isolados.

3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos ITC, VRC e PSC foi realizada de acordo com o documento M38-A2 do CLSI (45) pelo método de Microdiluição em caldo.

Para todos os testes de suscetibilidade aos antifúngicos foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.5.1. Inóculo

Após o crescimento fúngico de 72h a 35°C em tubos contendo o meio de cultura ASD, o inóculo foi preparado em tubo contendo 5mL de solução de salina 0,85% no qual foi banhado um swab que foi girado sobre a colônia do microrganismo. Posteriormente, foi realizada a contagem dos conídios no retículo central de uma

câmara de Neubauer. O objetivo foi a obtenção de inóculo com a concentração final de 0,5 a $2,5 \times 10^4$ UFC/mL.

3.5.2. Preparo das placas de Microdiluição

Os antifúngicos ITC, VRC e PSC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram preparados de acordo com a ficha de especificação do fabricante, ajustando-se à concentração desejada. O teste foi realizado em placas de microtitulação com fundo em “U” estéreis, para onde foram transferidos todos os componentes preparados anteriormente da seguinte forma: 20µL do antifúngico diluído nas diferentes concentrações até a 10ª coluna; 160µL do meio de RPMI 1640 em todas as fileiras e mais 20µL de inóculo em todos os poços, exceto nos da 11ª coluna, que corresponde ao controle negativo. Na 12ª coluna, por se tratar do controle positivo de crescimento, não foi adicionado o antifúngico. Totalizou-se um volume final de 200µL, resultando em uma concentração final do inóculo de 0,5–2,5 x 10⁴UFC/mL.

3.5.3. Leitura das CIM

As placas foram incubadas na temperatura de 35°C, sendo a leitura realizada após 24 e 48 horas de incubação. Para a leitura, comparou-se o crescimento fúngico de cada poço com o do controle positivo de acordo com os documentos M38-A2 do CLSI (45), sendo esta leitura realizada com o auxílio de um espelho de leitura (Figura 2).

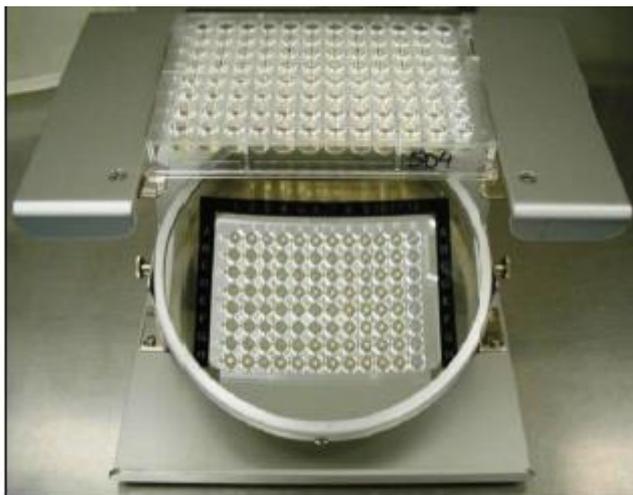


Figura 2: Espelho de leitura com placa de microdiluição posicionada (Laboratório de Investigação em Fungos –FCM/UNICAMP).

O crescimento dos microrganismos estudados foi numericamente determinado de acordo com os seguintes critérios:

- score 4: quando não houve nenhuma redução no crescimento, ou seja, 100% de crescimento e 0 % de inibição do crescimento;
- score 3: quando ocorreu leve redução no crescimento – 80% de crescimento e apenas 20% de inibição de crescimento em comparação ao do obtido no controle positivo;
- score 2: quando houve significativa redução no crescimento, isto é 50% de crescimento em comparação com o controle positivo do teste e 50% de inibição de crescimento; 36
- score 1: quando ocorreu 20% de crescimento e 80% de inibição de crescimento em comparação ao crescimento obtido no controle positivo;
- score 0 (zero): para ausência de crescimento visível. Resultado esperado para antifúngicos com mecanismo de ação fungicida.

Segundo o documento M38-A2 do CLSI (45), a CIM para os azólicos foi definida como sendo a menor concentração deste antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento (score 0).

3.5.4. Controle de Qualidade

Para validação dos testes com antifúngicos, foram utilizadas as cepas padrão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, como recomendado pelo CLSI. Para cada diluição de antifúngicos realizou-se o teste de suscetibilidade com as cepas padrão, tendo seus resultados de CIM comparados com os valores estabelecidos pelo documento M38-A2 do CLSI (45).

3.6. Detecção de mutações no gene *cyp51A*

Os isolados de *Aspergillus fumigatus* com elevados valores de CIM (CIM >2µg/mL para o antifúngico ITC e/ou >2µg/mL para VRC e/ou para PSC ≥1µg/mL) foram analisados quanto a presença de mutações no gene *cyp51A* com a utilização dos primers AF1P1 (F/R), AF2P1 (F/R), AF3P1 (F/R) e AF4P1 (F/R) (39). Todos os isolados dos mesmos pacientes também foram avaliados, mesmo não apresentando fenótipo de resistência “in vitro”.

3.6.1. Extração de DNA

Vide item 3.3.

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

A amplificação do DNA extraído (conforme item 3.3.) foi realizada por PCR, na qual foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores CYP51A Forward (5'-GGCTGGAGATACTATGGCTTTC-3') e CYP51A Reverse (5'-GTATAATACACCTATTCCGATCACACC-3'). A PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo água (19,5µL), tampão de PCR 10x (Roche) (2,5µL), dNTPs (Roche) (0,25µL), 0,25 µL de cada iniciador (concentração de 20 µM) e 0,125 µL de Taq DNA polimerase (Roche) e 2 µL contendo 20-50 ng de DNA genômico da amostra.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a realização da PCR foram utilizados os parâmetros descritos no quadro 3.

Quadro 3: Parâmetros utilizados na reação de PCR da *cyp51A*.

Reação de PCR <i>cyp51A</i>			
Passos	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min	1
Desnaturação	94	30 s	35
Anelamento	50	30 s	
Extensão	68	4 min	
Extensão final	68	5 min	
Refrigeração	4	X	

3.6.3. Purificação dos produtos de PCR

Os *amplicons* resultantes da reação de PCR foram purificados com a utilização da enzima ExoSAP-IT (USB®Corporation, Cleveland, OH, EUA), de acordo com as instruções do fabricante). Após a amplificação, foi realizado sequenciamento do produto de PCR com 4 pares de iniciadores. As sequências de cada um dos iniciadores utilizados estão expostas no quadro 4.

Quadro 4: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento do gene *cyp51A*.

Iniciador	Sequência (5' - 3')
AF1P1F	GCATTCTGAAACACGTGCGT
AF1P1R	TTGAGCAAGATTGCCGTCAG
AF2P1F	TACATGGCCGTTGCGGTGCT
AF2PIR	CCTTGAAAGTTTCGGTGAATC
AF3PIF	TGTGCCACTTATTGAGAAGG
AF3PIR	CACGAATAACATGTTGATGG
AF4PIF	CTCCGCTCCAGTACAAGGAT
AF4P1R	GATGGTTACAACAGTCTCAC

3.6.4. Reação de Sequenciamento

O sequenciamento de ambas as fitas (*Foward e Reverse*) foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada em um volume final de 20µL, contendo água (13µL), Big Dye buffer 5X (2µL), Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems; 2µL) e um primer por tubo (1 µL), na concentração de 3.2µM e 2µL do produto de PCR purificado. Os parâmetros da reação de sequenciamento estão descritos no quadro 2.

Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por precipitação e lavagem com etanol. Após a precipitação e lavagem com etanol, foi acrescentada formamida HI-DI™ (Applied Biosystems, Warrington, UK) às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo durante 2 minutos. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI Prism®3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para a identificação e validação de mutações na sequência do DNA do gene *cyp51A*.

