UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FRANQUELINE REICHERT LIMA

AVALIAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Aspergillus* spp.: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E BUSCA POR MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS

CAMPINAS
2018

FRANQUELINE REICHERT LIMA

AVALIAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Aspergillus* spp.: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE E BUSCA POR MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA FRANQUELINE REICHERT LIMA,
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 870369/1997-0; CAPES, 88881.134235/2016-01

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

R271a

Reichert Lima, Franqueline, 1985-
Avaliação de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus* spp. : caracterização morfológica e molecular de espécies, perfil de suscetibilidade e busca por mutações relacionadas à resistência aos antifúngicos azólicos / Franqueline Reichert Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

1. Fungos. 2. Infecções oportunistas. 3. Aspergillus. 4. Aspergilose. I. Schreiber, Angélica Zaninelli, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of clinical and environmental of *Aspergillus* spp. isolates : morphological and molecular identification; susceptibility profile and search for azoles resistance related mutations
Palavras-chave em inglês:
Fungi
Opportunistic infections
Aspergillus
Aspergillosis
Área de concentração: Ciências Biomédicas
Titulação: Doutora em Ciências Médicas
Banca examinadora:
Angélica Zaninelli Schreiber [Orientador]
Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho
Erich Vinícius de Paula
Luciana Trilles
Kelly Ishida
Data de defesa: 03-08-2018
Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FRANQUELINE REICHERT LIMA

ORIENTADORA: PROF[a] DR[a]ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

MEMBROS:

1. PROF[a] DR[a] ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

2. PROF DR PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

3. PROF DR ERICH VINÍCIUS DE PAULA

4. PROF[a] DR[a] LUCIANA TRILLES

5. PROF[a] DR[a] KELLY ISHIDA

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: 03 de agosto de 2018

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese de Doutorado às minhas sobrinhas e afilhadas Laura Milani Reichert e Julia Wiroski Reichert.

Minhas queridas,

Vocês devem lutar por si mesmas sempre. Por isso, saibam o quão especial cada uma de vocês é e tenham certeza do seu poder interior, pois assim vocês poderão alcançar todos os seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Angélica Angélica Zaninelli Schreiber, que além da amizade, dos ensinamentos e ótima orientação, foi a pessoa que acreditou e confiou na minha capacidade e me deu a oportunidade de seguir a carreira acadêmica.

À Profª. Drª. Maria Luiza Moretti pelo apoio, pelos ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar em conjunto em um ótimo grupo de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Investigação em Fungos, em especial à Luiza Lyra, pela amizade, paciência e disposição ao compartilhar seu conhecimento. E ao Edson Luz por todo apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas, Cibeli A. Tararam, Érivan O. Ribeiro, Lais L. Sturaro, Laís Pontes, Larissa Levy, Pâmela Stivanelli e Sarah C. Martins pela amizade, agradável convivência e compartilhamento de experiências e aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com o fornecimento de bolsa de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o período do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

A todos meus amigos, do laboratório e de fora dele, pelo apoio e amizade.

A todos os meus familiares, em especial meus pais Celso e Inês Reichert, que sempre me guiaram e mostraram a importância dos estudos no meu crescimento pessoal.

A meu marido Thiago Lima pelo apoio, amor, paciência e companheirismo.

O meu mais profundo e sincero agradecimento! Muito obrigada!

“Uma criança, um professor, um livro e um lápis podem mudar o mundo.”
Malala Yousafzai

RESUMO

Espécies de *Aspergillus* são patógenos fúngicos oportunistas responsáveis por altas taxas de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos, que se infectam após inalação dos conídios presentes no ar. O derivado azólico voriconazol (VRZ) é a primeira linha na terapia e o surgimento de isolados de *Aspergillus fumigatus* resistentes a este e outros azólicos está sendo investigado em diversos países. Isolados resistentes apresentam mutações no gene *cyp*51A que codifica a 14α-demetilase, enzima alvo para estes compostos. No Hospital de Clínicas da Unicamp muitos pacientes de alto risco estão suscetíveis a agentes infecciosos oportunistas como os do gênero *Aspergillus.* Estudos recentes demonstraram que os pacientes podem estar colonizados ou infectados com mais de um genótipo de *A. fumigatus* e ainda que esses podem apresentar diferentes perfis frente aos antifúngicos. Análise de microssatélites (STRAF) é útil para estudar a epidemiologia molecular de *A. fumigatus* devido ao seu alto poder discriminatório. Desta forma, o acompanhamento do possível surgimento de isolados resistentes e a análise dos isolados sequenciais de um mesmo paciente quanto a sua genotipagem se tornam importantes. Neste contexto, o presente trabalho buscou estudar a ocorrência e o perfil de suscetibilidade de *Aspergillus* spp. ambientais e clínicos frente aos antifúngicos, além de analisar a presença de mutações no gene *cyp*51A dos isolados de *A. fumigatus* resistentes aos azólicos seguida da genotipagem de *A. fumigaus* clínicos e ambientais. Duzentos e vinte e nove isolados clínicos e 123 isolados ambientais foram estudados. Para a identificação de espécies foi realizado sequenciamento de DNA das regiões ITS e β-tubulina. O perfil de suscetibilidade aos antifúngicos foi avaliado de acordo com o documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) para determinação da concentração efetiva mínima (CEM) para as equinocandinas e concentração inibitória mínima (CIM) para os demais. Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B (AMB) itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ), posaconazol (PSZ), micafungina (MCF) e caspofungina (CPF). Isolados clínicos resistentes aos azólicos e todos os isolados ambientais de *A. fumigatus* foram submetidos ao sequenciamento do gene *cyp*51A. A tipagem de *A. fumigatus* por microssatélites foi realizada por sequenciamento dos pares de oligonucleotídeos iniciadores: 2AB, 3AB, 4AB, BDA, BDB, BDC e BDD e analisada com auxílio do programa e-Burst v.3. Dez isolados de *A. fumigatus* apresentaram valores elevados de CIM para pelo menos um azólico, mas mutações no gene *cyp*51A relacionadas com resistência não foram observadas. A observação mais preocupante foi que valores de CIM de AMB foram elevados ($\geq$2 mg L^{-1}) em 87% dos pacientes com isolados de *Aspergillus flavus* e 43% com isolados de *A. fumigatus*. Não foi observada resistência às equinocandinas. Quanto a genotipagem, os isolados de *A. fumigatus* apresentaram elevada diversidade. Seis isolados de 3 pacientes foram englobados como parte de um complexo clonal. Estes 6 isolados possuem as já conhecidas mutações de ponto F46Y, M127V, N248T, D225E e E427K no gene *cyp*51A. Fazer parte desse complexo clonal significa que os isolados têm a mesma origem clonal, mas com 1 a 3 ST de diferença. Os resultados confirmam estudos anteriores que mostraram o alto polimorfismo das populações de *A. fumigatus*. A heterogeneidade dos genótipos confirma que um paciente pode estar contaminado ou infectado com diferentes isolados e diferentes pacientes podem ser infectados com genótipos diferentes ou, por outro lado, com genótipos muito próximos. Neste caso, sugere-se a possibilidade de infecção durante internação hospitalar. Dado que a AMB é usada para tratar infecções

resistentes aos azólicos, os dados obtidos neste trabalho quanto a este antifúngico destacam a necessidade de vigilância contínua para toda a resistência antifúngica de *Aspergillus* spp. a fim de permitir a implementação de estratégias de tratamento corretas para o manejo desses patógenos. Nenhuma mutação no gene *cyp*51A que já tenha sido relacionada com resistência foi observada, nem mesmo em isolados resistentes aos azólicos, indicando que outros mecanismos podem estar envolvidos. Estudos adicionais serão necessários para um maior entendimento da epidemiologia e a heterogeneidade desses patógenos, além dos mecanismos envolvidos na resistência não apenas aos antifúngicos azólicos mas também frente a AMB e às equinocandinas.

Palavras chave: Fungos; Infecções Oportunistas; Aspergillus; Aspergilose;

ABSTRACT

Aspergillus spp. are opportunistic fungal pathogens responsible for high mortality rates, especially in immunocompromised patients, who become infected after inhalation of conidia present in the air. The azole voriconazole (VRZ) is the first line in therapy and the emergence of resistant *Aspergillus fumigatus* isolates to this and other azole has being investigated in several countries. Resistant isolates have mutations in the *cyp*51A gene, which encodes 14α-demethylase, the target enzyme for these compounds. In the *Hospital de Clínicas* of Campinas University (HC-Unicamp) many high-risk patients are susceptible to opportunistic infectious agents like those of the genus *Aspergillus*. Recent studies have shown that patients may be colonized or infected with more than one *A. fumigatus* genotype and that they may present different susceptibility profiles. Microsatellite analysis (STRAF) is useful for studying the molecular epidemiology of *A. fumigatus* due to its high discriminatory power. In this way, monitoring the possible emergence of resistant isolates and analyzing the sequential isolates from the same patient regarding their genotyping become important. In this context, the present work aimed to study the occurrence and the antifungal susceptibility profile of environmental and clinical *Aspergillus* spp., as well as to analyze the presence of *cyp*51A gene mutations in A. fumigatus azoles resistant isolates, followed by genotyping clinical and environmental *A. fumigatus*. Two hundred twenty-nine clinical isolates and 123 environmental isolates were studied. For the identification of species, DNA sequencing of the ITS and β-tubulin regions was performed. The antifungal susceptibility profile was evaluated according to the M38-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) to determine the minimum effective concentration (MEC) for the echinocandins and minimum inhibitory concentration (MIC) for the others. The antifungal agents evaluated were amphotericin B (AMB) itraconazole (ITZ), voriconazole (VRZ), posaconazole (PSZ), micafungin (MCF) and caspofungin (CPF). Clinical azoles resistant *A. fumigatus* and environmental *A. fumigatus* were submitted to the *cyp*51A gene sequencing. *A. fumigatus* isolates were submitted to microsatelites typing (STR*Af*s 2AB, 3AB, 4AB, BDA, BDB, BDC and BDD) to assess if the serially isolates were genetically related and then they were analyzed with e-Burst v.3. Ten isolates of *A. fumigatus* showed high MIC values for at least one azole, but mutations in the *cyp*51A gene related resistance were not observed. The most disturbing observation was that the MIC values of AMB were high ($\geq$2 mg L^{-1}) in 87% of the patients with *Aspergillus flavus* isolates and 43% with *A. fumigatus* isolates. No resistance to echinocandins was observed. Regarding to genotyping, *A. fumigatus* showed high diversity. Six isolates of three patients were part of a clonal complex. These 6 isolates have the already known point mutations F46Y, M127V, N248T, D225E and E427K in the *cyp*51A gene. Being part of this clonal complex means that the isolates have the same clonal origin, but with 1 to 3 STs of difference. Our results confirm previous studies showing the high polymorphism of *A. fumigatus* populations. The heterogeneity of the genotypes confirms that a patient may be colonized or infected with different isolates and different patients may be infected with different or, on the other hand, infected with very close genotypes. These finds suggests the possibility of infection during hospitalization. Since AMB is used to treat azole-resistant infections, the data obtained in the present study highlight the need for continuous resistance surveillance in *Aspergillus* spp. for all important antifungal to implement correct treatment strategies for the management of these pathogens. We did

not observe any already related resistance mutation in *cyp*51A gene, not even in those azole-resistant isolates, suggesting that other mechanisms may be involved. Further studies will be necessary to better understand the epidemiology and heterogeneity of these pathogens, as well as the resistance mechanisms involved not only to azole antifungals but to AMB and echinocandins.

Keywords: Fungi; Opportunistic Infections; Aspergillus; Aspergillosis;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Aspergillum* (do latim: *aspergere*, "para dispersar"), um dispositivo usado para borrifar água benta durante um serviço litúrgico. Fotografia de Davide Borgonovo. Etymologia: *Aspergillus*. Emerging Infectious Diseases. 2006;12(3):415.....25

Figura 2: Macro e micromorfologia de *Aspergillus* spp: *A. fumigatus* (a-b), *A. flavus* (c-d), *A. niger* (e-f) e *A. terreus* (g-h).....28

Figura 3: Placa de microtitulação sobre suporte com espelho reverso para leitura dos testes de suscetibilidade *in vitro*.....66

Figura 4: Leitura visual da concentração efetiva mínima (CEM). Na imagem, a leitura dos valores de CEM das sete amostras avaliadas frente ao antifúngico caspofungina (linhas A-G) foi realizada na coluna 6 (0,5 mgL^{-1}). CP: controle positivo, CN: controle negativo.....68

Figura 5: Relação genética de 109 isolados sequenciais de *Aspergillus fumigatus* obtidos de 36 pacientes.....84

Figura 6: Complexo clonal envolvendo seis isolados de *Aspergillus fumigatus,* coletados de três pacientes (P11=paciente 18, P2=paciente 76 e P4= paciente 83) hospitalizados de 2001 a 2006, obtido por análises realizadas no e-Burst.....85

Figura 7: Relação genética entre 62 isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus* obtidos de coletas de ar.....87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem de unidades formadoras de colônias de fungos obtidas em cada coleta de ar nas unidades de Transplante de Medula Óssea e Hematologia.....77

Tabela 2: Intervalos de CIM e CEM obtidos contra *Aspergillus* spp. clínicos e cepas padrão frente a 5 antifúngicos.....79

Tabela 3: Distribuição do número de *Aspergillus* spp. em cada concentração inibitória mínima (CIM) em mgL^{-1} dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol.....80

Tabela 4: Resultados do teste de triagem e a CIM dos três isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus* que cresceram no meio contendo o antifúngico ITZ.....81

Tabela 5: Substituições de aminoácidos obtidas com o sequenciamento do gene *cyp*51A de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* com elevados valores de CIM frente aos antifúngicos azólicos e os respectivos isolados dos mesmos pacientes.....82

Tabela 6: Trocas de aminoácidos encontradas no sequenciamento do gene *cyp*51A dos *Aspergillus fumigatus* ambientais.....83

Tabela 7: Resultados de CIM e do sequenciamento do gene *cyp*51A obtidos dos pacientes cujos *Aspergillus fumigatus* fazem parte de um complexo clonal (em vermelho) 86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequências de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de DNA para identificação molecular de *Aspergillus* spp.....60

Quadro 2: Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação de DNA das regiões ITS4/5 e *β*-tubulina 2A/2B.....62

Quadro 3: Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus*.....71

Quadro 4: Sequência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de sequenciamento do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus*.....71

Quadro 5: Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus*.....72

Quadro 6: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de microssatelites de *Aspergillus fumigatus*.....73

Quadro 7: Reagentes para a reação de PCR para a técnica de microssatélites de *Aspergillus fumigatus*.....73

Quadro 8: Parâmetros da reação de PCR para a técnica de microssatélites de *Aspergillus fumigatus*.....74

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA: Aspergilose broncopulmonar alérgica

ABZ: Albaconazol

AI: Aspergilose invasiva

AMB: Anfotericina B

APC: Aspergilose pulmonar crônica

API: Aspergilose pulmonar invasiva

ASD: Ágar Sabouraud dextrose

ATCC: *American Type Culture collection*

BAL: Lavado brônquico

BDG: β-(1→3) - D-glucana

CPF: Caspofungina

CIM: Concentração inibitória mínima

CIM_{50}: Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados estudados

CIM_{90}: Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados estudados

CEM: Concentração efetiva mínima

CEM_{50}: Concentração efetiva mínima capaz de inibir 50% dos isolados estudados

CEM_{90}: Concentração efetiva mínima capaz de inibir 90% dos isolados estudados

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Datasus: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenoaminotetracético

FC: Fíbrose cística

FCZ: Fluconazol

FCM-Unicamp: Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas

GM: Galactomanana

HEPA: *High Efficiency Particulate Arrestance*

HC-Unicamp: Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IC: Inibição de crescimento