3.6.5. Análise

A Análise das sequências obtidas foi realizada no programa Geneious 9 ® (Biomatters Ltd 2017) (71) e as sequências obtidas foram comparadas com a

sequência do isolado suscetível *Wild Type*, disponível no GeneBank (número de acesso AF338659).

4. RESULTADOS

4.1. Reativação dos isolados clínicos

Todos os 202 isolados clínicos provenientes de 44 pacientes (Anexo 1) atendidos no HC-UNICAMP, estavam viáveis no processo de reativação, portanto a taxa de recuperação dos isolados foi equivalente a 100%.

4.2. Identificação macromorfológica e micromorfológica

Analisando as características morfológicas, foram identificados 202 isolados pertencentes ao complexo *Aspergillus* seção *fumigati*.

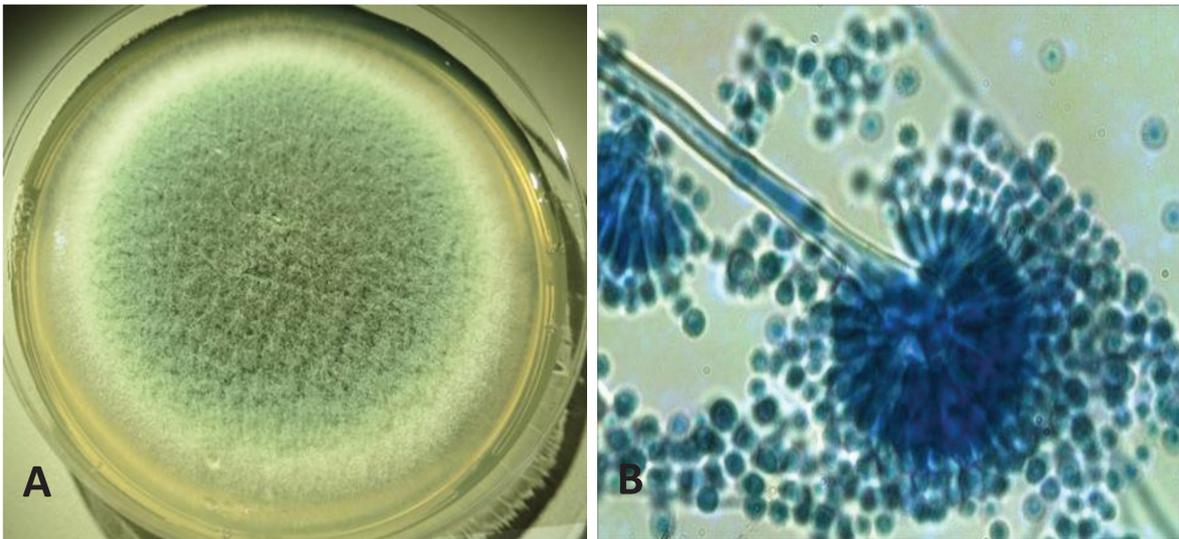


Figura 3.A: Característica macromorfológica de uma colônia sugestiva do complexo *Aspergillus* seção *fumigati*. **B:** Característica micromorfológica do complexo *Aspergillus* seção *fumigati*.

4.3. Sequenciamento de DNA

Os resultados do 202 isolados clínicos, encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Resultados do Sequenciamento de DNA dos 202 *Aspergillus* reativados.

Sequenciamento de DNA	
Isolados	β 2A e β 2B
201	<i>A. fumigatus</i>
1	<i>Neosartorya pseudofisherii</i>

4.4. Triagem de resistência

Duzentos e dois isolados foram avaliados no controle positivo e no teste de triagem com o antifúngico adicionado ao meio de cultura (Figura 4). No teste de triagem, 4 (1,98%) isolados foram capazes de crescer em placas contendo ITC, sendo 2 também confirmados como resistentes de acordo com o CLSI (45) (taxa de falsos-resistentes 0,99%). Os valores de CIM para esses isolados resistentes a ITC foram 8 μ g/mL para o isolado LIF 2328 e \geq 128 μ g/mL para o isolado LIF 2444. Um isolado, LIF 2552 (0,49%) foi capaz de crescer na concentração de 2 μ g/mL do meio de cultura contendo VRC e apresentou CIM de 32 μ g/mL no teste de Microdiluição em caldo, resultando em uma taxa de falso-resistente de 0%. Para PSC, o isolado LIF 2444 (0,49%) foi capaz de crescer a 0,5 μ g/mL no teste de triagem, que foi confirmado pelo teste de referência (45) com CIM de 1 μ g/mL. A taxa de falsos-resistentes para PSC foi 0% (Tabela 2). As cepas padrões *A. flavus* ATCC 204304 e *A. fumigatus* ATCC 204305 também foram avaliadas como Controle de Qualidade, correspondendo as concentrações indicadas com o documento do CLSI (45).

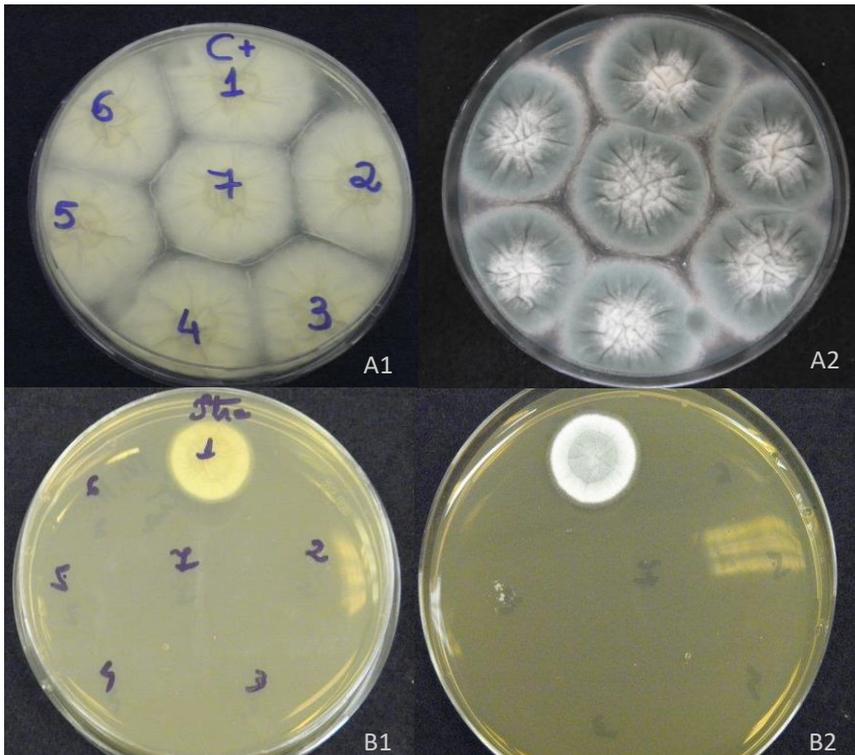


Figura 4. Teste do controle de crescimento em placas de Petri 90x15mm: **A1**: Frente; **A2**: verso. Teste de triagem o ágar suplementado com 2µg/mL do antifúngico ITC mostrando o isolado resistente LIF 2444. **B1**: Frente; **B2**: Anverso.

Tabela 2. Resultado do teste de triagem de 202 isolados de *Aspergillus fumigatus*. Dados brutos podem ser observados no anexo 1.

Antifúngico	Concentração da Triagem de Resistência (µg/mL) resistentes/total		Resistentes confirmados por Microdiluição	Taxa de falsos-resistentes (%)
	0,5	2		
	n (%)			
Itraconazol	*	4(1.98) ^a	2	0.99
Voriconazol	*	1(0.49) ^b	1	0
Posaconazol	1(0.49) ^c	*	1	0

*não realizada; a) CIM para ITC foram 8 e ≥128 µg/mL; b) para VRC foi de 32µg/mL e para c) PSC foi de 1µg/mL.