IDSA: *Infectious Diseases Society of America*

IFI: Infecção Fúngica Invasiva

IGS: *Intergenic Spacer*

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

ITZ: Itraconazol

KTZ: Cetoconazol

LCR: Líquido cefalorraquidiano

Lemdi: Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos

Maldi-Tof MS: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*

MCF: Micafungina

MOPS: Ácido morfolinopropanosulfônico

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCE: Ponto de corte epidemiológico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PSZ: Posaconazol

rpm: Rotações por Minuto

RVC: Ravuconazol

TMO: Transplante de medula óssea

TR: *Tandem Repeat*

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

VRZ: Voriconazol

SUMÁRIO

1. Introdução 20
1.1 Fungos 20
1.2. Infecções fúngicas 21
1.3. O gênero *Aspergillus* 24
1.3.1. Histórico 24
1.3.2. Características do gênero *Aspergillus* 26
1.3.3. Espécies 27
1.3.4. Ecologia 28
1.4. A aspergilose 30
1.4.1. Formas de aspergilose 31
1.4.2. Epidemiologia 36
1.4.3. Diagnóstico clínico 37
1.4.4. Diagnóstico laboratorial 38
1.5. Tratamento da aspergilose 44
1.6. Mecanismo de ação dos antifúngicos utilizados no tratamento da aspergilose 45
1.7. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos 46
1.8. Resistência aos agentes antifúngicos 48
1.9. Justificativa 53
2. Objetivos 55
2.1. Objetivo geral 55
2.2. Objetivos específicos 55
3. Material e Métodos 57
3.1. Local de trabalho 57
3.2. Isolados clínicos 57
3.2.1. Seleção dos micro-organismos para estudo 57
3.2.2. Reativação dos isolados clínicos 58
3.2.3. Identificação 58
3.3. Isolados ambientais 58
3.3.1. Coleta de ar 58
3.3.2. Locais de coleta 59
3.3.3. Identificação dos isolados ambientais 59

3.3.4. Análise estatística 59
3.4. Isolados provenientes de amostras de mucosa nasal 60
3.4.1. Identificação dos isolados ambientais 60
3.5. Sequenciamento de DNA 60
3.5.1. Extração de DNA 60
3.5.2. Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 61
3.5.3. Purificação dos produtos de PCR 62
3.5.4. Reação de sequenciamento 62
3.5.5. Precipitação e lavagem do DNA com etanol 63
3.6. Testes de suscetibilidade *in vitro* - microdiluição em caldo 63
3.6.1. Meio de cultura 64
3.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração efetiva mínima 64
3.6.3. Controle de qualidade 68
3.6.4. Ponto de corte epidemiológico 68
3.6.5. Triagem de resistência 69
3.7. Sequenciamento de DNA do gene *cyp*51A 70
3.7.1. Protocolo de reação em cadeia da polimerase 70
3.7.2. Purificação dos produtos de PCR 71
3.7.3. Reação de Sequenciamento 71
3.7.4. Precipitação e lavagem com etanol 72
3.8. Protocolo para Microssatelites de *Aspergillus fumigatus* 72
3.8.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) 72
3.9. Análise de prontuários 74
4. Resultados 76
4.1. Isolados clínicos 76
4.2. Isolados ambientais 76
4.2.1. Coletas de ar 76
4.2.2. Coletas de *swab* nasal 77
4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração efetiva mínima (CEM) 78
4.4. Triagem de resistência 80
4.5. Sequenciamento do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus* 81
4.6. Análise de microssatélites de *Aspergillus fumigatus* 83
5. Discussão 89

6. Conclusões 103
7. Referências 105
8. Apêndices 119
9. Anexos 142

1. Introdução

1.1 Fungos

O Reino Fungi compreende espécies que habitam praticamente todos os ecossistemas. Os fungos existem como organismos unicelulares e multicelulares com diversas morfologias. No reino Fungi existem os fungos filamentosos (bolores), leveduras, fungos dimórficos, líquens e diversas formas de cogumelos. Nesse reino existem espécies de vida livre ou espécies que vivem em simbiose com outros organismos, como por exemplo, os líquens – uma relação harmônica interespécie de fungos e algas. Além disso, algumas espécies são parasitas, mantendo relações desfavoráveis com o hospedeiro, ou seja, causando doenças a plantas e animais. A maioria das espécies é saprofítica, alimentando-se de nutrientes em decomposição (1).

Os fungos estão entre os mais importantes organismos do planeta em uma enorme variedade de maneiras. Fungos estão em todos os lugares e estão em grande número - no solo e no ar, em lagos, rios e mares, dentro de plantas e animais, em alimentos e roupas e no corpo humano. Na natureza, juntamente com bactérias, os fungos são responsáveis por degradar a matéria orgânica e liberar carbono, oxigênio, nitrogênio e fósforo no solo e na atmosfera (1). Espécies específicas de fungos são essenciais para muitos processos domésticos e industriais como, por exemplo, na fabricação de pão, vinho, cerveja e certos queijos. Outras espécies de fungos também são utilizadas como alimento, como alguns cogumelos, moras e trufas (1). A relevância da utilização dos fungos na medicina foi descoberta em 1928, quando o bacteriologista escocês Alexander Fleming observou o fungo *Penicillium notatum*, que crescia em uma placa de cultura da bactéria *Staphylococcus*. Fleming constatou que em torno do fungo, havia um halo claro em que nenhuma unidade formadora de colônia de bactéria crescia. Fleming isolou com sucesso

a substância desse fungo que inibia o crescimento de bactérias. Em 1929, Fleming publicou um trabalho científico anunciando a descoberta da penicilina, a primeira de uma série de antibióticos - muitos deles derivados de fungos - que revolucionaram a prática médica (2, 3).

Além da penicilina, diversos medicamentos como antibióticos, antitumorais e até mesmo agentes antifúngicos têm sido produzidos a partir de metabólitos obtidos de algumas espécies fúngicas. A lovastatina, produzida por espécies de *Penicillium*, pela espécie *Aspergillus terreus*, além de outras espécies de fungos, tem sido utilizada como medicamento para auxiliar na diminuição das taxas de colesterol (4). O antifúngico, cilofungina, substância semissintética derivada da modificação química de echinocandina B, produzida por espécies de *Emericella nidulans/E. rugulosa* (5), é um outro exemplo de metabólito fúngico utilizado em estudos na indústria farmacêutica.

Não se sabe ao certo quantas espécies de fungos existem na natureza e, embora aproximadamente 100.000 tenham sido descritas, cerca de 1.500.000 diferentes espécies podem existir (1).

1.2. Infecções fúngicas

Fungos podem infectar seres humanos e causar várias doenças, desde infecções superficiais da pele e mucosas até infecções invasivas. Enquanto infecções superficiais são comuns e geralmente mais fáceis de tratar, as infecções invasivas têm uma taxa de incidência menor, porém são condições muito mais agressivas e frequentemente fatais (6, 7).

Infecções fúngicas invasivas (IFI) podem afetar hospedeiros hígidos e hospedeiros com algum comprometimento no sistema imunológico. Estes últimos sendo frequentemente afetados por infecções causadas por agentes oportunistas. IFI são

infecções de difícil manejo, exigem altas doses de antifúngicos e tratamentos de longa duração, podendo promover resistência de alguns fungos a diferentes compostos. Os agentes etiológicos envolvidos nessas infecções englobam leveduras, fungos filamentosos e fungos dimórficos (8).

O número de IFI tem aumentado, como resultado do aumento da quantidade de indivíduos suscetíveis (6, 8, 9). Quantificar a taxa global das doenças fúngicas é um grande desafio. Essas infecções são muitas vezes de difícil diagnóstico por se manifestarem com sintomas inespecíficos e nem sempre serem a primeira suspeita clínica (7).

Estudos globais recentes reportam que ocorram anualmente cerca de 3.000.000 de casos de aspergilose pulmonar crônica, 700.000 casos de candidíase invasiva, 500.000 casos de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, 250.000 casos de aspergilose invasiva, 100.000 casos de histoplasmose disseminada, mais de 10.000.000 de casos de asma fúngica 1.000.000 de casos de queratite fúngica (7, 10). São estimados ainda um 1.000.000 de casos de criptococose associados ao HIV em todo o mundo anualmente, com cerca de 600.000 mortes (11).

Embora as infecções fúngicas contribuam substancialmente para a morbidade e mortalidade humana, com uma taxa de mortalidade de, aproximadamente, um milhão e meio de pessoas por ano (6, 10), o impacto dessas doenças na saúde humana não é completamente conhecido (9).

Doenças tropicais negligenciadas são uma série diversificada de doenças endêmicas que prevalecem em climas subtropicais e tropicais em todo o mundo. São doenças infecciosas que geralmente afetam indivíduos de baixa renda em países da Ásia, África e América Latina. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma alta prevalência dessas infecções está associada a pobreza. Essas infecções são

observadas, muitas vezes, em pessoas que vivem em áreas rurais remotas, favelas urbanas ou zonas de conflito, entre outras condições desvantajosas. Embora algum progresso tenha sido observado para algumas dessas infecções, muitas dessas doenças não estão no radar das políticas de saúde pública, em contraste com outras doenças. A OMS e outras organizações internacionais como o projeto G-FINDER reconhecem vários helmintos, protozoários, bactérias e vírus como sendo infecções negligenciadas, mas a maioria das infecções por fungos ainda não atingiu esse *status* (12).

No entanto, em 2016, o micetoma foi incluído como a única doença fúngica na lista da OMS (13) e mais tarde, em 2017, a cromoblastomicose foi adicionada (14). A taxa e o impacto médico das doenças fúngicas são amplamente desconhecidos e, muitas vezes, subestimados, especialmente para as micoses endêmicas (12). Fazer parte da lista de doenças negligenciadas da OMS é importante para garantir uma maior visibilidade dessas infecções, para que assim mais políticas públicas sejam realizadas para o combate das infecções fúngicas, bem como para a profilaxia das mesmas. O diagnóstico precoce com testes simples e rápidos não está disponível para a maior parte dos pacientes (12).

A aspergilose, causada por espécies de *Aspergillus* – micro-organismos alvo do presente trabalho, afeta, principalmente, indivíduos com algum dano no sistema imunológico. Ou seja, não se trata de uma infecção que acomete mais indivíduos de baixa renda. Mesmo assim, cabe considerar que, quanto maior o número de doenças fúngicas constarem na lista da OMS, maior a visibilidade e conscientização para as demais infecções fúngicas, pois políticas de prevenção, diagnóstico rápido e terapia são urgentemente necessários. Além disso, mais estudos de vigilância e epidemiologia são necessários para o conhecimento dessas infecções.

No Brasil, como em outras partes do mundo, é difícil avaliar a real situação da incidência de cada micose sistêmica, pois a notificação dessas infecções não é obrigatória no sistema de saúde brasileiro. Assim, IFI são subnotificadas em todo o país (15, 16).

1.3. O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é, indiscutivelmente, o gênero de fungos mais bem estudado por causa de seu significado médico, ecológico e econômico. Nesse gênero, já foram identificadas mais de 300 espécies (17). Espécies de *Aspergillus* são utilizadas em diversos processos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e na produção de enzimas e ácidos orgânicos como amilase e o ácido cítrico.

O sucesso de adaptação das espécies desse gênero pode ser explicado pelo fato de esses micro-organismos não serem seletivos no que diz respeito às suas condições de crescimento, pois podem degradar uma ampla variedade de moléculas orgânicas e crescem em ampla faixa de temperatura. Além disso, espécies de *Aspergillus* produzem um elevado número de conídios – estruturas de reprodução assexuada, que são dispersos no ar e podem percorrer longas distâncias (18).

1.3.1. Histórico

O gênero *Aspergillus* foi um dos primeiros gêneros de fungos a ser nomeado. A primeira descrição de *Aspergillus* spp. foi feita pelo Padre italiano Pier Antonio Micheli, em 1729. Ao ver as estruturas do micro-organismo ao microscópio, o clérigo julgou as mesmas como sendo semelhantes a uma ferramenta utilizada para aspergir água benta (borrifador), o aspersório (do latim, aspergillum, Figura 1) (19) . Em 1768, o médico e naturalista suíço Albrecht Von Haller valida o gênero e, em 1832, o micologista e botânico suéco Elias Magnus Fries sanciona o nome genérico *Aspergillus* (17).

Figura 1: *Aspergillum* (do latim: *aspergere*, "para dispersar"), um dispositivo usado para borrifar água benta durante um serviço litúrgico. Fotografia de Davide Borgonovo. Etymologia: *Aspergillus*. Emerging Infectious Diseases. 2006;12(3):415.

Em 1926, Thom e Church reuniram todas as informações disponíveis sobre as características do gênero *Aspergillus* em uma monografia (20). Em 1965, Raper e Fennell expandiram esse trabalho adicionando muitas novas espécies e fornecendo descrições das espécies classificadas em 18 grupos informais (21). Em 1985, Gams e colaboradores revisaram os grupos e os atribuíram a 18 seções como um estatuto taxonômico formal (Gams et al., 1985) (22). Atualmente, existem aproximadamente 300 espécies descritas (17).

A aspergilose pulmonar crônica (APC) foi reconhecida pela primeira vez como uma condição fatal em 1842 no Reino Unido. A primeira descrição radiológica de aspergiloma foi realizada na França, em 1938. O primeiro paciente tratado com anfotericina B recebeu o medicamento em 1957 em um caso de APC pós tuberculose. Em meados do século 20, ocorreram muitos relatos clínicos de aspergiloma. A aspergilose foi primeiramente "classificada" em 1959, com o termo "micetoma", termo que agora se refere a uma infecção fúngica subcutânea causada por uma variedade de micro-organismos (23).

Hinson et al. (24), no Reino Unido, relataram os primeiros casos de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) em três pacientes adultos, em 1952. O primeiro paciente pediátrico também foi relatado no Reino Unido em 1959 – um menino de 15 anos (25).

A aspergilose pulmonar invasiva (API) acomete, principalmente, indivíduos altamente imunocomprometidos. Nas últimas décadas, o avanço da medicina vem contribuindo para o aumento dos casos de API. As múltiplas opções terapêuticas para pacientes portadores de doenças malignas - como os vários regimes de quimioterapia e o crescente número de transplantes de órgãos sólidos ou transplantes de células hematopoiéticas - assim como o aumento da sobrevida dos pacientes com doenças genéticas e doenças autoimunes, têm contribuído para o aumento do número de hospedeiros suscetíveis a infecções oportunistas, como a aspergilose invasiva (26).

1.3.2. Características do gênero *Aspergillus*

As espécies de *Aspergillus,* taxonomicamente, estão incluídas no Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Eurotiomycetes; Ordem: Eurotiales; Família: Trichocomaceae; Género: *Aspergillus* (27).

Aspergillus spp. são fungos filamentosos hialinos de hifas septadas e ramificadas dicotomicamente (ângulo de 45º). Os conidióforos (corpos de frutificação, que podem ter parede lisa ou rugosa) partem de uma célula base em haste simples, com formação vesicular na extremidade, de onde emergem métula e fialide. As fiálides, que possuem forma de balão ou cilíndricas, podem ser uni ou multisseriadas, partem da superfície da métula presente na vesícula, no ápice do conidióforo. Os conídios, que emergem das fiálides, variam de globosos, oblongos à forma elíptica e podem ter parede lisa ou rugosa (27, 28).

Macroscopicamente, as colônias se apresentam inicialmente de cor branca, posteriormente passando a verde, amarela, castanha ou negra, dependendo da espécie (Figura 2). Possuem inicialmente uma textura algodonosa ou aveludada tornando-se pulverulenta com a produção de conídios. Dentre as principais espécies, *Aspergillus fumigatus* e espécies muito próximas se apresentam geralmente de cor azul esverdeado. Já as espécies do complexo *Aspergillus flavus* apresentam coloração variando do amarelo ao verde claro. *Aspergillus niger*, e suas espécies próximas possuem colônias negras, variando em intensidade. As espécies do complexo *Aspergillus terreus* variam de bege a marrom claro (28).