4.5. Teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos azólicos

Todos os isolados que foram considerados resistentes no teste de triagem, e uma porcentagem dos isolados considerados suscetíveis foram submetidos a

avaliação da Concentração Inibitória Mínima (45). Foram utilizados 147, 138 e 146 isolados suscetíveis para estabelecer a taxa de falso-suscetível respectivamente para ITC, VRC e PSC, que foi de 0% para os três antifúngicos avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para 147 *Aspergillus fumigatus* suscetíveis a itraconazol, 138 isolados suscetíveis ao voriconazol e 146 isolados suscetíveis ao posaconazol e respectivas taxas de falso-suscetíveis no teste de triagem. Dados brutos podem ser observados no anexo 1.

Antifúngico	Distribuição dos CIMs ^a ($\mu\text{g/mL}$)						Falso-suscetível (%)
	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	
	n (%)						
Itraconazol	*	*	*	55(37.4)	87(59.2)	5(3.4)	0
Voriconazol	*	*	4(3.0)	43(31.0)	87(63.0)	4(3.0)	0
Posaconazol	1(0.7)	20(13.7)	99 (67.8)	26(17.8)	*	*	0

^aCIM: concentração mínima inibitória; *não realizado.

4.6. Análise de mutações no gene *cyp51A*

O sequenciamento do gene *cyp51A* dos isolados considerados resistentes no teste de Microdiluição e dos isolados sequenciais pertencentes aos mesmos pacientes não revelou mutações no gene da *cyp51A* (Tabela 4) (65).

Tabela 4. Isolados resistentes e isolados sequenciais dos mesmos pacientes submetidos a busca de mutações nucleotídicas e substituições nos aminoácidos.

Dados dos Isolados				ITC		VRC		PSC		Substituição de aminoácidos derivada das mutações de ponto						TR34	TR46
Paciente	LIF	Data	Material Clínico	Triagem 2µg/mL	CIM µg/mL	Triagem 2µg/mL	CIM µg/mL	Triagem 0,5 µg/mL	CIM µg/mL	F46Y	M172V	N248T	D255E	E427K	N248K		
	2163	01/04/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	2230	15/07/14	Escarro	S	0,5	S	NR	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	2295	26/11/14	Escarro	S	NR	S	0,5	S	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
	2444	28/07/15	Escarro	R	128	S	2	R	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2515	06/10/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
12	2559	26/11/15	Escarro	S	0,5	S	NR	S	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
	2625	21/03/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	2662	12/05/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	2679	21/06/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	2832	03/02/17	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	2836	29/03/17	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,125	-	-	-	-	-	-	-	-
	2551	02/12/15	Escarro	S	0,5	R	0,5	S	0,25	NR*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	2552	02/12/16	Escarro	S	1	R	32	S	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
32	2553	02/12/16	Escarro	S	1	S	NR	S	NR	-	-	-	-	-	-	-	-
	2739	12/08/156	Escarro	S	2	S	1	S	0,125	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	2758	27/09/16	Escarro	S	2	S	0,5	S	0,125	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	2153	18/03/14	Escarro	S	0,5	S	NR	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
33	2195	23/05/14	Escarro	R	1	S	NR	S	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	2328	28/01/15	Escarro	R	8	S	1	S	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-

ITC: Itraconazol; VRC: Voriconazol; PSC: Posaconazol; CIM: Concentração Inibitória Mínima; NR: Não realizado; S: Suscetível; R: Resistente.

5. DISCUSSÃO

A incidência de micoses oportunistas invasivas aumentou devido à expansão da população de pacientes imunocomprometidos, incluindo pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos e receptores de transplante de células hematopoiéticas, pacientes com câncer, pacientes com AIDS, neonatos prematuros, pacientes idosos e pacientes que se recuperam de cirurgias. Apesar de algumas opções de tratamento efetivas, essas micoses estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (73).

Aspergillus fumigatus é o principal agente de aspergilose invasiva (AI) em todo o mundo, sendo uma infecção fúngica oportunista, principalmente documentada em pacientes com doenças malignas hematológicas, imunodeficiências primárias, e pacientes tratados com altas doses de esteroides. Dependendo da gravidade da doença e condições subjacentes, as taxas de mortalidade de AI podem chegar de 40-80% (74). Outra manifestação importante da aspergilose é a aspergilose pulmonar crônica (APC) que geralmente afeta pacientes com doença pulmonar subjacente e, ao contrário de AI, APC ocorre em pacientes imunocompetentes (75). Bronquite causada por espécies de *Aspergillus* foi recentemente descrita, especialmente em pacientes com fibrose cística ou bronquiectasia não fibrocística, receptores de transplante de pulmão e aqueles que recebem ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva (76). As manifestações alérgicas devidas aos conídios de *Aspergillus* inalados incluem aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e asma grave com sensibilização fúngica.

A partir dos 202 isolados clínicos, mantidos em água na Micoteca do LIF, selecionados para este estudo, foi possível a reativação de todos (100%). Embora alguns apresentassem contaminação foi possível selecionar e recuperar todos os isolados para o trabalho.

Os isolados clínicos de *A. fumigatus* selecionados para esse estudo estavam armazenados em água destilada estéril a temperatura ambiente. A preservação em água destilada estéril a temperatura ambiente, conforme descrito por Castellani em 1939 (77), é um método simples, rápido e barato de preservação, e se mostrou muito eficiente para a preservação dos isolados selecionados para o presente estudo. O método de Castellani é a metodologia disponível para a conservação do elevado

número de isolados clínicos de leveduras e fungos filamentosos obtidos na rotina do HC-UNICAMP.

Um estudo de Guimarães et al. (78) feito com espécies de *Aspergillus* provou que o método Castellani é indicado como o mais vantajoso entre o método de repique contínuo e o liofilizador, além de ter uma alta taxa de viabilidade e preservar as características dos isolados, é considerado um método simples, de baixo custo, não demanda energia elétrica e, não é afetado por nenhuma circunstância devido à falta desta. Assim, todos os isolados reativados no presente trabalho, foram estocados novamente em água destilada estéril e mantidos em temperatura ambiente para posterior utilização.

Todos os 202 isolados foram identificados como *A. fumigatus* pelas suas características macromorfológicas e micromorfológicas. Com a introdução de técnicas de biologia molecular para sequenciamento de DNA, tornou-se possível diferenciar diversas espécies de *Aspergillus* que são idênticas morfologicamente (6, 19, 70). Neste caso, somente 1 (0.5%) isolado foi identificado como *N. pseudofischeri*.

Khare et al. (79) mostraram que é possível ocorrer a identificação incorreta do fungo *N. pseudofischeri* e confundir com *A. fumigatus*, pois suas características macromorfológicas e micromorfológicas são idênticas, portanto, é necessária a identificação molecular de todos os isolados para confirmação de gênero e espécie. *Neosartorya pseudofischeri* é a forma telemórfica (sexual) de *A. thermomutatus*, tipicamente um organismo ambiental, que foi identificado como agente causador em 5 casos de infecção humana, incluindo aspergilose pulmonar invasiva, osteomielite, peritonite e otite invasiva (80-82).

O diagnóstico laboratorial da aspergilose é realizado por pesquisa direta do agente em fluído biológico e/ou biópsia, cultivo do agente, exame anatomopatológico, e identificação do agente por suas características morfológicas. Depois de diagnosticada a infecção, os laboratórios enfrentam outro desafio, a diferenciação entre as espécies. Equipamentos automatizados como VITEK® 2 e BD Phoenix®, somente identificam leveduras e bactérias. Ferramentas moleculares estão restritas a centros de referência e a grupos de pesquisa e ainda tem um alto custo, impossibilitando sua aplicação em laboratórios de rotina, que nem sempre podem dispor do serviço de laboratórios de apoio. Portanto, o treinamento do microbiologista para fazer a identificação correta e precisa de fungos filamentosos ainda é necessário (34).