1.3.3. Espécies

O gênero *Aspergillus* inclui patógenos de distribuição cosmopolitas e são responsáveis por uma das mais altas taxas de mortalidade entre os pacientes com infecções fúngicas. Das muitas espécies de *Aspergillus* que já foram descritas (17), cerca de 30 espécies foram associadas a infecções em seres humanos. O gênero *Aspergillus* está dividido em oito subgêneros que, por sua vez, são subdivididos em várias seções que incluem uma grande variedade de espécies estreitamente relacionadas, formando os complexos (17).

A principal espécie causadora de aspergilose é *A. fumigatus* (29), seguida de *A. flavus* (30)*, A. niger e A. terreus* (31-33) (Figura 2)*.* Em países como a Índia, Arábia Saudita, Sudão e Taiwan, com condições meteorológicas semiáridas, áridas e tropicais, *A. flavus* é o principal agente etiológico da aspergilose, incluindo aspergilose invasiva (30, 34-36). Essa espécie também é conhecida por causar contaminação ambiental por aflatoxinas em culturas como milho, algodão, amêndoa, pistache e amendoim. Essa contaminação causa danos econômicos substanciais em todo o mundo, pois o consumo

de alimentos contaminados com aflatoxina pode causar cirrose, câncer de fígado, insuficiência cardíaca, imunidade reduzida, redução de peso e / ou morte rápida (37-40).

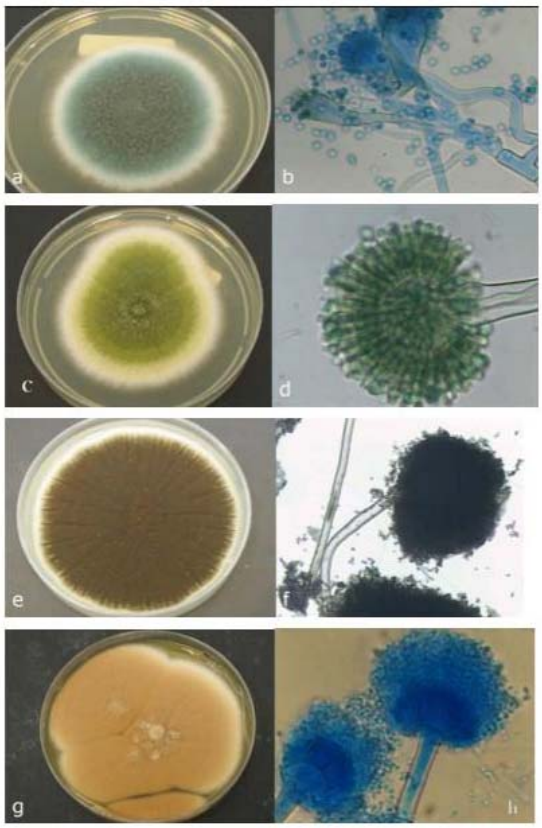


Figura 2: Macro e micromorfologia de *Aspergillus* spp: *A. fumigatus* (a-b), *A. flavus* (c-d), *A. niger* (e-f) e *A. terreus* (g-h).

1.3.4. Ecologia

A ecologia de espécies de *Aspergillus* revela que não há um nicho específico para isolamento desses fungos. A exposição humana a espécies desse gênero ubíquo é muito comum, pois esses fungos têm sido isolados nos mais diversos locais (41).

Solo, ar, água, alimentos, material orgânico em decomposição, entre outros, são fontes saprofíticas de espécies de *Aspergillus* em ambientes rurais e urbanos. Espécies de *Aspergillus* também são encontrados em ambientes internos (superfícies de edifícios, ar, eletrodomésticos, etc.), na água potável e na poeira desses ambientes. As diversas espécies que compõem o gênero são capazes de utilizar uma grande variedade de substratos orgânicos e adaptar-se bem a uma ampla gama de condições ambientais. Eles

produzem conídios assexuados que se tornam facilmente dispersos no ar e são altamente tolerantes ao estresse e podem produzir ascosporos sexuais persistentes no meio ambiente (41, 42).

Conídios de *Aspergillus* spp. são componentes comuns de aerossóis onde eles percorrem correntes de ar, dispersando-se tanto em distâncias curtas quanto longas. Quando os conídios entram em contato com uma superfície sólida ou líquida, se as condições de temperatura e umidade forem adequadas, eles germinam (43). Conídios de espécies de *Aspergillus* estão entre as células microbianas com maior longevidade; maiores tolerâncias ao calor, pressão; e capacidade de germinar na menor atividade da água. Por exemplo, os conídios de espécies de *Aspergillus* (mais comumente envolvidas na infecção por aspergilose) podem sobreviver por 60 anos ou mais (44) e algumas estruturas de *A. fumigatus* (ascosporos) sobrevivem à temperaturas de 85°C (42). No ciclo saprofítico, os conídios liberados de conidióforos são prontamente dispersos no meio ambiente. Os conídios permanecem dormentes até encontrar as condições ambientais que permitem a ativação de seu metabolismo. Uma vez metabolicamente ativos, os conídios incham e germinam em filamentos de hifas que crescem no micélio, formando estruturas frutíferas, os conidióforos (27, 44).

A capacidade de se dispersar globalmente no ar e crescer em quase qualquer lugar quando houver nutrientes e água disponíveis faz com que 'ubíquo' seja um dos adjetivos mais utilizados para descrever o gênero (44). *A. fumigatus* é a mais ubíqua das espécies de *Aspergillus* devido à sua capacidade superior de sobreviver e crescer em uma ampla gama de condições ambientais em comparação com outras espécies. A natureza universal de *A. fumigatus* também é em parte por sua capacidade de produzir metabolitos secundários potentes e abundantes bombas de efluxo que servem como sistemas de defesa (44).

Devida a alta capacidade de dispersão dos conídios, padrões para o ambiente hospitalar para pacientes imunossuprimidos, sejam eles adultos ou crianças, requerem atenção especial (45). Os pacientes precisam ser afastados de construção ou obras de renovação e vasos de plantas e flores nas enfermarias e nos quartos (46). Trabalhos publicados recomendam acomodar pacientes em quartos hospitalares especiais com pressão de ar positiva e filtros *High Efficiency Particulate Arrestance* (Hepa) ou fluxo de ar laminar (47, 48). Filtros para abastecimento de água, especialmente chuveiros, são também recomendados (49, 50). Não existem dados disponíveis para apoiar a amostragem de ar ambiental regular para prevenir infecções. No entanto, a amostragem interna é aconselhável para monitorar a eficácia dos filtros (45).

1.4. A aspergilose

A apresentação clínica da doença causada por espécies de *Aspergillus* é determinada pela interação entre o micro-organismo e o hospedeiro. Ou seja, as manifestações clínicas são determinadas pela resposta imune do mesmo e, classicamente, são definidas como: alérgica, crônica e invasiva (51). O isolamento do micro-organismo em secreções respiratórias de hospedeiros hígidos geralmente reflete colonização, e não infecção. No entanto, a resposta imune exacerbada também pode causar complicações ao hospedeiro (51).Os pacientes se infectam após inalação dos conídios presentes no ar e esses podem penetrar nos alvéolos e se não forem removidos pelo organismo, podem germinar e proliferar, fazendo com que ocorra a forma invasiva de aspergilose (52).

As infecções pelas espécies de *Aspergillus* causam um largo espectro de doenças no ser humano. As várias formas de aspergilose devem ser vistas como um espectro contínuo de doença, podendo uma forma clínica evoluir para outra, dependendo, além de outros fatores, do grau de imunodeficiência do hospedeiro (53, 54).

Estudos recentes vêm demonstrando que em colonizações e infecções por *A. fumigatus* pode não ser isolado um único genótipo desse patógeno (55). 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 as suscetibilidades frente aos agentes antifúngicos também podem ser diferentes, podendo em um mesmo paciente serem encontrados isolados suscetíveis e isolados resistentes (56).

A genotipagem molecular pode oferecer uma compreensão mais profunda do padrão de colonização e infecção em pacientes permitindo avaliar também a relação entre isolados ambientais e isolados clínicos. A maioria desses estudos se concentra em *A. fumigatus* por ser a espécie clinicamente mais importante, porém a genotipagem de outras espécies, como *A. flavus*, por exemplo, também vem sendo descrita (57).

1.4.1. Formas de aspergilose

1.4.1.1. Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA)

Essa condição é caracterizada por alergia aos conídios de *Aspergillus* spp., ou seja, é uma resposta mediada por múltiplos antígenos expressados, principalmente, por *A. fumigatus* que coloniza a mucosa brônquica de indivíduos com asma, o que pode levar a danos permanentes das vias aéreas (58).

A ABPA ocorre quase exclusivamente em pacientes com asma ou indivíduos com fibrose cística (FC), onde a sensibilização fúngica provoca uma resposta de hipersensibilidade caracterizada por elevação das imunoglobulinas totais séricas (Ig) e aumento das imunoglobulinas específicas (IgE e IgG). Estima-se que a ABPA ocorra em 2,5% dos pacientes com asma. É importante estabelecer o diagnóstico de ABPA porque

a terapia reduz a morbidade e complicações que podem levar a danos pulmonares permanentes (58, 59).

A ABPA em pacientes com fibrose cística apresenta sintomas muito parecidos àqueles da asma. A colonização nesses pacientes desencadeia respostas imunes vigorosas, conduzindo a exacerbações frequentes e recorrentes de asma. Com o tempo, as reações imunes, associadas aos efeitos tóxicos diretos do fungo, acarretam lesão das vias respiratórias, com dilatação e bronquiectasia (58).

1.4.1.2. Aspergilose no paciente com Fibrose Cística

A fibrose cística (FC), é uma doença autossômica recessiva, que pode se apresentar em diferentes fenótipos e é mais frequente entre as pessoas caucasianas (60, 61). Essa doença congênita é devida a um defeito na proteína reguladora da condutância transmembrana na fibrose cística. A função dessa proteína é a secreção de íons de cloro em glândulas exócrinas. Devido à falta de íons de cloro, as secreções têm a viscosidade aumentada, o que traz inúmeras consequências, levando a doença em diversos órgãos. Essa condição prejudica, principalmente, os pulmões, fazendo com que os mesmos sejam altamente vulneráveis a infecções respiratórias que promovem a inflamação e a remodelação das vias aéreas (62).

As complicações respiratórias são as principais causas de mortalidade e morbidade na FC (63). Diversos micro-organismos podem causar a colonização e/ou infecção no pulmão desses pacientes, sendo os patógenos fúngicos mais comumente isolados de *Aspergillus* spp., principalmente *A. fumigatus* (64, 65). Tem sido relatada a associação da colonização por *A. fumigatus* com o maior risco de declínio da função pulmonar e, em pacientes com infecção causada por *A. fumigatus,* existe a associação com o aumento do risco de exacerbações pulmonares que requerem hospitalização. A

infecção persistente de *A. fumigatus* é um fator de risco independente para admissões hospitalares em pacientes com FC (66, 67).

1.4.1.3. Aspergilose pulmonar crônica

A aspergilose pulmonar crônica (APC) é uma doença rara que pode complicar outras doenças respiratórias adjacentes, geralmente com curso progressivo. APC usualmente acomete indivíduos aparentemente imunocompetentes, geralmente com uma condição pulmonar pré-existente, embora cerca de 5% dos casos não apresentam problema pulmonar ou doença sistêmica subjacente (68). Alguns fatores estão implicados na origem da APC: infecção micobacteriana prévia, enfisema, sarcoidose, câncer de pulmão, cirurgia torácica, fibrose dos lobos superiores, infecção por *Legionella* spp*.,* declínios sutis na imunidade, corticosteroides, *diabetes mellitus*, desnutrição, aids, uso de álcool e drogas (68, 69).

Existem três principais formas de APC: aspergiloma simples, aspergilose pulmonar cavitária crônica (APCC) e nódulo de *Aspergillus* spp. (70). Estima-se que existam 3 milhões de pacientes com APC em todo o mundo (6). A forma mais comum da aspergilose pulmonar crônica é a APCC. Sem o tratamento adequado, a APCC pode progredir para a aspergilose pulmonar fibrosante crônica. A APCC caracteriza-se por formação e progressão da cavidade e está associada a morbidade e mortalidade significativas em contraste com aspergiloma simples (71).

O aspergiloma é uma manifestação clínica tardia formada em uma cavidade onde ocorre o crescimento fúngico. Essa condição é também chamada de bola fúngica, sendo incomum que a mesma seja causada por qualquer outro fungo, que não os pertencentes ao gênero *Aspergillus*. O aspergiloma pulmonar resulta da colonização de uma lesão pulmonar pré-existente (normalmente cavidade pós tuberculose), pelo micro-organismo e é geralmente curada por remoção cirúrgica (72).

1.4.1.4. Aspergilose invasiva (AI)

A doença invasiva é a forma mais severa de aspergilose e desenvolve-se em pacientes gravemente imunocomprometidos, especialmente aqueles com neutropenia. A quimioterapia para o tratamento do câncer visa células cancerosas e células que se dividem rapidamente, como os neutrófilos, que têm um papel importante na defesa do hospedeiro contra AI. Para realizar transplantes de células estaminais hematopoiéticas para o tratamento de doenças hematológicas malignas, são utilizadas altas doses de quimioterapia. Tais doses destroem a capacidade da medula óssea de produzir células cancerosas, mas também de produzir novas células estaminais hematopoiéticas, causando neutropenia (73). Esta terapia resulta em um sistema imunológico fraco e ineficaz, causando eliminação deficiente dos conídios inalados, especialmente os de *A. fumigatus* (74).

Apesar de acometer mais indivíduos neutropênicos, a AI é cada vez mais frequente em hospedeiros não neutropênicos, incluindo os pacientes receptores de transplante de órgãos sólidos – que recebem altas doses de medicamentos anti-rejeição, pacientes criticamente doentes em uso de antibacterianos de amplo espectro e pacientes com doenças autoimunes em uso de medicamentos imunossupressores como os corticosteroides (74).

1.4.1.4.1. Aspectos celulares da aspergilose invasiva

Como supracitado, a aspergilose em suas diversas manifestações, é uma doença infecciosa complexa que representa um desafio diagnóstico e terapêutico. As estruturas infectantes desse micro-organismo são os conídios. Os conídios de *A. fumigatus* são mais hidrofóbicos do que os produzidos por outras espécies e dispersam mais facilmente. Seres humanos inalam centenas dessas estruturas que são capazes de alcançar o trato respiratório inferior devido às suas dimensões físicas, com diâmetros de 2-3 μm (75). O

movimento mucociliar normalmente funciona como um mecanismo para eliminar as partículas inaladas que ficam presas na barreira epitelial do trato respiratório superior e este mecanismo resulta eficientemente na depuração de conídios (76). Assim, cílios nas células epiteliais das vias aéreas e macrófagos alveolares residentes removem conídios inalados. No entanto, os elementos fúngicos podem persistir no caso de insuficiência de remoção mucociliar, como é o caso de fibrose cística ou pacientes com asma, causando respostas imunes alérgicas devido a colonização fúngica prolongada, desencadeando eventos inflamatórios (76).

Uma fração de conídios inalados pode chegar até os alvéolos, onde podem ser confrontados com células epiteliais, células residentes e células efetoras da imunidade inata representadas principalmente pelos fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células dendríticas e células *natural killer* (NK) (77, 78). Neste estágio, a imunossupressão desempenha um papel crucial na determinação do resultado do contato patógeno-hospedeiro. Na ausência de uma resposta imune adequada, os conídios de *Aspergillus* spp. passarão por uma transição morfológica até a germinação e, eventualmente, extensão de hifas. Uma vez germinadas, as hifas de *A. fumigatus* entram em contato com as células epiteliais alveolares e passam a invadir o tecido hospedeiro, podendo evoluir para disseminação sistêmica (79).