Mais recentemente, outra metodologia automatizada para identificação de bactérias, leveduras e também de fungos filamentosos vem sendo introduzida nos laboratórios de rotina, a espectrometria de massa (MALDI-TOF). Essa técnica detecta moléculas de massa maior, como as proteínas. O teste então baseia-se na detecção de um grande espectro de proteínas, podendo então discriminar melhor as espécies. A espectrofotometria de massa é largamente utilizada em outras áreas, como a toxicologia, mas até então não era uma realidade na rotina dos laboratórios de microbiologia. “A evolução ocorreu quando a matriz utilizada para ionizar as proteínas foi mudada para que pudesse ionizar as proteínas ribossomais – estas bem mais conservadas do que as proteínas de superfície – o que levou à identificação de espécies e até subespécies de muitos microrganismos” (83).

Rychert et al. (84) avaliaram espécies de diversos fungos filamentosos pelo MALDI-TOF (Vitek MS ®) e a sua correlação com o sequenciamento de DNA foi satisfatória. Essa pode ser uma alternativa para os laboratórios de rotina para aumentar a eficiência na identificação de fungos filamentosos.

No HC-UNICAMP, *A. fumigatus* é a espécie de fungo filamentoso mais prevalente isolada de materiais clínicos de origem respiratória, como, escarro e lavado brônquico alveolar (LBA).

Estudo de Tashiro et al. (85) avaliaram durante 11 anos, 165 amostras clínicas positivas para *Aspergillus* no laboratório. Durante os anos de 1998 a 2004, *A. fumigatus* foi a espécie mais comumente isolada (58,2%), seguida de *A. niger* (20,9%), *A. flavus* (10,4%), *A. versicolor* (6,0%) e *A. terreus* (4,5%).

Datta et al. (86) avaliaram culturas positivas de fungos para *Aspergillus* durante 5 meses em seu hospital. Foram avaliados 27 pacientes com problemas pulmonares. O único microrganismo isolado foi *A. fumigatus* em 50 culturas.

Em estudo recente neste Laboratório, Reichert-Lima et al. (87), determinaram como sendo de 74% a taxa de isolados de *A. fumigatus*, seguidos de *A. flavus* (12%).

Com o aumento das micoses sistêmicas e oportunistas nos últimos anos, devido ao aumento de casos de estados de imunossupressão, o estudo da suscetibilidade dos antifúngicos frente aos agentes etiológicos dessas micoses se torna essencial para o tratamento adequado para esses agentes etiológicos, além disso, o teste de suscetibilidade tem como objetivo acompanhar o possível surgimento de isolados resistentes.

A Microdiluição em caldo é o padrão ouro de teste de suscetibilidade para fungos filamentosos (CLSI M38-A2) (45). No laboratório de micologia do HC-UNICAMP não é realizado de rotina nenhum teste de suscetibilidade para fungos filamentosos, que realiza somente o teste de disco-difusão para leveduras isoladas de hemocultura.

O teste de Microdiluição em caldo demanda muitas etapas de preparação (uma vez que ainda não é possível a aquisição de placas prontas no Brasil) e requer muita experiência para interpretação e leitura dos resultados. Conseqüentemente, estes testes raramente são realizados em laboratórios de rotina ou os isolados são enviados para laboratórios especializados para sua realização, retardando assim a instauração da terapêutica apropriada ao paciente (88).

Grande dificuldade ainda existe na interpretação e correlação dos resultados destes testes com a clínica. O documento do CLSI ainda não apresenta pontos de corte para determinação de suscetibilidade ou resistência e espécies e *Aspergillus* (45). Apenas os documentos do EUCAST (89) expõem alguns valores que podem ser utilizados para algumas espécies.

Com o propósito de facilitar a identificação de *A. fumigatus* resistentes aos azólicos nos laboratórios, Buil et al. (90) desenvolveram um teste de triagem feito em ágar RPMI 1640 acrescido com antifúngicos azólicos (ITC, VRC e PSC), que consiste em uma placa própria que contém 3 poços com antifúngicos azólicos e 1 poço para controle de crescimento do isolado.

Esse teste de triagem foi validado por Arendrup et al. (91) na Holanda utilizando 39 isolados de *A. fumigatus*, e é vendido comercialmente com o nome de VipCheck®. As concentrações de antifúngico utilizadas nos poços são 4µg/mL de ITC, 2µg/mL de VRC e 0,5µg/mL de PSC.

Seguindo o propósito do teste de triagem criado na Holanda (90), neste estudo foi desenvolvido um teste de triagem rápido e fácil e que pode ser preparado *in house*, com materiais disponíveis em todos os laboratórios de rotina. O teste foi feito com ágar Mueller-Hinton (MH) suplementado com 2% de dextrose com o acréscimo de 2µg/mL de ITC, 2µg/mL de VRC e 0,5µg/mL de PSC, utilizando placas de Petri. O teste foi validado com 202 isolados de *A. fumigatus* e apresentou uma satisfatória correlação com os testes de Microdiluição em caldo de acordo com o documento M38-A2 do CLSI (45). A taxa de falso-suscetível foi de 0% para todos os antifúngicos

avaliados, não sendo obrigatória a realização de Microdiluição para nenhum isolado que mostrar ser suscetível no teste de triagem.

Por sua vez, a taxa de falsos-resistentes foi de 0,99%, para o antifúngico ITC. Somente 2 isolados (LIF 2195 e LIF 2251) cresceram no teste contendo 2µg/mL do antifúngico e obtiveram uma CIM de 1µg/mL na Microdiluição em caldo (Anexo 1). Frente aos outros antifúngicos avaliados (VRC e PSC) não foi observada taxa de falso-resistente, assim, reduzindo drasticamente o número de isolados a serem submetidos a Microdiluição.

Neste trabalho o principal propósito era detecção de isolados de *A. fumigatus* resistentes a azólicos para possível respaldo clínico. Deste modo, as concentrações utilizadas nos testes foram relacionadas às concentrações séricas de cada antifúngico (92). Testes que avaliam altas concentrações de antifúngicos tem o propósito de buscar isolados com mutações na *cyp51A*.

Embora ainda não haja uma correlação clínica bem estabelecida entre o valor de CIM encontrado e a taxa de cura, estudos tem mostrado que a mortalidade é maior em casos de pacientes cujos isolados cultivados carregam as mutações TR₃₄/L98H ou TR₄₆/Y121F/T289A, o que reforça a importância da correta identificação desses isolados (93).

Verweij et al. (94) relatam recebiam fungos de outros laboratórios da Holanda para identificação e testar a suscetibilidade dos isolados em seu laboratório de referência. Desde 2002, utilizavam a Microdiluição em caldo como padrão ouro para os seus testes e foi observado um aumento de isolados de *A. fumigatus* com CIMs elevadas frente aos azólicos: VRC: 2-5µg/mL, ITC ≥16µg/mL e PSC: 0,5-1µg/mL. Foi investigado o motivo do aumento dos CIM e foi encontrada uma substituição de aminoácidos do gene *cyp51A* no códon (L98H), junto com uma repetição no gene promotor que é responsável pelo fenótipo de resistência aos azólicos.

Essas mutações podem estar associadas a tratamento prévio com azólicos. Howard et al. (53) relataram uma frequência crescente de resistência de isolados de *A. fumigatus* isolados de pacientes tratados previamente com azólicos. Essa resistência fenotípica parece depender do modo de reprodução dos isolados. Esse desenvolvimento de resistência pode acontecer principalmente em pacientes com aspergiloma, pois eles se reproduzem dentro da cavidade pulmonar por via assexuada, assim permitindo a adaptação ao ambiente.

Outra explicação é o uso de pesticidas no ambiente, que pode acarretar a resistência através da exposição de *A. fumigatus* aos derivados azólicos utilizados na agricultura. Os fungicidas são aplicados repetidamente por um longo período de tempo o que poderia criar uma pressão de compostos azólicos sobre os fungos saprófitos. Estudo de Verweij et al. (56) relatam que a resistência e o desenvolvimento dessas mutações possa ser causada especificamente pelo uso indiscriminado de pesticidas no ambiente.

Sendo o *A. fumigatus* o fungo filamentosos mais comumente isolado em IFIs (74), a necessidade de monitoramento desse microrganismo é constante. Recentemente vários relatos de *A. fumigatus* resistentes aos tratamentos disponíveis tem sido reportado na literatura (28, 49, 60, 95, 96).

Recentemente no Reino Unido (61), um estudo relatou o isolamento de *A. fumigatus* resistente a todos os azólicos, com os valores de CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ para ITC; CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ para VRC e CIM: $1\mu\text{g/mL}$ para PSC, assim, restando poucas opções terapêuticas adequadas para tratamento. Foi feita a busca de mutações no gene da *cyp51A* e foi encontrada a mutação TR₄₆/Y121F/T289A.

Um estudo de Negri et al. (74) realizado no Brasil, avaliou 221 isolados de *A. fumigatus* a partir da técnica de Microdiluição em caldo e fez buscas de mutações no gene da *cyp51A* para ver se encontrava alguma mutação que acarretasse o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos azólicos. Os autores relataram os seguintes valores de CIM: 0.5- $1\mu\text{g/mL}$ para ITC; 0.125- $2\mu\text{g/mL}$ para VRC e 0.03- $0.5\mu\text{g/mL}$ para PSC. Neste trabalho não foi encontrado nenhum microrganismo com mutações na *cyp51A*.

No presente estudo, foram analisados 202 isolados de *A. fumigatus* com os seguintes intervalos de CIM: 0.5- $128\mu\text{g/mL}$ para ITC; 0.25- $32\mu\text{g/mL}$ para VRC e 0,06- $1\mu\text{g/mL}$ para PSC (Tabela 3). Foram encontrados apenas 3 isolados resistentes aos azólicos, LIF 2444 (CIM $\geq 128\mu\text{g/mL}$ para ITC e $1\mu\text{g/mL}$ para PSC), LIF 2328 (CIM: $8\mu\text{g/mL}$ para ITC) LIF 2552 (CIM: $32\mu\text{g/mL}$ para VRC). Os isolados LIF 2444, LIF 2552 e LIF 2328, que obtiveram elevados valores de CIM quando testados frente aos antifúngicos azólicos, foram submetidos a busca de mutação na *cyp51A* e não foi encontrada nenhuma mutação de ponto (Tabela 4).

Resistência aos azóis não tinha sido descrita previamente no Brasil, o primeiro relato dessa resistência foi na Holanda (93). Primeiramente, a resistência foi

investigada pela falha terapêutica dos pacientes que estavam em uso de voriconazol e não estavam respondendo ao tratamento.

Assim como alguns dos trabalhos mencionados, este estudo traz a prevalência da espécie *A. fumigatus* em episódios de aspergilose registrados durante o período de 2014 a 2017 no HC-UNICAMP. Ademais, pode-se observar que os valores obtidos para os intervalos de leitura dos antifúngicos testados confirmam que o perfil de suscetibilidade está mudando. Um estudo de Teixeira et al. (67) realizado em 2005 em nossa instituição, relatou que não havia nenhum *A. fumigatus* resistente tanto em isolados ambientais como clínicos. Isso comprova que a suscetibilidade dos isolados tem sofrido transformações.

Um estudo de Snelders et al. (97) avaliaram 76 isolados de *A. fumigatus* sensíveis aos azólicos e não foi encontrada nenhuma mutação no gene *cyp51A*, porém foram encontradas cinco mutações F46Y, M172V, N248T, D255E e E427K em 13 isolados sensíveis aos azólicos. As mesmas mutações foram encontradas em um isolado resistente aos azólicos. Essas mesmas mutações foram descritas por Rodriguez et al. (98) em isolados resistentes e isolados suscetíveis aos azólicos. Portanto, as alterações de aminoácidos encontradas na proteína codificada pelo gene *cyp51A* não estão exclusivamente correlacionadas com o desenvolvimento de resistência aos azólicos. Essas alterações de aminoácidos estão todas distribuídas na periferia da proteína do gene *cyp51A* e não estão próximas a nenhum dos canais de acesso do antifúngico no gene. Sendo assim, não é esperado nenhum efeito sobre a atividade biológica da proteína *cyp51A* ou no encaixe dos compostos de azólicos nos canais de acesso.

Um estudo realizado no Japão evidenciou que 43% dos isolados resistentes aos azóis não continham mutações expressas no gene *cyp51A* (99).

As CIMs altas frente aos azóis podem ser explicadas por outros mecanismos de resistência aos azóis em *A. fumigatus*, tais como: bombas de efluxo, mutação na *hapE*, importação de colesterol por *A. fumigatus* e superexpressão do gene *cyp51B* (66, 100).

As mutações não-*cyp51A* podem ocorrer das seguintes maneiras: mutações na proteína SrbA, é um fator regulador da família SREBP (proteína de ligação do regulador do esterol), que está envolvido na biossíntese de esterol. É possível que a proteína SrbA possa interferir no gene da *cyp51A* e influenciar a sua atividade. Outros mecanismos também podem induzir a resistência aos azóis, como uma mutação no

fator da transcrição da *hapE* que liga a sequência CCAAT, causando a superexpressão de transportadores de MFS (principal mediador) ou a superexpressão de transportadores ABC (pertence à família de ligação do gene) (101). Outro importante mecanismo de resistência aos azóis é mediado pela superexpressão de bombas de resistência a multidrogas (MDR). Sob uma maior atividade da bomba de efluxo, os azóis podem ser fáceis de remover do interior da membrana fúngica, levando a uma resistência aos azóis. Long et al. (102) citaram os genes que causam a superexpressão de bombas de efluxo que são: *AfuMDR1*, *AfuMDR2*, *AfuMDR3*, *AfuMDR4* e *artF* (103).

Neste estudo, 3 isolados demonstraram-se resistentes e não foi encontrada nenhuma mutação no gene da *cyp51A*, evidenciando a necessidade de busca de outros mecanismos de resistência.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível reativar 100% dos isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* provenientes de amostras clínicas, indicando que o método é eficiente para armazenamento de fungos desta espécie.
- A identificação por sequenciamento de DNA utilizando os primers β tubulina 2A/B identificou somente 1 isolado como *Neosartorya pseudofisheri*, e o restante (201) como *Aspergillus fumigatus*.
- O teste de triagem mostrou ser eficaz quando comparado ao teste de Microdiluição em caldo, com uma taxa de falsos-suscetíveis de 0%, sendo necessária a realização do teste de Microdiluição em caldo para os isolados considerados resistentes (1,5%).
- Nos testes de suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos, 98,5% dos isolados clínicos mostraram ser suscetíveis aos azóis.
- Nos 3 isolados considerados resistentes não foram encontradas mutações no gene da *cyp51A*, evidenciando a necessidade de busca de outros mecanismos de resistência.

Perspectivas futuras (Projeto de doutorado):

- Os 44 pacientes continuaram sendo avaliados, afim de acompanhar o possível surgimento de mais isolados resistentes e com mutações;
- Os isolados resistentes e sem mutações serão avaliados quanto a presença de outras mutações não-*cyp51A*.