A AI geralmente começa com a invasão dos vasos sanguíneos; sua obstrução, formando trombo causado pelo micélio, bem como com infartos hemorrágicos, que são muito característicos deste tipo de infecção. A zona infartada compreende a região de necrose isquêmica causada pelo bloqueio dos vasos sanguíneos. Hifas do micro-organismo são vistas em cortes de tecidos necróticos. A disseminação hematogênica pode envolver cérebro, coração, rins e mucosas do trato gastrointestinal.

Resumidamente, a imunidade inata, apoiada por componentes humorais e mecanismos adaptativos, assegura a depuração efetiva de elementos fúngicos inalados, evitando que as centenas de estruturas inaladas diariamente evoluam para um quadro de infecção (80).

1.4.2. Epidemiologia

As doenças fúngicas levam a morte mais de 1,5 milhão de indivíduos e afetam mais de um bilhão de pessoas (6, 7). No entanto, essas infecções ainda são um assunto negligenciado pelas autoridades de saúde pública, embora a maioria das mortes por infecções fúngicas sejam evitáveis. Características socioeconômicas, geo-ecológicas e o crescente número de populações de risco são os principais determinantes das variações na incidência e prevalência de doenças fúngicas em todo o mundo (10).

O diagnóstico exato e precoce permite uma terapia antifúngica imediata. No entanto, o diagnóstico, muitas vezes, é lento ou indisponível, causando a morte, doença crônica grave e sequelas (10).

Estimativas recentes relatam como sendo de 3.000.000 de casos de aspergilose pulmonar crônica, 6.675 casos de ABPA em pacientes fibrocísticos, 6.500.000 casos de asma severa causada por sensibilidade a *Aspergillus* spp. e 4.800.000 de casos de ABPA, em pacientes asmáticos, a taxa global de cada uma dessas formas de aspergilose (10). A AI é uma doença fúngica grave e agressiva que ocorre em hospedeiros profundamente imunocomprometidos. A incidência global de aspergilose invasiva tem sido relatada como sendo de cerca de 250.000 casos, com mortalidade associada variando entre 30-80% (81). No entanto, este dado foi recentemente atualizado como sendo superior a 300.000 casos (10, 82).

As infecções fúngicas humanas são prevalentes no Brasil, no entanto, essas condições não são consideradas doenças de notificação obrigatória. Trabalho de Giacomazzi e colaboradores (8) estimou a taxa de doenças fúngicas graves em um ano no Brasil, com base em dados disponíveis e literatura publicada. Os dados foram coletados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus). Para doenças fúngicas para as quais nenhum dado oficial estava disponível, os pressupostos de frequências foram feitos através da estimativa com base na literatura. O estudo mostrou que cerca de 1.000.000 de pessoas sofrem de algum tipo de aspergilose anualmente no Brasil, sendo 8.664 casos de AI, 12.032 casos de APC, 390.486 casos de ABPA e 599.283 casos de asma severa causada por sensibilidade a *Aspergillus* spp..

1.4.3. Diagnóstico clínico

O manejo efetivo de IFI depende de vários fatores como dados epidemiológicos, fatores de risco envolvidos em cada caso e, principalmente, o diagnóstico precoce para que o tratamento ideal seja empregado. (45, 83). O diagnóstico clínico das mais variadas formas de aspergilose representa um grande desafio para a medicina por diversas razões: natureza inespecífica das apresentações clínicas; escassez de ensaios sensíveis e acurados de diagnóstico precoce e o fato de que só é possível isolar o patógeno envolvido na infecção em raros casos (84-86).

Os critérios mais importantes de diagnóstico de aspergilose, principalmente AI, são: evidências clínicas e radiológicas de infeção de trato respiratório baixo; avaliação da microscopia direta a partir de material clínico; cultivo do micro-organismo; ou evidência imunológica, sorológica e/ou molecular do antígeno fúngico em hospedeiros com febre e neutropenia; e evidências histopatológicas de infecção (83). No entanto, pacientes são muitas vezes submetidos a tratamentos empíricos mesmo sem a confirmação da infecção.

1.4.4. Diagnóstico laboratorial

1.4.4.1. Métodos fenotípicos de identificação de espécies fúngicas

O diagnóstico laboratorial clássico da aspergilose inclui o exame microscópico direto de amostras clínicas, a demonstração de fungos em cortes de tecido por meio de análises histopatológicas e o cultivo e identificação fenotípica do agente etiológico. No entanto, essas abordagens não são frequentemente sensíveis e específicas o suficiente para o diagnóstico definitivo da infecção (86). A acurácia dependerá, além do micro-organismo em questão, da obtenção de amostras biológicas, o que muitas vezes não é possível por causa da condição do paciente. Cabe destacar que a cultura, embora considerada o padrão-ouro no diagnóstico das micoses, é, muitas vezes, lenta e de sensibilidade baixa (86).

Além disso, metodologias usadas rotineiramente no diagnóstico laboratorial das micoses, baseadas na identificação fenotípica dos agentes etiológicos destas infecções, geralmente se limitam à detecção dos micro-organismos em pacientes em um estágio já avançado da doença. O gerenciamento de IFI requer um diagnóstico preciso, mas infelizmente as ferramentas de diagnóstico modernas no laboratório de micologia são escassas na maior parte dos laboratórios do mundo (87).

1.4.4.2. Biomarcadores no diagnóstico de aspergilose invasiva

A cultura de *Aspergillus* spp. em combinação com a demonstração histopatológica da invasão de hifas no tecido fornece evidência definitiva de AI (83). No entanto, a biópsia frequentemente não é viável devido aos riscos de complicações em pacientes críticos. Desta forma, a utilização de métodos não-invasivos se destaca como uma importante ferramenta para o diagnóstico das micoses invasivas, inclusive a AI (45, 88).

A parede celular de fungos como *Aspergillus* spp. apresenta componentes como galactomanana (GM, específica de *Aspergillus* spp.) e β-(1→3) - D-glucana (BDG,

comum a diversas espécies de fungos). Esses polissacarídeos podem ser utilizados para o diagnóstico de infecções fúngicas invasivas, pois estes antígenos circulantes podem ser detectados no soro ou em lavado brônquico em uma fase inicial da infecção e antes do surgimento dos sintomas clínicos (89, 90).

Os testes para a detecção de GM (Bio-Rad Platelia™ *Aspergillus*) e BDG (Fungitell®) são procedimentos mais rápidos que os métodos tradicionais, sendo opções uteis para o diagnóstico precoce da AI. A presença desses antígenos também pode ser utilizada para monitorar a resposta dos pacientes ao tratamento com agentes antifúngicos. No entanto, a sensibilidade e especificidade desses biomarcadores fúngicos não são ótimas e observam-se variações entre populações de pacientes (91). Estes testes ainda possuem muitos interferentes e testes com resultados falsos positivos e falsos negativos já foram relatados na literatura podendo obscurecer o correto diagnóstico e prejudicando assim o manejo correto do paciente. Além disso, os *kits* disponíveis para detecção desses marcadores possuem elevado custo e apenas alguns grandes centros contam com essas opções (92, 93).

Estudos têm demonstrado que a triagem de pacientes hematológicos de alto risco com a utilização da combinação de detecção de GM e método molecular, melhora a precisão do diagnóstico e está associada ao diagnóstico precoce (94, 95).

1.4.4.3. Identificação molecular de espécies de *Aspergillus*

Devido à grande importância de espécies de *Aspergillus* como patógenos humanos, diferentes grupos de pesquisa desenvolveram e estão desenvolvendo diversas técnicas moleculares de identificação e genotipagem (96, 97). As ferramentas moleculares apresentam elevadas sensibilidade e especificidade na detecção, permitindo resolver as limitações do diagnóstico convencional (98, 99). Dessa forma, essas ferramentas podem ser empregadas tanto no diagnóstico a partir de amostras clínicas (45,

95), como na identificação das espécies, na busca por mecanismos de resistência aos antifúngicos e na tipagem para epidemiologia molecular desses micro-organismos (97).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido essencial para o desenvolvimento de técnicas moleculares para identificação e genotipagem de espécies de fungos, incluindo espécies de *Aspergillus.* O sequenciamento de ácidos nucléicos tornou-se uma importante metodologia na identificação molecular de micro-organismos, sendo útil para identificação de bactérias, micobactérias, protozoários, vírus, fungos, entre outros (100). O sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) é muito utilizado para identificação de fungos. Essa região foi considerada o "código de barras" para fungos (101). A *International Society for Human and Animal Mycology-sponsored Aspergillus Working Group* tem recomendado o método de sequenciamento com a utilização da região do DNA ribossomal ITS para a identificação molecular de gênero. Para a identificação de espécies, o sequenciamento da região codificadora da proteína ß-tubulina e, quando necessário, o gene da calmodulina devem ser realizados (96, 102, 103).

Atualmente, a posição precisa de uma espécie dentro de um complexo de espécies requer sequenciamento de DNA ou outros métodos de biologia molecular. 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 (96, 102, 104). Espécies de *Aspergillus* apresentam variação na suscetibilidade inata frente aos agentes antifúngicos. Espécies pertencentes ao complexo *A. terreus*, por exemplo, são naturalmente resistentes ao antifúngico poliênico anfotericina B (105).

Como citado anteriormente, as espécies mais comumente envolvidas na aspergilose são *A. fumigatus, A. flavus, A. niger e A. terreus.* No entanto, na última década, estudos têm apontado para uma mudança na etiologia da aspergilose e ressaltam

o surgimento de espécies crípticas e raras de *Aspergillus* em vários contextos clínicos (29, 106-109). Este novo perfil está principalmente ligado à aplicação da análise de sequências multilocus de DNA, levando à descrição de espécies "crípticas", ou seja, espécies que são fenotipicamente muito próximas, que eram anteriormente desconhecidas e só podem ser diferenciadas a partir de sequenciamento de DNA (103, 107, 110).

Com a introdução da identificação molecular, foi possível perceber que vários fungos identificados morfologicamente como *A. fumigatus*, por exemplo, 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 subespécies como: *Aspergillus lentulus, Aspergillus felis, Aspergillus viridinutans* e *Aspergillus frankstonensis* (29, 111-113).

A diferenciação entre *A. lentulus* e *A. fumigatus*, realizada com base em características morfológicas, é impossível, pois ambas as espécies são morfologicamente idênticas (104). Essas duas espécies, geralmente, não possuem o mesmo perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos atualmente utilizados. Neste caso, a discriminação entre as duas espécies é essencial, pois a identificação correta das espécies pode desempenhar um papel fundamental na escolha da terapêutica antifúngica apropriada.

Técnicas rápidas de identificação molecular baseadas em PCR vêm sendo relatadas na literatura. O ensaio de PCR em tempo real, denominado AsperGenius®, detecta várias espécies de *Aspergillus* e importantes mutações de *A. fumigatus* associadas à resistência aos azóis. O ensaio permite a detecção sensível e rápida de espécies de *Aspergillus* diretamente a partir de amostras clínicas como lavado brônquico. Detecção direto de amostras clínicas agiliza o diagnóstico e permite o diagnóstico ainda que as culturas sejam negativas, o que pode fazer dessa técnica uma promissora metodologia a ser utilizada (114, 115).

Estudos recentes vêm demonstrando que em colonizações e infecções por *A. fumigatus* e outras espécies pode não ser isolado apenas um único genótipo desse patógeno (55, 116, 117). Técnicas como a de microssatélites permitem que esses isolados sejam caracterizados quanto sua origem clonal (56, 118, 119). 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 as suscetibilidades frente aos agentes antifúngicos também podem ser diferentes. Dessa forma, em um mesmo paciente pode ser encontrado isolados suscetíveis e isolados resistentes (120).

Estudos demonstram que a técnica de microssatélites não é capaz de diferenciar entre colonização ou infecção, porém ela é capaz de 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 (diferentes sítios), 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 (55, 56).

1.4.4.4. Análise proteômica de identificação de espécies fúngicas: método de espectrometria de massa por ionização e dessorção a *Laser* assistida por matriz: tempo de voo (Maldi-Tof MS)

Metodologias usadas rotineiramente no diagnóstico laboratorial das micoses, embasadas na identificação fenotípica dos agentes etiológicos destas infecções,

geralmente se limitam à detecção dos micro-organismos em pacientes em um estágio já avançado da doença. Ao se tratar de AI, essas metodologias podem não ser viáveis dado o estado crítico dos pacientes.

Esses desafios têm estimulado a busca por novas tecnologias de diagnóstico das infecções fúngicas. Uma alternativa promissora nesse sentido é a utilização de estudos proteômicos por meio da metodologia de *matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (Maldi-Tof MS), uma metodologia que permite a especiação correta do agente etiológico em poucos minutos (121-124). O baixo custo das análises, agilidade e possibilidade de identificação diretamente de amostras clínicas são atrativos da nova tecnologia. Alicerçada na espectrometria de massa, a técnica de ionização gera um perfil de espectros das proteínas, sendo esse perfil específico para cada espécie. As identificações são realizadas ao comparar o espectro de massa gerado pelo micro-organismo com espectros de referência de um banco de dados (125).

Introduzido pela primeira vez em laboratórios clínicos de microbiologia na Europa, tem sido utilizado por laboratórios em todo o mundo e vem revolucionando a identificação de micro-organismos. Embora tenha múltiplas aplicações, a sua utilização em microbiologia clínica se destaca por ser um método fácil, rápido e preciso para a identificação de bactérias e fungos (126). Ao proporcionar um diagnóstico microbiológico rápido, a utilização do Maldi-Tof MS contribui para uma menor mortalidade e tempo de hospitalização dos pacientes e, consequentemente, tem um impacto significativo na economia da instituição e na saúde pública (125).

Como mostrado em diversos trabalhos na literatura, Maldi-Tof MS tem sido otimizado e parece ser uma metodologia promissora de identificação de micro-organismos envolvidos em IFIs, desde que um banco de dados apropriado esteja disponível. Diferentemente do que está já está padronizado e disponível em termos de

protocolos para preparação de amostras para identificação de leveduras por MALDI-TOF (124), os protocolos de preparação das amostras de fungos filamentosos ainda carecem de aperfeiçoamento.

1.5. Tratamento da aspergilose

Três classes de agentes antifúngicos são utilizadas atualmente no tratamento da aspergilose invasiva: o poliênico anfotericina B, as equinocandinas e os triazólicos (45). A terapia primária da aspergilose, principalmente AI, foi amplamente baseada na utilização de AMB (classe dos poliênos) e de compostos triazólicos (83). No entanto, a utilização de AMB tem sido limitada pelos seus efeitos tóxicos (127). Como já citado, a espécie *A. terreus* é naturalmente resistente à AMB (128) . Além dessa espécie, outras incluindo *A. flavus, A. lentulus, Aspergillus nidulans, Aspergillus ustus, e Aspergillus glaucus* podem também demonstrar resistência a este composto (129, 130). Apesar da sua alta toxicidade, a AMB ainda é amplamente utilizada e é considerada o tratamento padrão-ouro de algumas infecções fúngicas invasivas (131).

Nos últimos 20 anos, os antifúngicos pertencentes à classe dos azóis têm desempenhado importante papel na prevenção e tratamento de infecções causadas por *Aspergillus* spp.. O derivado azólico voriconazol (VRZ) é atualmente utilizado como a primeira linha na terapia da AI (45, 83, 132, 133). Em pacientes com insuficiência hepática, a AMB lipossomal é aconselhada como a primeira opção (45).

Outros medicamentos podem ser utilizados no tratamento de AI em pacientes que não podem receber VRZ ou que não respondem a este medicamento. Estes compostos incluem, primeiramente, AMB (de preferência lipossomal), itraconazol (ITZ), posaconazol (PSZ) e isavuconazol (ISZ), e também caspofungina (CPF) e micafungina (MCF), que pertencem à classe das equinocandinas (134). No entanto, segundo manuais internacionais, as equinocandinas devem ser utilizadas apenas quando ocorrerem falhas

terapêuticas e, de preferência, associadas a outra classe de antifúngicos (45). Quando for o caso e sempre que possível, o tratamento com medicamentos imunossupressores deve ser interrompido ou diminuído (83).