7. REFERÊNCIAS

1. Palousova D, Lengerova M, Volfova P, Bejdak P, Kocmanova I, Mayer J, et al. Invasive fungal infections in immunocompromised patients with focus on aspergillosis and its causative agents. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2012;18(4):96-101.
2. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):545-61, vi.
3. Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij PE. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(7):625-33.
4. Alvarez Lerma F, Olaechea Astigarraga P, Palomar Martinez M, Rodriguez Carvajal M, Machado Casas JF, Jimenez Quintana MM, et al. Respiratory infections caused by *Aspergillus spp.* in critically ill patients admitted to the intensive care units. *Med Intensiva.* 2014;39(3):149-59.
5. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis.* 2000;31(6):1524-8.
6. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1231-40.
7. Krijghsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, Wang F, Muller WH, Dijksterhuis J, et al. Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2013;74(1):1-29.
8. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4(165):165rv13.
9. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses.* 2009;52(3):206-22.
10. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;46(3):327-60.
11. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3138-41.
12. Talbot JJ, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA, Kidd SE, Pitt J, et al. Discovery of *Aspergillus frankstonensis* sp. nov. during environmental sampling for animal and human fungal pathogens. *PLoS One.* 2017;12(8):e0181660.
13. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1244-51.

14. Swilaiman SS, O'Gorman CM, Balajee SA, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2013;12(7):962-9.
15. Cho SY, Lee DG, Choi JK, Lee HJ, Kim SH, Park SH, et al. Characteristics of culture-positive invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases: Comparison between *Aspergillus fumigatus* and non-fumigatus *Aspergillus* species. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(49):e8841.
16. Patterson TF, Thompson GR, D, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(4).
17. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(10):1143-238.
18. Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs*. 2017;77(6):599-613.
19. Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:459405.
20. Burgel PR, Paugam A, Hubert D, Martin C. *Aspergillus fumigatus* in the cystic fibrosis lung: pros and cons of azole therapy. *Infect Drug Resist*. 2016;9:229-38.
21. Hamprecht A, Morio F, Bader O, Le Pape P, Steinmann J, Dannaoui E. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* in Patients with Cystic Fibrosis: A Matter of Concern? *Mycopathologia*. 2017.
22. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998;26(4):781-803; 4-5.
23. Moodley L, Pillay J, Dheda K. Aspergilloma and the surgeon. *J Thorac Dis*. 6(3) 2014. p. 202-9.
24. Brik A, Salem AM, Kamal AR, Abdel-Sadek M, Essa M, El Sharawy M, et al. Surgical outcome of pulmonary aspergilloma. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34(4):882-5.
25. Akbari JG, Varma PK, Neema PK, Menon MU, Neelakandhan KS. Clinical profile and surgical outcome for pulmonary aspergilloma: a single center experience. *Ann Thorac Surg*. 2005;80(3):1067-72.
26. Kasprzyk M, Pieczynski K, Mania K, Gabryel P, Piwkowski C, Dyszkiewicz W. Surgical treatment for pulmonary aspergilloma - early and long-term results. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*. 2017;14(2):99-103.
27. Araujo R, Amorim A, Gusmão L. Diversity and specificity of microsatellites within *Aspergillus* section *Fumigati*. *BMC Microbiol* 2012; 12:154 p.

28. Ahmad S, Joseph L, Hagen F, Meis JF, Khan Z. Concomitant occurrence of itraconazole-resistant and susceptible strains of *Aspergillus fumigatus* in routine cultures. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(2):412-5.
29. Howard SJ, Pasqualotto AC, Anderson MJ, Leatherbarrow H, Albarrag AM, Harrison E, et al. Major variations in *Aspergillus fumigatus* arising within aspergillomas in chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses.* 2013;56(4):434-41.
30. Escribano P, Pelaez T, Bouza E, Guinea J. Microsatellite (STRAf) genotyping cannot differentiate between invasive and colonizing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2015;53(2):667-70.
31. Rosehart K, Richards MH, Bidochka MJ. Microsatellite analysis of environmental and clinical isolates of the opportunist fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* 2002;51(12):1128-34.
32. Bart-Delabesse E, Cordonnier C, Bretagne S. Usefulness of genotyping with microsatellite markers to investigate hospital-acquired invasive aspergillosis. *J Hosp Infect.* 1999;42(4):321-7.
33. Denning DW, Stevens DA. Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2,121 published cases. *Rev Infect Dis.* 1990;12(6):1147-201.
34. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Takahashi de Melo. Tratado de Micologia médica. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2002;44(5):297-8.
35. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(10):1417-27.
36. Tanase AD, Colita A, Marculescu A, Berteanu C, Streinu Cercel A, Stoica M, et al. Using the galactomannan antigen assay in the diagnosis of invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(2):379-82.
37. White PL, Posso RB, Barnes RA. Analytical and Clinical Evaluation of the PathoNostics AsperGenius Assay for Detection of Invasive Aspergillosis and Resistance to Azole Antifungal Drugs Directly from Plasma Samples. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2356-66.
38. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):201-11.
39. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4465-8.

40. Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindos G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*. 2006;19(2):130-9.
41. Denardi LB, et al. Evaluation of the efficacy of a posaconazole and anidulafungin combination in a murine model of pulmonary aspergillosis due to infection with *Aspergillus fumigatus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017;0(0).
42. Hebert MF, Blough DK, Townsend RW, Allison M, Buell D, Keirns J, et al. Concomitant tacrolimus and micafungin pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2005;45(9):1018-24.
43. Bhatena DB, Bullock WE, Nuttall CE, Luke RG. The effects of amphotericin B therapy on the intrarenal vasculature and renal tubules in man. A study of biopsies by light, electron and immunofluorescence microscopy. *Clin Nephrol*. 1978;9(3):103-10.
44. Gupta P, Khare V, Kumar D, Ahmad A, Banerjee G, Singh M. Comparative Evaluation of Disc Diffusion and E-test with Broth Micro-dilution in Susceptibility testing of Amphotericin B, Voriconazole and Caspofungin against Clinical *Aspergillus* isolates. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(1):Dc04-7.
45. CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Approved Standard—Second Edition. 282008. p. 13.
46. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(6):1364-8.
47. Kuipers S, Bruggemann RJ, de Sevaux RG, Heesakkers JP, Melchers WJ, Mouton JW, et al. Failure of posaconazole therapy in a renal transplant patient with invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* with attenuated susceptibility to posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3564-6.
48. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. *PLoS Pathog*. 92013.
49. Alvarez-Moreno C, Lavergne RA, Hagen F, Morio F, Meis JF, Le Pape P. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. *Sci Rep*. 72017.
50. Onishi K, Muhammad Sarumoh B, Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Toyotome T. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* Containing a 34-bp Tandem Repeat in *cyp51A* Promoter is Isolated from the Environment in Japan. *Med Mycol J*. 2017;58(2):E67-e70.
51. Leonardelli F, Theill L, Nardin ME, Macedo D, Dudiuk C, Mendez E, et al. First itraconazole resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolate harbouring a G54E substitution in *Cyp51A* in South America. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(1):46-8

52. Hurst SF, Berkow EL, Stevenson KL, Litvintseva AP, Lockhart SR. Isolation of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* from the environment in the south-eastern USA. *J Antimicrob Chemother.* 2017.
53. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(7):1068-76.
54. Arendrup MC, Mavridou E, Mortensen KL, Snelders E, Frimodt-Moller N, Khan H, et al. Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One.* 2010;5(4):e10080.
55. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJ, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1846-54.
56. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis.* 2009;9(12):789-95.
57. Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema GH, van der Lee HA, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 2012;7(3):e31801.
58. van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, Arends JP, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJ, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis.* 2013;57(4):513-20.
59. Vermeulen E, Maertens J, Schoemans H, Lagrou K. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Euro Surveill.* 2012;17(48).
60. Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS, Gaur SN, Klaassen CH, Meis JF. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(2):362-6.
61. Moore CB, Novak-Frazer L, Muldoon E, Dunn KW, Masania R, Richardson MD, et al. First isolation of the pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus cyp51A* TR46/Y121F/T289A mutant in a UK patient. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(4):512-4.
62. Hodiament CJ, Dolman KM, Ten Berge IJ, Melchers WJ, Verweij PE, Pajkrt D. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol.* 2009;47(2):217-20.