Embora os procedimentos diagnósticos tenham melhorado nos últimos anos, eles não são satisfatórios. Por esta razão, os pacientes com alto risco de desenvolver AI devem receber tratamento profilático, especialmente pacientes com neutropenia profunda e prolongada ou com doença do enxerto contra hospedeiro (DCEH) ativa (45). Os esquemas de tratamento profiláticos com antifúngicos podem variar dependendo da doença de base e da condição de cada paciente (45).

1.6. Mecanismo de ação dos antifúngicos utilizados no tratamento da aspergilose

Poliênicos como AMB e nistatina interagem com ergosterol presente na membrana celular fúngica, produzindo poros ou canais que aumentam a permeabilidade da membrana, gerando uma grande perda de eletrólitos, como potássio e magnésio, determinando assim o rompimento e morte da célula, agindo como fungicidas (129). A AMB foi introduzida no tratamento de micoses em 1950 e apesar de sua elevada efetividade, possui alta toxicidade, principalmente nefrotoxicidade, mielotoxicidade e hepatotoxicidade. Sua administração é endovenosa e requer hospitalização para acompanhamento e monitoramento das funções fisiológicas. AMB sob a forma lipossomal está disponível no mercado, sendo de baixa toxicidade, fácil utilização, permitindo alcançar doses bem mais elevadas em curto espaço de tempo, independentemente da função renal, o que a coloca como excelente opção terapêutica. No entanto, o preço é extremamente elevado e poucos pacientes podem usufruir deste tratamento (129).

Azólicos como fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), cetoconazol (KTZ), voriconazol (VRZ), ravuconazol (RVZ), entre outros, inibem especificamente a

biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana citoplasmática. 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, sendo o FCZ o principal representante da classe. No entanto, espécies de *Aspergillus* são naturalmente resistentes a esse composto (132, 135).

As equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) são antifúngicos inibidores específicos da síntese de 1,3-β-D-glucana, constituinte da parede celular fúngica. Estes antifúngicos inibem a ação da enzima β-1,3 glucano-sintase o que resulta em depleção de polímeros de glucano, destruindo a parede celular fúngica (134).

1.7. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

O teste de suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Aspergillus* spp. não é rotineiramente realizado na maioria dos laboratórios clínicos de micologia, subestimando assim a verdadeira ocorrência de resistência. Estudo que investigou a frequência de resistência em coleções de cultura de *Aspergillus* spp. na Itália, em 2015, relatou encontrar os primeiros isolados de *A. fumigatus* resistentes em amostras obtidas há 17 anos a partir de estudos retrospectivos (136). A TR34/L98H foi encontrada pela primeira vez na Holanda em 2008, sendo também o isolado obtido em 1998 (137). Esses resultados destacam a importância de conhecer o perfil de suscetibilidade de espécies de *Aspergillus* tanto em estudos retrospectivos como em amostras obtidas prospectivamente.

Infecções fúngicas requerem, geralmente, longos períodos de terapia com antifúngicos. Esses esquemas terapêuticos muitas vezes causam muitos efeitos colaterais e podem promover a resistência de alguns fungos aos diferentes antifúngicos. Essas razões enfatizam a necessidade de realização de testes de suscetibilidade *in vitro* para avaliar o comportamento desses micro-organismos frente aos antifúngicos disponíveis. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos têm grande importância por guiarem as

decisões clínicas com o objetivo de promover uma terapia apropriada contra os agentes fúngicos revertendo em melhores resultados para o paciente, além de possibilitar o acompanhamento do possível surgimento de isolados resistentes (138).

Existem vários métodos para a realização de testes de suscetibilidade para *Aspergillus* spp*.,* como testes de disco difusão, a macro (139) e a microdiluição em caldo (140, 141), que permitem a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (142, 143). Também existem fitas *Etest* para determinação da CIM (144, 145) e *kits* comerciais (146). Cada método apresenta vantagens e desvantagens, por exemplo, os ensaios de macro e microdiluição são trabalhosos e demandam um tempo maior para preparação, enquanto o *Etest* é fácil de se realizar, porém possui elevado custo, e o teste de difusão em ágar possui baixo custo, mas não é capaz de indicar valores exatos de CIM.

Métodos de referência para preparo dos testes de microdiluição em caldo são utilizados para determinação da CIM: o protocolo CLSI M38-A2 é um método padrão altamente reprodutível e os valores de CIM podem ser utilizados para seleção terapêutica de antifúngicos, bem como monitoramento da suscetibilidade aos antifúngicos durante o tratamento (139). No entanto, embora a obtenção da CIM seja valiosa para a seleção do melhor agente terapêutico, a relação confiável do valor de CIM com os resultados obtidos durante a terapia antifúngica ainda é problemática (139, 147). Por estas razões, o uso combinado de abordagens moleculares para identificar resistência e o teste de suscetibilidade fenotípica pode melhorar e orientar o sucesso do tratamento (148). Além disso, ao se conhecer o perfil de suscetibilidade relacionado com os desfechos clínicos, será possível contribuir para a determinação de pontos de corte clínicos para as espécies de *Aspergillus* frente aos antifúngicos, uma vez que a real correlação entre eles ainda não foi possível de ser obtida.

Segundo o mais recente *guideline* internacional (45), publicado por Ulmann et al., 2018, o teste de suscetibilidade aos antifúngicos de espécies de *Aspergillus* deveria ser realizado em pacientes com doença invasiva. A exceção seria de pacientes que nunca receberam antifúngicos azólicos e que estão em regiões sem casos de resistência registrados em programas de vigilância. Os testes deveriam ser relizados regularmente, para estudos com fins epidemiológicos. Conhecer o perfil de suscetibilidade de um isolado é particularmente importante em pacientes que não respondem ao tratamento antifúngico ou em pacientes com suspeita clínica de quadro de infecção por isolado resistente. Se testes para a determinação da CIM não estiverem disponíveis, a triagem em ágar poderia ser utilizada para detecção de resistência aos antifúngicos azólicos.

1.8. Resistência aos agentes antifúngicos

Recentemente, o surgimento de isolados de *A. fumigatus* resistentes aos derivados azólicos – primeira linha de antifúngicos utilizada no combate da aspergilose invasiva, está sendo investigado em diversos países. Isolados resistentes a estes compostos apresentam uma grande variedade de mutações no gene *cyp*51A, que codifica a enzima 14-α lanosterol demetilase do citocromo P450, o principal alvo para estes compostos (149). De modo geral, distinguem-se duas rotas de desenvolvimento de resistência nesses micro-organismos: através da terapia de longo prazo com derivados azólicos e através do contato desses micro-organismos com compostos azólicos utilizados na agricultura na forma de defensivos agrícolas (137, 150-152).

Embora as características clínicas destas rotas sejam diferentes, os pré-requisitos fundamentais para o desenvolvimento da resistência são os mesmos: qualquer configuração que reúna a reprodução ativa de *A.fumigatus* e a presença de compostos azólicos, pois aparentemente é nesse contato que existe o risco de ocorrer alguma mutação que configure resistência (120, 153, 154).

Em pacientes com aspergiloma, por exemplo, que recebem terapia com azólicos, o *A. fumigatus* pode sofrer múltiplas alterações genéticas durante a infecção, incluindo alterações que conferem resistência a esses compostos. Isso pode refletir em uma amostra clínica que contenha colônias com mecanismos de resistência, mas que podem estar presentes, concomitante, colônias suscetíveis (120). Os mecanismos de resistência encontrados em cultura são caracterizados por mutações de ponto no gene *cyp*51A. No entanto, embora essas mutações sejam consideradas as principais causas de resistência aos antifúngicos azólicos, muitos *A. fumigatus* com fenótipo resistente não apresentam mutações neste gene, o que sugere que outros mecanismos de resistência estão presentes, alguns dos quais foram identificados, mas muitos dos quais permanecem desconhecidos (155).

Inibidores de *cyp*51A interagem com a proteína formando um complexo com o grupo heme, localizado no centro catalítico da enzima (156). Substituições de aminoácidos localizadas ao longo da periferia da proteína (por exemplo, S52T, Q88H, N125I, Q141H, S297T ou F495H) aparentemente não alteram de maneira relevante sua funcionalidade (150, 156)

Por outro lado, substituições em posições, como G54 (157), G138 (158) ou M220 (150, 158) localizam-se principalmente próximas a abertura de um dos dois canais de acesso do ligante da proteína, bloqueando o encaixe da maioria das moléculas de antifúngicos azólicos (150, 156), reduzindo assim a interação entre o fármaco e o fungo.

Da mesma forma, a substituição L98 está localizada em uma região altamente conservada em forma de laço e, modificações nessa região, afetam a entrada do antifúngico no canal de acesso ao ligante (150). Várias outras substituições de aminoácidos (por exemplo, F46Y, H147Y, M172V, N248T, N248K, D255E, D343N,

E427K e G434C) parecem não estar relacionadas a resistência, pois elas são encontradas em diferentes combinações em isolados suscetíveis aos azóis (138, 150, 158-160)

A inserção de 34, 46 ou 53 pares de bases (pb) (repetidos repetições em tandem) na região promotora do gene *cyp*51A combinadas com substituições de aminoácidos podem conferir vários graus de resistência aos azóis (161-163). As TR ocorrem no DNA quando um padrão de um ou mais nucleotídeos é repetido e as repetições são diretamente adjacentes entre si. Atualmente, a causa de resistência mais frequentemente observada consiste na presença de uma TR de 34 pb na região promotora do gene *cyp*51A combinada com a substituição de uma leucina (L) por uma histidina (H) na posição 98 da sequência de aminoácidos (L98H) (161). Esta combinação (TR34/L98H) confere alta resistência ao ITZ e vários níveis de resistência cruzada a outros azóis.

A inserção de 46 pb (TR46) em combinação com a alteração de uma tirosina (Y) por uma fenilalanina na posição 121 e a troca de uma treonina (T) por uma alanina (A) na posição 289 da sequência de aminoácidos (Y121F e T289A), entre outras, confere valores intermediários a altamente resistentes ao VRZ e reduzida suscetibilidade ao ITZ e PSZ. Além disso, a TR53 foi encontrada em isolados com resistência cruzada a VRZ e ITZ, sem possuir outras alterações no gene *cyp*51A (163). Mutações do tipo TR na região promotora do gene *cyp*51A levam a superexpressão, fazendo com que uma quantidade maior do antifúngico seja necessária para boquear a ação da mesma (164).

Acredita-se que mutações de resistência podem se desenvolver no ambiente quando o fungo é exposto a compostos que exibem atividade contra ele mesmo (155). Embora *A. fumigatus* não seja um fito patógeno, muitos fungicidas com estruturas semelhantes aos compostos utilizados na prática clínica, possuem atividade contra esses micro-organismos (151, 165). Desta forma, existe a hipótese de que *A. fumigatus* possa

desenvolver resistência aos compostos azólicos devido ao contato com moléculas utilizadas na agricultura para proteger plantações contra fito patógenos.

Na Holanda, resistência aos derivados azólicos foi relatada em pacientes que não foram expostos a esta classe de medicamentos. Snelders e colaboradores 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 (151). A TR46/Y121F/T289A foi relatada em *A. fumigatus* de 15 pacientes em seis hospitais na Holanda. *A. fumigatus* com as mesmas mutações (TR46/Y121F/T289A) também foram obtidos a partir de coletas ambientais em casas e quintais dos pacientes (152). Outras combinações envolvendo TR34, TR46 e TR53 vêm sendo descritas. Revisão realizada por Dudakova e colaboradores apresenta diversas combinações já relatadas na literatura (148) e seus respectivos valores de CIM. Estudos relatando *A. fumigatus* clínicos e ambientais resistentes que carregam essas mutações vêm sendo descritos em todo o mundo, inclusive na Colômbia e Argentina (163, 166-173).

À medida que os relatos de isolados de *A. fumigatus* resistentes aos azóis aumentam, podem ser necessários antifúngicos como AMB para o tratamento de AI. Esse composto já foi utilizado como primeira linha no tratamento da doença, mas devido a sua alta toxicidade foi sendo substituído pelos compostos pertencentes a classe dos azóis (131). Estudos que investigaram a correlação *in vitro-in vivo* da resistência a AMB em *A. fumigatus* apresentaram dados inconsistentes (174, 175). No entanto, estudos *in vivo* mostraram maior eficácia de AMB obtida quando a concentração máxima do soro de fármaco excede 2,4 vezes os valores de CIM obtido *in vitro*, o que torna inviável quando os micro-organismos apresentam elevados valores de CIM (176).

A resistência de *Aspergillus* spp. a AMB não é bem compreendida. No entanto, apesar da dificuldade de associar resultados *in vitro* com resultados clínicos, altos valores de CIM já foram associados com falha terapêutica (130). Dois mecanismos parecem estar envolvidos na resistência à AMB, diminuição da concentração de ergosterol na membrana celular devido a mutações na via de síntese e aumento da produção de catalases, que protegem as células do estresse oxidativo causado pelo fármaco (131).

As equinocandinas estão sendo cada vez mais utilizados na profilaxia de pacientes com alto risco para o desenvolvimento de doença fúngica invasiva, bem como para terapia com pacientes com AI comprovada ou provável que falham na terapia convencional. A utilização das equinocandinas tem aumentado e a resistência a esses compostos já tem sido descrita. A resistência à equinocandina em espécies de *Candida* tem sido associada a mutações de ponto nos genes *fks*, que codificam as enzimas β- (1,3) -glucano sintases (177). Recentemente, foi comprovado que uma mutação de ponto no gene *fks*1 em *A. fumigatus* também é suficiente para conferir resistência às equinocandinas e levar a falha terapêutica (178).

Uma vez que estes agentes também podem se tornar ineficazes contra alguns isolados, restam poucas ou nenhuma opção terapêutica. Estratégias de diagnóstico e detecção de resistência devem ser implementadas e o desenvolvimento de novos compostos e ensaios avaliando combinação de drogas devem ser explorados.

Com o objetivo de detectar resistência emergente aos antifúngicos, podem ser calculados pontos de cortes epidemiológicos (PCE). Os PCE são calculados com base na distribuição dos valores de CIM para cada antifúngico e cada espécie de micro-organismo. Ou seja, o PCE é o valor de CIM que mais se repete dentro de uma determinada população. Uma população de micro-organismo que se afasta dos valores

normais da população selvagem (*wild type*) é classificada como uma população não selvagem (*non- wild type*). Um isolado é definido como selvagem quando há ausência de mutações que levem a mecanismos de resistência a um composto utilizado contra ele (157).

Um micro-organismo não selvagem é definido pela presença de mutação adquirida que leva a um mecanismo de resistência. Tanto isolados designados como selvagens como os não selvagens podem ou não responder clinicamente ao composto em questão. O PCE é o mais alto valor de CIM que pertence a população selvagem do micro-organismo. Enquanto os pontos de cortes clínicos predizem os resultados da terapia, o papel o PCE é de detectar resistência emergente em isolados não selvagens com reduzida suscetibilidade ao agente avaliado (157, 179).

1.9. Justificativa

O Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp) é uma instituição universitária de atendimento terciário, que atende pacientes da região, além de pacientes oriundos de outros estados próximos. O HC-Unicamp possui 419 leitos e é um hospital de referência nos principais serviços médicos, atendendo uma população de 3.000.000 habitantes. No HC-Unicamp muitos pacientes de alto risco são tratados e estão suscetíveis a agentes infecciosos oportunistas como espécies de *Aspergillus*.

Testes de suscetibilidade de *Aspergillus* spp. frente aos antifúngicos não são realizados na rotina do HC-Unicamp. Dessa forma, o perfil desses micro-organismos não era conhecido. Relatos de isolados resistentes vêm sendo publicados em todo o mundo e *Aspergillus* spp. resistentes aos antifúngicos não haviam sido identificados nesta instituição. No entanto, sem a vigilância continua para o possível surgimento de isolados

resistentes, não é possível garantir que micro-organismos resistentes não possam colonizar e causar doenças nos pacientes atendidos.

Estudos recentes vêm demonstrando que em colonizações e infecções por *A. fumigatus*, a principal espécie causadora de aspergilose, pode ser isolado mais de um genótipo desse patógeno. 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 as suscetibilidades frente aos agentes antifúngicos também podem ser diferentes, podendo em um mesmo paciente serem encontrados isolados suscetíveis e isolados resistentes.

Com estudos dessa natureza, a instituição se beneficia, podendo desenvolver formas 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 aplicadas 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

Avaliar retrospectivamente a ocorrência das espécies e o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos de isolados do gênero *Aspergillus* obtidos a partir de amostras clínicas sequenciais de pacientes com aspergilose tratados no HC-Unicamp e mantidos na Micoteca do LIF-FCM (1998 a 2013) e prospectiva e concomitantemente, realizar coletas ambientais e de mucosa nasal nas Unidades de Transplante de Medula Óssea (TMO) e no setor de Hematologia do mesmo hospital.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar as espécies, por meio de características morfológicas e sequenciamento de DNA, dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. reativados a partir da coleção do LIF;

- Realizar coletas de ar de ambientes da unidade de TMO e do setor de Hematologia seguida da identificação morfológica e molecular das espécies de *Aspergillus* isoladas;

- Coletar amostras de mucosa nasal em pacientes internados na unidade de TMO e no Setor de Hematologia (na mesma ocasião da coleta de ar) para avaliação de possível colonização por espécies de *Aspergillus;*

- Avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp..

- Analisar a presença de mutações no gene *cyp*51A em isolados de *A. fumigatus.*

- Realizar a genotipagem de isolados de *A. fumigatus* para avaliação de possível identidade entre isolados sequenciais de um mesmo paciente, entre isolados de pacientes diferentes e entre isolados de pacientes e isolados ambientais.

- Consultar, se necessário, os prontuários dos pacientes que apresentarem isolados resistentes, identificando as possíveis doenças de base, fatores de risco, infecções

concomitantes e outros tratamentos que possam ter favorecido as infecções por *A. fumigatus*.

3. Material e Métodos

3.1. Local de trabalho

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação em Fungos (LIF) do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM-Unicamp), no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (Lemdi) da Disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM-Unicamp) e no Laboratório de Micologia – Bloco 17 do *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) – Atlanta – Geórgia – USA.

Considerações éticas: o projeto deste estudo foi encaminhado em 2014 ao Comitê de Ética em Pesquisa por meio da Plataforma Brasil, tendo seu parecer aprovado no mesmo ano (CAAE: 35629514.9.0000.5404/ Número do Parecer: 1.108.528).

3.2. Isolados clínicos

3.2.1. Seleção dos micro-organismos para estudo

Para a realização desse trabalho, 234 isolados clínicos de *Aspergillus* spp. mantidos na Micoteca do LIF, previamente isolados de 92 pacientes a partir dos exames de rotina foram selecionados para serem reativados. Os isolados clínicos são provenientes de pacientes atendidos no HC-Unicamp no período de 1998 a 2013 e estavam armazenados pelo método de Castellani (180) sendo conservados à temperatura ambiente em frascos de vidro contendo água destilada estéril. No Apêndice 1 os isolados selecionados para o presente estudo podem ser visualizados e estão ordenados por paciente e seus respectivos números LIF de identificação. Os isolados considerados puros e viáveis foram estudados.

3.2.2. Reativação dos isolados clínicos

Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (ASD; Difco, Sparks, Maryland, EUA, Sparks, Maryland, EUA) e mantidos a temperatura ambiente para avaliação de viabilidade e pureza. A identificação até gênero foi realizada no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia, da Divisão de Patologia Clínica-HC-Unicamp a partir de metodologia clássica, utilizando a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas.

3.2.3. Identificação

A identificação do gênero e das espécies foi confirmada utilizando metodologia clássica de visualização de características morfológicas (28) e metodologia molecular de sequenciamento de DNA (96), item 3.5.

3.3. Isolados ambientais

A análise dos isolados ambientais buscou um maior entendimento da frequência das espécies de *Aspergillus* isoladas no ar, o perfil de suscetibilidade dos isolados ambientais da principal espécie do gênero, a espécie *A. fumigatus,* bem como o estudo de suas características moleculares em relação ao gene *cyp*51A.

3.3.1. Coleta de ar

Foi realizada uma coleta em cada uma das estações do ano 2015. Para a realização das coletas, foram utilizados equipamentos coletores de ar Bio Samp modelo MBS 1000D (Yotsubishi Corp, Japão). Os equipamentos possuem a capacidade de aspirar ar em volume pré-determinado, fazendo com que ocorra a impregnação de partículas em suspensão diretamente sobre o meio de cultura em placa de Petri. O meio de cultura utilizado foi o ASD, suplementado com cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA 0,05 g/L). Após a captação das amostras de ar, as placas foram incubadas a

temperatura de 37°C por 5 dias e o crescimento de colônias de fungos foi acompanhado diariamente. As colônias obtidas a partir das placas originais foram repicadas em tubos contendo ASD para posterior identificação. O volume de ar aspirado foi de 1000 L para a unidade de TMO (ambiente de ar controlado com filtros Hepa) e 500L para o Setor de Hematologia.

3.3.2. Locais de coleta

As coletas de ar foram realizadas nos quartos dos pacientes da unidade de TMO e nos quartos do Setor de Hematologia. Para cada quarto, a coleta de ar foi realizada em 4 pontos, dispostos da seguinte maneira: 1) próximo à entrada do quarto; 2) próximo à janela ou saída de ar condicionado (quando houvesse); 3) meio do quarto e 4) no banheiro. Além dos quartos das unidades, ar foi coletado nos corredores das unidades em frente aos mesmos.

3.3.3. Identificação dos isolados ambientais

A identificação dos isolados ambientais obtidos foi realizada conforme item 3.2.3.

3.3.4. Análise estatística

Foi feita a análise estatística buscando comparar a contagem dos fungos entre as estações do ano e unidade do tratamento. Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram calculadas as estatísticas descritivas das variáveis, com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo e mediana. Para comparação da contagem entre estações do ano e unidade de tratamento foi utilizada a ANOVA. Os dados foram transformados em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição normal. O nível de significância adotado para este estudo foi de 5% (181). Para análise estatística foram utilizados os seguintes programas computacionais: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.

3.4. Isolados provenientes de amostras de mucosa nasal

Simultaneamente às coletas de ar, coletas de mucosa nasal dos pacientes internados nos leitos da unidade de TMO e do setor de Hematologia foram realizadas para avaliação da possível colonização por espécies de *Aspergillus*. As coletas de *swab* foram feitas por profissionais da enfermagem e as amostras identificadas na rotina do setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia, da Divisão de Patologia Clínica do HC-Unicamp. Os pacientes que concordaram com a coleta de *swab* assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que pode ser visualizado no Anexo 1.

3.4.1. Identificação dos isolados ambientais

Ocorrendo o isolamento de *Aspergillus* spp., os mesmos eram encaminhados ao LIF para a realização dos testes morfológicos de identificação, previstos no item 3.2.3.

3.5. Sequenciamento de DNA

A reação de sequenciamento foi realizada para identificação das espécies de isolados ambientais, isolados clínicos e isolados obtidos de amostras de mucosa nasal utilizados no presente estudo. Foi realizado o sequenciamento de regiões ITS para obtenção da identificação em nível de espécie-complexo. Além da região ITS, foi realizada a identificação da espécie dentro de cada complexo por meio do sequenciamento da região do gene da *β*-tubulina (96, 102). Para os isolados ambientais foi realizado apenas o sequenciamento do gene da *β*-tubulina.

3.5.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído dos isolados de *Aspergillus* spp. com 48 horas de crescimento em tubos contendo ASD. Para extração de DNA foi utilizado o DNAeasy Tissue® Kit (Qiagen Sciences, Maryland USA) e o QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen) sendo seguidas as instruções do fabricante.

3.5.2. Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizados os iniciadores das regiões ITS4/5 e *β*-tubulina 2A e B conforme quadro 1, para amplificar os fragmentos de DNA a partir dos isolados ambientais e clínicos de *Aspergillus* spp., de acordo com a literatura (96, 102, 182, 183). As PCR foram realizadas em um tubo de 200µL, contendo 12,5µL de PCR Master Mix (Promega,Fitchburg, WI EUA), 10 mM de cada iniciador, 100 ng de DNA e água milli-Q para um volume final de 25 µL.

Quadro 1: Sequências de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de DNA para identificação molecular de *Aspergillus* spp.

Iniciador	Sequência de bases
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
Iniciador	**Sequência de bases**
β-tubulina 2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT
β-tubulina 2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC

As PCR foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os parâmetros das reações de PCR estão expostos no quadro 2.

Quadro 2: Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação de DNA das regiões ITS4/5 e *β*-tubulina2A/2B

Reação de PCR ITS4/5			
Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	40
Anelamento	56	30 s	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	5 min	1
Refrigeração	4	∞	
Reação de PCR β-tubulina2A/2B			
Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	40
Anelamento	58	30 s	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	5 min	1
Refrigeração	4	∞	

3.5.3. Purificação dos produtos de PCR

Os amplicons resultantes da PCR foram purificados enzimaticamente com a utilização do reagente ExoSAP-IT (USB®Corporation, Cleveland, OH, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.4. Reação de sequenciamento

Os produtos das PCR foram sequenciados com a utilização dos iniciadores *foward* e *reverse* utilizando o Big DyeTM 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 µL de Big Dye Terminator, 1 µL de tampão, 1 µL do iniciador *foward* ou *reverse* (cada primer em tubo diferente) a 1,6 mM, 2 µL do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10 µL.

A reação de sequenciamento consistiu de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A reação

de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.5.5. Precipitação e lavagem do DNA com etanol

Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por precipitação e lavagem com etanol. Na primeira etapa, em cada amostra, foram adicionados 5 µL de EDTA (125mM) e 60 µL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 9447.1 g (13.000 rpm), a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 60 µL de etanol 70% às amostras que foram então centrifugadas a 9447.1 g (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 10 µL de formamida HI-DITM (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 sequenciador. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI Prism®3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise das sequências obtidas foi realizada no programa Geneious 10.0.9 ® (Biomatters Ltd 2017) e as mesmas foram comparadas com as sequências disponíveis no GeneBank.

3.6. Testes de suscetibilidade *in vitro* - microdiluição em caldo

Os testes de suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos foram realizados para todos os isolados clínicos. Foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo (item 3.6.2), conforme o documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) (140) e para os isolados ambientais foi utilizada uma metodologia de triagem de resistência, desenvolvida *in house* (item 3.6.5)

3.6.1. Meio de cultura

Para os testes de suscetibilidade 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).

3.6.2. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração efetiva mínima

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos foi realizada de acordo com o documento M38-A2 do CLSI, pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração efetiva mínima (CEM). Os antifúngicos avaliados foram AMB (faixa de concentração 0,03-16 mgL^{-1}); ITZ (0,015-8 mgL^{-1}) VRZ (0,015-8 mgL^{-1}) e posaconazol (PSZ; 0,015-8 mgL^{-}) para determinação da CIM e micafungina (MCF; 0,015-16 mgL^{-1}) e caspofungina (CPF; 0,015-8 mgL^{-1}) para determinação da CEM.

3.6.2.1. Inóculo

Após o crescimento fúngico de 48 a 72 horas a temperatura ambiente (25 ºC), em tubos contendo o meio de cultura ASD, o inóculo foi preparado adicionando-se 5 mL de solução de salina 0,85% a um tubo de ensaio onde foi adicionado o micro-organismo. A partir desta suspensão, foi realizada a contagem dos conídios no retículo central de uma câmara de Neubauer. O objetivo foi a obtenção de uma suspensão com inóculo de concentração de 0,5 a 2,5x 10^5 UFC/mL.

3.6.2.2. Preparação das placas de microdiluição

Os testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos foram realizados com a utilização de placa de microdiluição pré-preparadas (*dry plates)* (Eiken Chemical Co.,

Tokyo, Japan). Nesse método, os agentes antifúngicos, em diluições seriadas, estão adsorvidos na base dos poços da placa de 96 poços. Duas colunas de poços não contêm antifúngicos e nessas colunas são dispostos os controles de qualidade positivo (contendo apenas o inóculo no meio de cultura RPMI) e negativo (contendo apenas o meio de cultura RPMI). Para os testes, foram adicionados 100 µL do meio de cultura RPMI contendo o inóculo na concentração final de 0,5 – 2,5 x 10^4 UFC/mL, inclusive na coluna do controle positivo (11ª coluna). Na coluna do controle negativo (12ª) são adicionados 100 µL de RPMI. Foram avaliados AMB, VRZ e ITZ e MCF. Os antifúngicos CPF e PSZ não fazem parte da grade de antifúngicos da *dry plate*. Desta forma, os testes para esses compostos foram preparados conforme item 3.6.2.2.1.

3.6.2.2.1. Concentração inibitória mínima de posaconazol e concentração efetiva mínima de caspofungina

Os antifúngicos PSZ e CPF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram preparados de acordo com a ficha de especificação do fabricante ajustando-se na concentração desejada.

Para preparação da solução estoque dos antifúngicos PSZ e CPF foi pesada uma quantidade para que após corrigida a pureza, se obtivesse 12,8 mg de cada antifúngico. Os mesmos foram dissolvidos em dimetilsulfoxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e água destilada, respectivamente (solução-mãe de 12.800 µg/mL). A solução foi armazenada em micro tubos de polipropileno com tampa, mantidos a -20ºC por até 6 meses. As concentrações desejadas foram obtidas a partir da solução mãe e DMSO foi utilizado como diluente.

O teste foi realizado em placas de microtitulação, com fundo em "U" (estéril), para onde foram transferidos todos os componentes preparados anteriormente da seguinte

forma: 20 µL do antifúngico diluído nas diferentes concentrações até a 10ª coluna; 160 µL do meio de RPMI 1640 em todas as fileiras e mais 20 µL 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 200 µL, resultando em uma concentração final do inóculo de 0,5 – 2,5 x 10^4 UFC/mL. A faixa de concentração utilizada para PSZ foi de 0,015-8 mgL^{-1} e para CPF foi 0,015- 8mgL^{-1}. O antifúngico PSZ foi testado apenas em isolados clínicos que apresentaram valores elevados de CIM aos outros antifúngicos azólicos e seus respectivos isolados sequenciais.

3.6.2.3. Leitura da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Efetiva Mínima

As placas foram incubadas na temperatura de 35°C, sendo a leitura da CIM realizada após 48 horas de incubação para AMB, ITZ, VRZ e PSZ (100% de inibição de crescimento em relação ao controle positivo) e 24 horas para a leitura de CEM das equinocadinas CPF e MCF. A leitura foi realizada comparando-se o crescimento fúngico de cada poço com o do controle positivo de acordo com o CLSI-M38-A2 (140), com o auxílio de um espelho reverso de leitura, que amplifica a imagem (Figura 3).