63. Krishnan Natesan S, Wu W, Cutright JL, Chandrasekar PH. In vitro-in vivo correlation of voriconazole resistance due to G448S mutation (*cyp51A* gene) in *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(3):272-7.
64. Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gono T, et al. A Novel Zn²⁺-Cys⁶ Transcription Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of *Aspergillus fumigatus* by Co-regulating *cyp51A* and *cdr1B* Expressions. *PLoS Pathog*. 132017.
65. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 2017;216(suppl_3):S436-s44.
66. Buied A, et al. High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;68(3):512-4.
67. Teixeira AB, Silva M, Lyra L, Luz EA, Uno J, Takada H, et al. Antifungal susceptibility and pathogenic potential of environmental isolated filamentous fungi compared with colonizing agents in immunocompromised patients. *Mycopathologia*. 2005;160(2):129-35.
68. Rodrigues EG, Lirio VS, Lacaz Cda S. Preservation of fungi and actinomycetes of medical importance in distilled water. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992;34(2):159-65.
69. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(4):1323-30.
70. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1510-5.
71. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-9.
72. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-8.
73. Nucci M, et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;51(5):561-70.
74. Negri CE, Goncalves SS, Sousa ACP, Bergamasco MD, Martino MDV, Queiroz-Telles F, et al. Triazole Resistance Is Still Not Emerging in *Aspergillus fumigatus* Isolates Causing Invasive Aspergillosis in Brazilian Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11).

75. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47(1):45-68.
76. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70(3):270-7.
77. Hartung de Capriles C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 1989;106(2):73-9.
78. Guimarães LC, Fernandes AP, Chalfoun SM, Batista LR. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. *Braz J Microbiol*. 452014. p. 43-7.
79. Khare R, Gupta S, Arif S, Jentoft ME, Deziel PJ, Roden AC, et al. Misidentification of *Neosartorya pseudofischeri* as *Aspergillus fumigatus* in a lung transplant patient. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2722-5.
80. Ghebremedhin B, Bluemel A, Neumann KH, Koenig B, Koenig W. Peritonitis due to *Neosartorya pseudofischeri* in an elderly patient undergoing peritoneal dialysis successfully treated with voriconazole. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 5):678-82.
81. Jarv H, Lehtmaa J, Summerbell RC, Hoekstra ES, Samson RA, Naaber P. Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):925-8.
82. Balajee SA, Gribskov J, Brandt M, Ito J, Fothergill A, Marr KA. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(12):5996-9.
83. Resende RR, Goulart VAM. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. *Nanocell News | O jornal eletrônico do Instituto NANOCELL*. 2017.
84. Rychert J, Slechta ES, Barker AP, Miranda E, Babady NE, Tang YW, et al. Multi-Center Evaluation of the VITEK MS v3.0 System for the Identification of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol*. 2017.
85. Tashiro T, Sciences DoH, Izumikawa K, Tashiro M, et al. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Medical Mycology*. 2011;49(6):581-7.
86. B Datta RB, R Hobson, H MacLaughlin. *Aspergillus* in Sputum Culture – Infection or Colonisation. | D45. Fungal respiratory tract infections. D45 Fungal Respiratory Tract Infections. 2009.
87. Reichert Lima F, Lyra L, Pontes L, Moretti ML, Pham CD, Lockhart SR, et al. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B resistant isolates. *Mycoses*. 2018.

88. van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(6):1041-4.
89. 2008 E-ESoCMaID. EUCAST: Clinical breakpoints. 2017.
90. Buil JB, van der Lee HAL, Rijs A, Zoll J, Hovestadt J, Melchers WJG, et al. Agar-based screening for azole resistance in *Aspergillus fumigatus* using VIPcheck: A single centre evaluation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017.
91. Arendrup MC, Verweij PE, Mouton JW, Lagrou K, Meletiadis J. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 2017.
92. Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM, Richardson MD, Gorton R, Hope WW. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(5):1162-76.
93. Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild MJ, Cornely OA, Buchheidt D, Spiess B, et al. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(5):1522-6.
94. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med*. 356. United States 2007. p. 1481-3.
95. Lestner J, Hope WW. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(7):911-26.
96. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):1897-904.
97. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJ. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus cyp51A* based on protein homology modeling. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2425-30.
98. Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(7):2468-72.
99. Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, et al. Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):584-7.
100. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2431-8.

101. Brillowska-Dabrowska A, Mroczynska M, Nawrot U, Wlodarczyk K, Kurzyk E. Examination of *cyp51A* and *cyp51B* expression level of the first Polish azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(4):837-9.
102. Long N, Zeng L, Qiao S, Li L, Zhong G. *Aspergillus fumigatus* Afssn3-Afssn8 Pair Reverse regulates Azole Resistance by Conferring Extracellular Polysaccharide, Sphingolipid Pathway Intermediates and Efflux Pumps to Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018.
103. Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, et al. The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-*cyp51A*-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1486-96.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Dados da Triagem de Resistência, da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a Itraconazol (ITC), Voriconazol (VRC) e Posaconzol (PSC) dos 202 isolados de *Aspergillus* e do Sequenciamento de DNA.

Dados dos Isolados				Itraconazol		Voriconazol		Posaconzol		Sequenciamento		
Paciente	LIF	Data	Material Clínico	ITC 2µg/mL	CIM µg/mL	VRC 2µg/mL	CIM µg/mL	PSC 0,5 µg/mL	CIM µg/mL	Espécie	Homologia	Acesso
1	2529	10/11/15	Swab de narina	S	*	S	0,5	*	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2536	10/11/15	Swab de narina	S	*	S	0,5	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
2	2165	08/04/14	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2178	29/04/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
3	2612	26/04/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
	2620	02/02/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2622	22/03/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2730	02/08/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
4	2310	06/01/15	Escarro	S	1	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2367	17/03/15	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2375	01/04/15	LBA	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
5	2218	01/07/14	Escarro	S	*	S	*	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2267	30/09/14	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2318	16/01/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2343	10/02/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
6	2651	17/06/16	Abscesso	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2663	20/05/16	Biopsia osso	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
	2729	18/08/16	Abscesso	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
7	2200	27/05/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX545087
	2239	22/07/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2326	27/01/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX545087
	2377	07/04/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
	2414	09/06/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
	2428	07/07/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2591	15/03/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2598	29/03/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2706	19/07/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
2714	27/07/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505	
8	2216	01/07/14	Escarro	S	*	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2441	21/07/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KF175505
	2626	29/03/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2680	14/06/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU885421
9	2383	28/04/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	AY048754
	2618	19/01/16	Escarro	S	*	S	0,25	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2665	24/05/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
10	2268	30/09/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ75506
	2489	08/09/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2501	29/09/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2523	27/10/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
	2572	19/01/16	Escarro	S	1	S	0,25	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2595	22/03/16	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2619	19/01/16	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KX171713
	2624	22/03/16	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,06	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2628	03/05/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2632	29/04/16	Escarro	S	1	S	0,25	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
2633	03/05/16	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505	
2660	10/05/16	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506	

CIM: Concentração inibitória mínima; LBA: lavado brônquico alveolar; *: não realizado.

CONTINUAÇÃO - ANEXO 1: Dados da Triagem de Resistência, da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a Itraconazol (ITC), Voriconazol (VRC) e Posaconazol (PSC) dos 202 isolados de *Aspergillus* e do Sequenciamento de DNA.