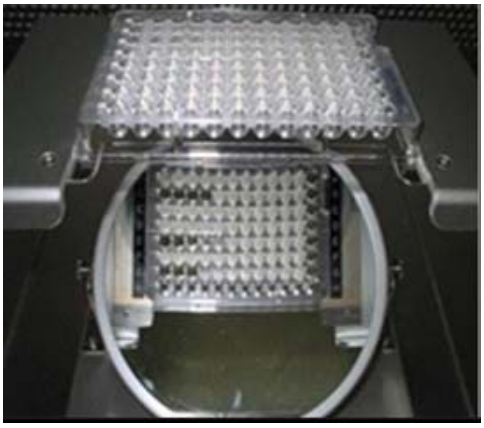


Figura 3: Placa de microtitulação sobre suporte com espelho reverso para leitura dos testes de suscetibilidade *in vitro.*

Para a leitura da CIM crescimento dos micro-organismos estudados foi numericamente determinado, de acordo com os seguintes critérios:

- escore 4: quando não houve nenhuma redução no crescimento, ou seja 100% de crescimento e 0 % de inibição do crescimento;

- escore 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;

- escore 2: quando houve significante redução no crescimento, isto é 50% de crescimento em comparação com o controle positivo do teste e 50% de inibição de crescimento;

- escore 1: quando ocorreu 20% de crescimento e 80% de inibição de crescimento em comparação ao crescimento obtido no controle positivo;

- escore 0 (zero): para ausência de crescimento visível ou seja, 100% de inibição de crescimento em relação ao controle positivo.

A leitura da CEM para as equinocandinas é realizada pela observação de mudanças morfológicas obtidas após exposição ao fármaco. A CEM é determinada pelo valor da concentração contida no poço onde ocorrem essas alterações morfológicas. As hifas mudam de morfologia em relação ao controle positivo, adquirindo formato com aspecto “granulado” (Figura 4), ou seja, a CEM é a mais baixa concentração de equinocandina em que é possível observar hifas anormais curtas e ramificadas em contraste com hifas longas não ramificadas (controle positivo de crescimento nos poços sem antifúngico).

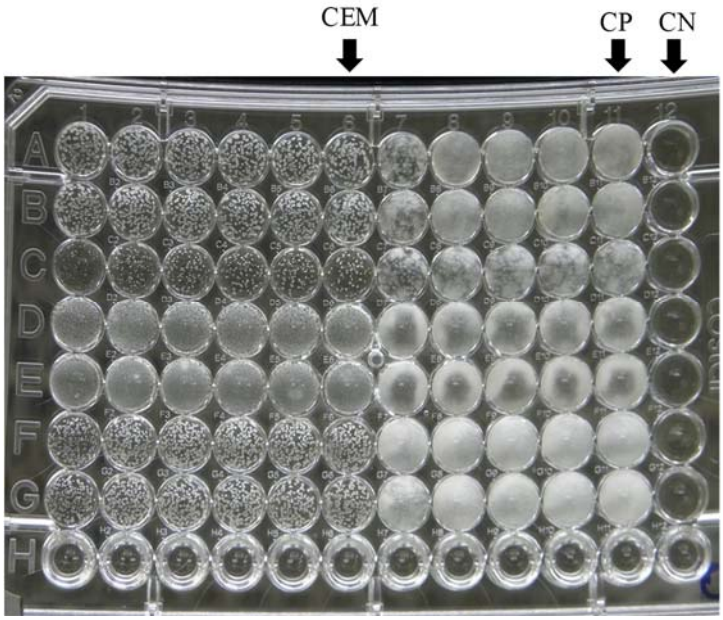


Figura 4: Leitura visual da concentração efetiva mínima (CEM). Na imagem, a leitura dos valores de CEM das sete amostras avaliadas frente ao antifúngico caspofungina (linhas A-G) foi realizada na coluna 6 (0,5 mgL^{-1}). CP: controle positivo, CN: controle negativo.

3.6.3. Controle de qualidade

Para validação dos testes com antifúngicos, foram utilizadas as cepas padrão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 e *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305. Para cada diluição de antifúngicos realizou-se o teste de suscetibilidade com as cepas ATCC, tendo seus resultados de CIM e CEM comparados com os valores estabelecidos pelo CLSI (exceto para o isolado de *A. fumigatus*, cujos valores não são padronizados pelo CLSI). Não havendo concordância com os valores estabelecidos, a diluição de antifúngicos foi desprezada preparando-se uma nova diluição até que esta estivesse de acordo com os parâmetros estabelecidos.

3.6.4. Ponto de corte epidemiológico

Os valores de PCE foram determinados para os antifúngicos AMB, ITZ e VRZ através do cálculo da moda, conforme descrito na literatura (157, 179, 184).

3.6.5. Triagem de resistência

Os isolados ambientais *A. fumigatus*, foram semeados em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton suplementado com 2% de dextrose, às quais foram incorporados os antifúngicos azólicos: ITZ (1mgL^{-1}), VRZ (2 mgL^{-1}) e PSZ (0,5 mgL^{-1}). Foi utilizada uma placa sem adição de antifúngico como controle de crescimento.

3.6.5.1. Inóculo para o teste de Triagem de resistência

Após o crescimento fúngico de 48 horas a 35°C em tubos contendo ágar batata (PDA; Difco, Sparks, Maryland, EUA) o inóculo foi preparado com a utilização de *swab* úmido estéril para realizar movimentos circulares delicados sobre o crescimento fúngico, a fim da obtenção somente de conídios. O *swab* contendo os conídios foi mergulhado em um tubo contendo 5mL de solução salina a 0,85%. A concentração do inóculo final foi de 5,5 x 10^4 -2 x 10^5 UFC/mL. Para os testes, 20µL de suspensão contendo o inóculo foram adicionados à superfície das placas contendo o antifúngico diluído em ágar e no controle positivo, sem a presença de antifúngicos, para confirmar a viabilidade dos micro-organismos.

3.6.5.2. Leitura do teste de triagem

A leitura do teste de triagem foi feita após 48h de incubação das placas a 35ºC. Todos os isolados capazes de crescer no teste foram submetidos ao teste de microdiluição de caldo, item 3.6.2.

3.6.5.3. Controle de Qualidade do teste de triagem

As cepas padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 e *A. flavus* ATCC 204304 foram incluídos como controles de qualidade em cada teste.

3.7. Sequenciamento de DNA do gene *cyp*51A

Essa metodologia é utilizada para o sequenciamento de DNA do gene *cyp*51A em *Aspergillus fumigatus,* sendo adequada para determinar se a região promotora e a região codificante do gene *cyp*51A possuem mutações que podem conferir resistência a agentes antifúngicos da classe dos azólicos (149, 185).

O sequenciamento do gene *cyp*51A foi realizado para todos os isolados clínicos com elevados valores de CIM frente aos azólicos VRZ (≥ 4 mg L^{-1}) e ITZ (≥ 2 mg L^{-1}) e para os respectivos isolados sequenciais dos mesmos pacientes. Todos os isolados ambientais de *A. fumigatus* e aqueles obtidos das culturas de *swabs* nasais também foram submetidos ao sequenciamento do gene *cyp*51A. Para os *A. fumigatus* ambientais, o gene *cyp*51A foi estudado em toda a coleção como parte do doutorado sanduíche realizado no CDC pelo Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior com bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PDSE-CAPES).

3.7.1. Protocolo de reação em cadeia da polimerase

A amplificação do DNA extraído (conforme item 3.5.1) foi realizada por PCR, na qual foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores CYP51A *Foward* (5'-GGCTGGAGATACTATGGCTTTC-3') e CYP51A *Reverse* (5'-GTATAATACACCTATTCCGATCACACC-3'). A PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo água (19,5 µL), tampão de PCR 10x (Roche) (2,5 µL), dNTPs (Roche) (0,25 µL), 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 para amplificação do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus*

Reação de PCR *cyp*51A			
Parâmetro	Temperatura (ºC)	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	1
Refrigeração	4	∞	

3.7.2. Purificação dos produtos de PCR

Os *amplicons* resultantes da reação de PCR foram purificados enzimaticamente com a utilização do reagente ExoSAP-IT (USB®Corporation, Cleveland, OH, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.7.3. Reação de Sequenciamento

Após a amplificação, foi realizado sequenciamento do produto de PCR com 4 pares de oligonucleotídeos iniciadores. As sequências de cada um dos iniciadores utilizados estão expostas no quadro 4.

Quadro 4: Sequência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de sequenciamento do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus*

Iniciador	Sequência de bases (5' - 3')
AF1P1F	GCATTCTGAAACACGTGCGT
AF1P1R	TTGAGCAAGATTGCCGTCAG
AF2P1F	TACATGGCCGTTGCGGTGCT
AF2PIR	CCTTGAAAGTTCGGTGAATC
AF3PIF	TGTGCCACTTATTGAGAAGG
AF3P1R	CACGAATAACATGTTGATGG
AF4PIF	CTCCGCTCCAGTACAAGGAT
AF4P1R	GATGGTTACAACAGTCTCAC

O sequenciamento foi realizado em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo água (13 µL), Big Dye buffer 5X (2 µL), Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems; 2 µL) e um primer por tubo (1 µL), na concentração de 3.2 µM e 2

µL do produto de PCR purificado. Os parâmetros da reação de sequenciamento estão descritos no quadro 5.

Quadro 5: Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus*

Reação de sequencianento			
Parâmetros	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	10 s	25
Anelamento	50	5 s	
Extensão	60	4 min	
Refrigeração	4	∞	

3.7.4. Precipitação e lavagem com etanol

Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por precipitação e lavagem com etanol conforme item 3.5.5. 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 *cyp*51A. A análise das sequências obtidas foi realizada no programa Geneious 10.0.9 ® (Biomatters Ltd 2017) e as sequências obtidas foram comparadas com a sequência do isolado suscetível *Wild Type*, disponível no GeneBank (número de acesso AF338659).

3.8. Protocolo para Microssatelites de *Aspergillus fumigatus*

3.8.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do DNA extraído (conforme item 3.5.1) foi realizada por PCR. Os marcadores utilizados para tipagem dos isolados de *Aspergillus fumigatus* foram: STRAf-2A, STRAf-2B, STRAf-3A, STRAf-3B, STRAf-4A, STRAf-4B, BDA, BDB, BDC e BDD (56, 119, 172). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR estão expostas no quadro 6. A fluorescência de cada par de iniciadores foi ligada ao 5’ da sequência *foward.*

Quadro 6: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de microssatelites de *Aspergillus fumigatus*

Oligonucleotídeos iniciadores para análise de microssatelites de *A. fumigatus*		
Iniciador	**Sequência (5'- 3')**	**Marcador**
Straf-2A	F: AA GGG TTA TGG CCA TTA GGG R: GAC CTC CAG GCA AAA TGA GA	FAM
Straf-2B	F: TA TTG GAT CTG CTC CCA AGC R: GAG ATC ATG CCC AAG GAT GT	HEX
Straf-3A	F: GC TTC GTA GAG CGG AAT CAC R: GTA CCG CTG CAA AGG ACA GT	FAM
Straf-3B	F: CA ACT TGG TGT CAG CGA AGA R: GAG GTA CCA CAA CAC AGC ACA	HEX
Straf-4A	F: TT GTTT GGC CGC TTT TAC TTC R: GAC CCA GCG CCT ATA AAT CA	FAM
Straf-4B	F: CG TAG TGA CCT GAG CCT TCA R: GGA AGG CTG TAC CGT CAA TCT	HEX
BDA	F: GC CTA CGA TGA CCG AAA TGA R: CTG TTT TGA GAA GCG GAT GG	FAM
BDB	F: TT GCC ATC GCT TGT CAT AGA R: GCA GGT GGT TCA ATA GGA CAG	HEX
BDC	F: CG AAC TCT CCC CTG CAA ATC R: GAT GCC GCT GGT GGT GTT GT	FAM
BDD	F: AG GGA TAC GGC TAC GGA CAA R: AAA GCG TCT GTC AGC GTG TCT	HEX

A PCR foi realizada em um volume final de 25µL e a reação foi realizada conforme quadro 7.

Quadro 7: Reagentes para a reação de PCR para a técnica de microssatélites de *Aspergillus fumigatus*

Reação de PCR - Microssatélites	
Reagentes	**Quantidade por reação (µL)**
H2O	18.875
10X Buffer Roche	2.5
DMSO	0.75
dNTPs	0.25
Iniciador *forward* (20 mM)	0.25
Iniciador *reverse* (20 mM)	0.25
Roche TaqPolimerase	0.125
DNA	2

As 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 8.

Quadro 8: Parâmetros da PCR para a técnica de microssatélites de *Aspergillus fumigatus*

Reação PCR para técnica de Microssatélites			
Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min	1x
Desnaturação	94	30 s	
Anelamento	60	30 s	16X
Extensão	72	1 min	
Desnaturação	94	30 s	
Anelamento	52	30 s	18x
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	2 min	1X
Regrigeração	4	∞	

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 100 v por 30 minutos. Para a corrida, utilizou-se 5 µL do produto de PCR e 1 µL de corante azul *loading dye*. Após amplificação, o DNA de cada amostra foi unido com o seu respectivo *locus,* num volume final de 10 µL (5 µL de cada produto de reação), por exemplo: 2A+2B; 3A+3B; 4A+4B; BDA+BDB; BCD+BDD.

Depois de misturadas, as amostras foram adicionadas a um mix pré-preparado. O mix é preparado com 9 µL de HI-DITM (Applied Biosystems, Warrington, UK) e 0,5µL de GeneScan™ 500 ROX™. O mix foi aplicado nos poços da placa de 96 poços e então 0,5 µL de cada amostra de DNA foi adicionada. A placa foi então incubada a 96 ºC por 3 minutos. Em seguida, a placa contendo as amostras foi colocada em gelo por dois minutos. Após essas etapas, a placa está pronta para ser levada ao sequenciador. A análise dos picos de fragmentos obtidos foi realizada no programa Peak Scanner™ (*Software* v1.0 - Thermo Fisher Scientific). Os resultados foram avaliados com a utilização da ferramenta e-Burst V3 Imperial College London 2017.

3.9. Análise de prontuários

Para os pacientes com isolados clínicos de *A. fumigatus* que foram considerados resistentes, foi feita consulta dos prontuários. Foram identificadas as possíveis doenças

de base, fatores de risco, infecções concomitantes, outros tratamentos que possam ter favorecido as infecções por *A. fumigatus* (ficha de consulta no Anexo 2).

4. Resultados

4.1. Isolados clínicos

Dos 234 isolados armazenados por até 15 anos, foi possível a reativação de 229 isolados e a identificação de 11 diferentes espécies de *Aspergillus*: *A. fumigatus* (n=170, 74%); *A. flavus* (n=27, 12%); *A. terreus* (n=11); *A. niger* (n=8); *Aspergillus tubingensis* (n=2); *Aspergillus parasiticus* (n=3); *Aspergillus clavatus* (n=2); *A. nidulans* (n=2); *Aspergillus sydowii* (n=2); *Aspergillus ochraceus* (n=1); *Neosartorya hiratsukae* (estágio sexuado de reprodução; n=1). A identificação molecular da região ITS4/5 e β-tubulina 2A/2B pode ser visualizada no Apêndice 3. A espécie *A. fumigatus* representa 74% dos isolados estudados, sendo a segunda espécie mais comum a espécie *A. flavus*, representando 12% dos isolados.

4.2. Isolados ambientais

4.2.1. Coletas de ar

Durante o ano de 2015 foram obtidos e identificados (utilizando o gene da β-tubulina2A/2B, Apêndice 4) 123 *Aspergillus* spp., sendo 62 (50%) isolados de *A. fumigatus,* 24 isolados do complexo *A. niger* (*A. niger, Aspergillus japonicus, Aspergillus brasiliensis* e *A. tubingensis);* 22 isolados do complexo *A. flavus (A. flavus, Aspergillus arachidicola, A. parasiticus, Aspergillus chungii, Aspergillus sojae* e *Aspergillus oryzae);* oito do complexo *A. nidulans* (*A. nidulans, Aspergillus unguis* e *A. sydowii)* quatro *A. terreus;*; um isolado do complexo *A. ustus* e um do complexo *A. clavatus*, identificado como *Aspergillus clavatonanicus* e um isolado permaneceu como *Aspergillus* sp.. Setenta e cinco isolados foram obtidos na unidade de Hematologia, 16 na unidade de TMO e 32 isolados foram obtidos nos corredores das mesmas unidades, sendo estes também incluídos no presente trabalho.