Paciente	Dados dos Isolados			Itraconazol		Voriconazol		Posaconzol		Sequenciamento		
	LIF	Data	Material Clínico	ITC 2µg/mL	CIM µg/mL	VRC 2µg/mL	CIM µg/mL	PSC 0,5 µg/mL	CIM µg/mL	Espécie	Homologia	Acesso
11	2293	25/11/14	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KP724982
	2355	24/02/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2527	10/11/15	Escarro	S	*	S	0,5	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
12	2163	01/04/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2230	15/07/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2295	26/11/14	Escarro	S	*	S	0,5	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2444	28/07/15	Escarro	R	128	S	2	R	1	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2515	06/10/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2559	26/11/15	Escarro	S	0,5	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2625	21/03/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2662	12/05/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2679	21/06/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ177506
	2832	03/02/17	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ177505
2836	29/03/17	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424	
13	2440	21/07/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2546	20/11/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
14	2496	22/09/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2560	01/12/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2621	16/02/16	Escarro	S	0,5	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX545087
	2661	10/05/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
	2669	07/05/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KF669421
	2735	09/08/16	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KF669421
	2765	11/10/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2807	11/10/16	Escarro	S	1	S	0,25	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2814	08/11/16	Escarro	S	2	S	0,5	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2823	06/12/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
15	2500	25/09/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2522	27/10/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2630	19/04/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
16	2175	24/04/14	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2176	25/04/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
	2179	30/04/14	LBA	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2180	30/04/14	LBA	S	1	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2368	17/03/15	LBA	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2382	24/04/15	Biospsia	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2477	21/08/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KY565368
	2535	09/11/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
17	2122	20/01/14	LBA	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2145	12/02/14	Biopsia bola fungica	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU935623
18	2492	16/09/15	Urina	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2512	14/09/15	Urina	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2514	17/09/15	Urina	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
19	2184	13/05/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
	2197	27/05/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2248	14/08/14	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2261	09/09/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2269	30/09/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2303	09/12/14	Escarro	S	*	S	1	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2309	19/12/14	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2317	13/01/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
2323	04/07/15	Escarro	S	1	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	HQ285501	

CIM: Concentração inibitória mínima; LBA: lavado brônquico alveolar; *: não realizado.

CONTINUAÇÃO - ANEXO 1: Dados da Triagem de Resistência, da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a Itraconazol (ITC), Voriconazol (VRC) e Posaconazol (PSC) dos 202 isolados de *Aspergillus* e do Sequenciamento de DNA.

Paciente	Dados dos Isolados			Itraconazol		Voriconazol		Posaconzol		Sequenciamento		
	LIF	Data	Material Clínico	ITC 2µg/mL	CIM µg/mL	VRC 2µg/mL	CIM µg/mL	PSC 0,5 µg/mL	CIM µg/mL	Espécie	Homologia	Acesso
20	2174	15/04/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2211	24/06/14	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2276	21/10/14	Escarro	S	*	S	*	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2558	24/11/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2677	21/06/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
21	2575	01/02/16	LBA	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2603	04/04/16	LBA	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
22	2229	15/07/14	LBA	S	1	S	*	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2250	19/08/14	LBA	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
23	2402	26/05/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2590	15/03/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
24	2193	20/05/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2371	24/03/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2434	14/07/16	Escarro	S	1	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2702	19/07/16	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
25	2148	25/02/14	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2316	13/01/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2427	07/07/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2443	22/07/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2505	16/10/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
26	2129	10/01/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2167	08/04/14	Escarro	S	*	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU935623
27	2397	25/05/15	Secreção Traqueal	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
	2417	10/06/15	LBA	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU935623
28	2647	07/06/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2835	16/02/17	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
29	2545	17/11/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2509	20/10/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
30	2508	20/10/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2543	17/11/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2678	28/06/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
31	2234	15/07/14	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2251	19/08/14	Escarro	R	1	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2378	07/04/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	AY048754
	2602	30/03/16	Escarro	S	1	S	2	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2638	17/05/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KF669421
	2646	07/06/16	Escarro	S	1	S	2	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
32	2719	02/08/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2551	02/12/15	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2552	02/12/16	Escarro	S	1	R	32	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2553	02/12/16	Escarro	S	1	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2739	12/08/156	Escarro	S	2	S	1	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
33	2758	27/09/16	Escarro	S	2	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2153	18/03/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2195	23/05/14	Escarro	R	1	S	*	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2328	28/01/15	Escarro	R	8	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KP724982

CIM: Concentração inibitória mínima; LBA: lavado brônquico alveolar; *: não realizado.

CONTINUAÇÃO - ANEXO 1: Dados da Triagem de Resistência, da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a Itraconazol (ITC), Voriconazol (VRC) e Posaconazol(PSC) dos 202 isolados de *Aspergillus* e do Sequenciamento de DNA.

Paciente	Dados dos Isolados			Itraconazol		Voriconazol		Posaconzol		Sequenciamento		
	LIF	Data	Material Clínico	ITC 2µg/mL	CIM µg/mL	VRC 2µg/mL	CIM µg/mL	PSC 0,5 µg/mL	CIM µg/mL	Espécie	Homologia	Acesso
34	2132	28/01/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2370	24/03/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2404	26/05/15	Escarro	S	*	S	1	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2526	16/11/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2675	05/07/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2772	18/10/16	Escarro	S	2	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
35	2830	20/12/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2263	23/09/14	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
36	2459	28/07/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2281	04/11/14	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2333	03/02/15	Escarro	S	2	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737560
	2617	19/01/16	Escarro	S	*	S	*	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
37	2732	05/08/16	Sw ab de narina	S	1	S	0,5	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2177	29/04/14	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2321	20/01/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU935623
38	2392	19/05/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2664	24/05/16	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
39	2369	20/03/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
	2386	07/05/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
39	2199	27/05/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
	2516	13/10/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KF669422
	2561	04/12/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	100.00%	KM095495
	2562	16/12/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
	2615	14/01/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KM491898
	2659	14/07/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2676	17/06/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
40	2705	14/07/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2338	06/02/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
	2339	06/02/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU935623
41	2340	06/02/15	Escarro	S	*	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2162	01/04/14	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2204	03/06/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2231	15/07/14	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2344	10/02/15	Escarro	S	1	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2413	09/06/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
42	2503	13/10/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2597	29/03/16	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2157	25/03/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2242	29/07/14	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
43	2544	17/11/15	Escarro	S	0,5	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737561
	2717	26/07/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2298	31/10/14	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501423
	2353	24/02/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KY565368
	2372	26/03/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175506
44	2418	16/06/15	Escarro	S	1	S	0,5	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU935623
	2576	02/02/16	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	LC176432
	2718	02/08/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2213	21/01/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424
	2243	29/07/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	0,125	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2252	21/08/14	Escarro	S	0,5	S	*	S	*	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
	2388	12/05/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KU737560
	2429	07/07/15	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505
2668	31/05/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	JX501424	
2733	05/08/16	Escarro	S	0,5	S	1	S	0,25	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KJ175505	
2805	11/10/17	Escarro	S	1	S	1	S	0,5	<i>A. fumigatus</i>	100.00%	KY565368	

CIM: Concentração inibitória mínima; *: não realizado.

ANEXO 2: Parecer do Comitê de Ética da UNICAMP (CAAE: 51794615.0.0000.5404).**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Vigilância de resistência frente a antifúngicos azólicos de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus*

Pesquisador: Laís Pontes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51794615.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.105.491

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

CONTINUAÇÃO - ANEXO 3: Parecer do comitê de ética da UNICAMP (CAAE: 51794615.0.0000.5404).

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data

deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_896900E1.pdf	09/04/2017 14:02:59		Aceito
Outros	Ficha_Pesquisa_Dados.pdf	09/04/2017 14:01:59	Lais Pontes	Aceito
Outros	Justificativa_de_Emenda.pdf	09/04/2017 14:01:42	Lais Pontes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Lais.pdf	09/04/2017 14:00:09	Lais Pontes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/12/2015 15:37:39	Lais Pontes	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	10/12/2015 15:35:41	Lais Pontes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 07 de Junho de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br