Ao comparar as estações do ano quanto a contagem de UFC de fungos filamentosos em geral (Tabela 1), foi possível observar que, no inverno, a contagem de UFC foi significativamente menor (p=0.0348) do que nas demais estações do ano. Houve diferença significativa de UFC de fungos filamentosos entre Hematologia e TMO, sendo na Hematologia maior do que na unidade TMO (p<0.0001). A unidade de Hematologia não possui filtros de ar e era esperado que uma contagem maior fosse observada nessa unidade em todas as estações. Ao avaliar a contagem de *Aspergillus* spp. obtida em cada unidade por estação, não houve diferença significativa (Hematologia: p =0.0671; TMO: p = 0.1752). Ao analisar cada unidade quanto a variedade de espécies de *Aspergillus,* também não foi observada diferença significativa em cada estação (Hematologia: p=0.3070; TMO: p= 0.7674).

Tabela 1: Contagem de unidades formadoras de colônias de fungos obtidas em cada coleta de ar nas unidades de Transplante de Medula Óssea e Hematologia

Unidade	Estação	Tmin/ UR	T max e UR	Contagem FF	Contagem de *Aspergillus*
TMO	Verão	18°C/71,6%	28,8°C/64,2%	16	0
	Outono	18,6°C/78%	29,5°C/45%	11	9
	Inverno	9,8°C/82%	23,5°C/34%	3	1
	Primavera	21°C/73%	34°C/36%	24	6
Unidade	**Estação**	Tmin/ UR	T max e UR	**Contagem FF**	**Contagem de *Aspergillus***
Hematologia	Verão	18°C/71,6%	28,8°C/64,2%	289	18
	Outono	18,6°C/78%	29,5°C/45%	198	20
	Inverno	9,8°C/82%	23,5°C/34%	119	5
	Primavera	21°C/73%	34°C/36%	115	32

TMO: Unidade de Transplante de medula óssea; Tmin/ UR: Temperatura mínima e umidade relativa; T max e UR: temperatura máxima e umidade relativa; FF: fungos filamentosos

4.2.2. Coletas de *swab* nasal

Foi realizada a coleta de 35 *swab*s de mucosa nasal de 31 pacientes que ocupavam os leitos dos quartos de onde foram realizadas as coletas de ar ao longo do ano de 2015. Uma única cultura de um paciente da unidade de TMO foi positiva para *Aspergillus* sp. (LIF 2536). O paciente tinha leucemia mieloide aguda como doença de base. Durante o

período das coletas, um paciente da unidade de Hematologia, que teve três *swab*s colhidos, com resultados negativos, apresentou uma cultura de lavado brônquico positiva para *Aspergillus* sp. (LIF 2471). Ambos os isolados (LIF 2536 e LIF 2471) foram identificados como sendo *A. fumigatus* por testes morfológicos e sequenciamento de DNA.

4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração efetiva mínima (CEM)

Na Tabela 2 é possível visualizar os intervalos de CIM e CEM obtidos de 228 *Aspergillus* spp. (um *A. fumigatus* não cresceu nos testes) clínicos avaliados frente aos antifúngicos AMB, ITZ, VRZ, MCF, CPF (186). No Apêndice 6 é possível a visualização de todos os resultados de CIM e CEM obtidos para cada isolado clínico.

Tabela 2: Intervalos de CIM e CEM obtidos contra *Aspergillus* spp. clínicos e cepas padrão frente a 5 antifúngicos

	CIM/CEM (mg L^{-1})						
Aspergillus **(n)**	**Parâmetro**	**AMB**	**ITZ**	**VRZ**	**Parâmetro**	**MCF 24hs**	**CPF 24 hs**
A. fumigatus (169)	intervalo de CIM	0,25 - 8	0,25 - 4	0,25 - 8	intervalo de CEM	≤0,015 - 0,03	0,06 - 0,5
	CIM_{50}	1	1	1	CEM_{50}	≤0,015	0,25
	CIM_{90}	2	1	2	CEM_{90}	0,03	0,25
A. flavus (27)	intervalo de CIM	1 - 4	0,125 - 1	0,5 - 2	intervalo de CIM	≤0,015 - 0,06	0,125 - 0,5
	CIM_{50}	2	0,5	1	CEM_{50}	0,03	0,5
	CIM_{90}	4	0,5	1	CEM_{90}	0,06	0,5
A. parasiticus (3)	intervalo de CIM	2 - > 16	0,25 - 0,5	1 - 2	intervalo de CEM	0,03	0,25 - 0,5
	CIM_{50}	8	0,5	1	CEM_{50}	0,03	0,25
	CIM_{90}	> 16	0,5	2	CEM_{90}	0,03	0,5
A. terreus (11)	intervalo de CIM	2 - > 16	0,25 - 2	0,5 - 2	intervalo de CEM	≤0,015	0,25
	CIM_{50}	2	1	2	CEM_{50}	≤0,015	0,25
	CIM_{90}	> 16	1	4	CEM_{90}	≤0,015	0,25
A. niger (8)	intervalo de CIM	0,5 - 1	1 - 4	1 - 2	intervalo de CEM	≤0,015	0,25
	CIM_{50}	0,5	1	2	CEM_{50}	≤0,015	0,25
	CIM_{90}	1	2	2	CEM_{90}	≤0,015	0,25
A. tubingensis (2)	CIM	0,5 - 1	0,5 - 2	1 - 4	CEM	≤0,015	0,25
A. clavatus (2)	CIM	0,25-1,0	1,0-2,0	2	CEM	≤0,015-0,03	0,5-1,0
A. nidulans (2)	CIM	2,0-4,0	0,5-1,0	0,25-1,0	CEM	≤0,015-0,03	0,125-0,5
A. sydowii (2)	CIM	1,0-4,0	1,0-2,0	1,0-2,0	CEM	≤0,015	0,06-0,25
A. ochraceus (1)	CIM	4	1	0,5	CEM	≤0,015	0,5
Neosartorya hiratsukae (1)	CIM	1	1	1	CEM	≤0,015	0,25
	CIM/CEM (mg L^{-1})						
Cepas de Referência	**Parâmetro**	**AMB**	**ITZ**	**VRZ**	**Parâmetro**	**MCF 24hs**	**CPF 24 hs**
Candida parapsilosis ATCC 22019	CIM	1,0	0,125	0,03	CEM	0,5	1
Candida krusei ATCC 6258	CIM	1,0	0,125	0,25	CEM	0,06	1
Aspergillus flavus ATCC 204304	CIM	2,0	0,5	0,5	CEM	≤0,015	0,25

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; CIM50/CIM90: concentração inibitória mínima capaz de inibir 50 e 90% dos isolados; CEM: concentração efetiva mínima; MCF: micafungina; CPF: caspofungina; CEM50/CEM90: concentração efetiva mínima capaz de inibir 50 e 90% dos isolados

Na Tabela 3 é possível a visualização da distribuição do número de isolados em cada valor de concentração para cada antifúngico. Os PCE para cada antifúngico estão destacados com um (*) na tabela.

Tabela 3: Distribuição do número de *Aspergillus* spp. em cada concentração inibitória mínima (CIM) em mgL^{-1} dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e voriconazol

Espécie de *Aspergillus* (n)	Agente antifúngico	Distribuição de CIMs (mg L^{-1})							
		0,13	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**
A. fumigatus (169)	AMB		1	15	106*	42	3	2	
	ITZ		1	79	86*	2	1		
	VRZ		1	38	90*	31	7	2	
A. flavus (27)	AMB				5	16*	6		
	ITZ	2	6	17*	2				
	VRZ			13*	13	1			
A. terreus (11)	AMB					8*	1		2
	ITZ			2	9*				
	VRZ			1	1	5*	4		
A. niger (8)	AMB			6*	2				
	ITZ				5*	2	1		
	VRZ				3	5*			

CIM: concentração inbitória mínima; *Ponto de corte epidemiológico (PCEs) para cada antifúngico na amostra; AMB: afotericina B; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol

Entre os 169 isolados de *A. fumigatus* (um isolado não cresceu nos testes), 3 (1,8%) apresentaram valores de CIM para ITZ acima do PCE, e 40 (24%) apresentaram valores de CIM para VRZ acima do PCE. Para a AMB, 47 isolados de 33 pacientes apresentaram CIMs ≥ 2 mg L^{-1}. O PCE para AMB foi de 1 mg L^{-1} para *A. fumigatus* e o CIM_{50} e CIM_{90} foram 1,0 e 2,0 mg L^{-1}, respectivamente.

Excluindo a espécie *A. terreus* (n=11), que é naturalmente resistente à AMB, 75 (35%) isolados testados apresentaram CIM ≥ 2 mg L^{-1} para este fármaco. Para isolados de *A. flavus*, 22 de 27 (81%) apresentaram CIM ≥ 2 mg L^{-1} e, para isolados de *A. fumigatus*, 47 (28%) dos 169 isolados apresentaram CIM ≥ 2 mg L^{-1}. Isso equivale a 13 dos 15 pacientes (87%) com *A. flavus* e a 33 dos 76 pacientes (43%) com A. *fumigatus* com, ao menos, um isolado com CIM ≥ 2 mg L^{-1}.

4.4. Triagem de resistência

Todos *A. fumigatus* ambientais foram submetidos à triagem de resistência frente aos antifúngicos ITZ, VRZ e PSZ (Apêndice 7). Três isolados foram capazes de crescer

no teste de triagem do ITZ (Tabela 4). No entanto, seus respectivos valores de CIM foram 0,5 mgL^{-1}, e também não apresentaram mutações no gene *cyp*51A (apêndice 7).

Tabela 4: Resultados do teste de triagem e a CIM dos três isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus* que cresceram no meio contendo o antifúngico ITZ

	Teste de triagem de resistência			
LIF	ITZ $1mgL^{-1}$	CIM $ITZmgL^{-1}$	VRZ $2mgL^{-1}$	PSZ $0,5mgL^{-1}$
AF 9	C	0,5	SC	SC
AF 24	C	0,5	SC	SC
AF 25	C	0,5	SC	SC

CIM: concentração inibitória mínima; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol, PSZ: posaconazol; C: crescimento; SC: sem crescimento

4.5. Sequenciamento do gene *cyp*51A de *Aspergillus fumigatus*

Os pacientes com isolados que apresentaram elevados valores de CIM frente a algum dos azólicos (VRZ $\geq$ 4 mg L^{-1} e ITZ $\geq$ 2 mg L^{-1}) tiveram seus isolados e os respectivos isolados sequenciais estudados quanto a presença de mutação no gene *cyp*51A. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 5, onde estão os dez isolados que apresentaram valores elevados de CIM (em vermelho) a um dos azólicos VRZ e ITZ ou a ambos, além os valores de CIM obtidos frente ao composto PSZ.

Tabela 5: Substituições de aminoácidos obtidas com o sequenciamento do gene *cyp*51A de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* com elevados valores de CIM (em vermelho) frente aos antifúngicos azólicos e os respectivos isolados dos mesmos pacientes

		CIM (mg L^{-1})				Substituição de aminoácidos na proteína CYP51A						
LIF	**Paciente**	**AMB**	**ITZ**	**VRZ**	**PSZ**	**F46Y**	**M172V**	**N248T**	**D255E**	**E427K**	**TR34**	**TR46**
79	3	2	1	1	0,5	+	+	+	+	+	_	_
80		2	2	4	1	+	+	+	+	+	_	_
91	76	2	0,5	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
95		2	1	4	1	_	_	_	_	_	_	_
97		1	2	2	1	+	+	+	+	+	_	_
98		1	1	1	0,25	+	+	+	+	+	_	_
388	91	2	0,5	2	1	_	_	_	_	_	_	_
411		1	1	4	1	_	_	_	_	_	_	_
401	83	2	0,5	0,5	0,5	_	_	_	_	_	_	_
402		1	1	1	0,5	+	+	+	+	+	_	_
403		1	1	4	1	+	+	+	+	+	_	_
603	88	0,5	0,5	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
649		1	0,5	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
651		0,5	0,5	1	0,125	_	_	_	_	_	_	_
697		0,5	0,5	4	0,5	_	_	_	_	_	_	_
770	5	4	1	4	2	_	_	_	_	_	_	_
824	37	1	1	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
885		1	1	8	1	_	_	_	_	_	_	_
1169	22	0,5	1	4	0,5	_	_	_	_	_	_	_
1175		0,5	1	2	0,5	_	_	_	_	_	_	_
1546	65	1	1	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
1553		1	1	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
1569		2	1	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
1889		1	4	8	1	_	_	_	_	_	_	_

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; VRZ: voriconazol; ITZ: itraconazol; PSZ: posaconazol; (+): presença de mutação; (-): ausência de mutação

As substituições de aminoácidos encontradas (F46Y, M172V, N248T, D255E e E427K) não são associadas com o fenótipo de resistência aos antifúngicos azólicos. Não foram observadas mutações já associadas com resistência nos isolados clínicos com elevados valores de CIM.

Todos *A. fumigatus* ambientais e o isolado obtido da cultura de *swab* nasal (LIF 2536) e o isolado LIF2471 (obtido de amostra clínica de lavado brônquico de um paciente que estava na unidade de Hematologia durante o período das coletas de ar) foram estudados quanto a presença de mutações no gene *cyp*51A. Os resultados do sequenciamento podem ser visualizados no Apêndice 7 e os isolados que apresentaram alguma troca de aminoácido resultante de mutação de ponto estão expostos na Tabela 6.

Dos 62 isolados sequenciados, 12 apresentaram troca de aminoácidos derivadas de mutações de ponto. Da mesma forma que o conjunto de mutações F46Y, M172V, N248T, D255E e E427K, a troca de aminoácidos N248K, encontrada na maioria dos isolados ambientais, não está relacionada com resistência aos antifúngicos azólicos.

Tabela 6: Trocas de aminoácidos encontradas no sequenciamento do gene *cyp*51A dos *Aspergillus fumigatus* ambientais

	Troca de aminoácidos derivada das mutações de ponto						TR34	TR46
LIF	F46Y	M172V	N248T	D255E	E427K	N248K		
AF27	–	–	–	–	–	+	–	–
AF29	–	–	–	–	–	+	–	–
AF102	–	–	–	–	–	+	–	–
AF103	–	–	–	–	–	+	–	–
AF104	–	–	–	–	–	+	–	–
AF105	–	–	–	–	–	+	–	–
AF109	–	–	–	–	–	+	–	–
AF126	+	+	+	+	+	–	–	–
AF143	–	–	–	–	–	+	–	–
AF147	–	–	–	–	–	+	–	–
AF152	–	–	–	–	–	+	–	–
AF167	–	–	–	–	–	+	–	–

(+): presença de mutação; (-): ausência de mutação

Não foram observadas mutações associadas com resistência no gene *cyp*1A nos isolados sequenciados, nem mesmo nos *A. fumigatus* clínicos que apresentaram valores elevados de CIM frente a algum dos azólicos, o que sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos no fenótipo de resistência desses micro-organismos.

4.6. Análise de microssatélites de *Aspergillus fumigatus*

Os resultados de microssatélites obtidos com a utilização do *software* Peak Scanner estão expostos nos Apêndices 7 (isolados ambientais) e 8 (isolados clínicos). A Figura 5 foi obtida com a utilização da ferramenta e-Burst a partir dos resultados encontrados. A figura mostra 109 isolados clínicos de *A. fumigatus* de 36 pacientes que foram submetidos a metodologia de microssatélite (há mais de um isolado por paciente).

Na figura, é possível observar a relação entre isolados de um mesmo paciente e entre isolados de diferentes pacientes. A identificação dos pacientes na figura (P) corresponde a identificação obtida com a utilização ferramenta e-Burst (Apêndice 8). Genótipos relacionados são conectados por linhas: uma linha preta é equivalente a uma diferença de um *locus* e uma linha azul é equivalente a diferença de dois *locus.* O tamanho do círculo é proporcional ao número de isolados que compartilham o mesmo genótipo.

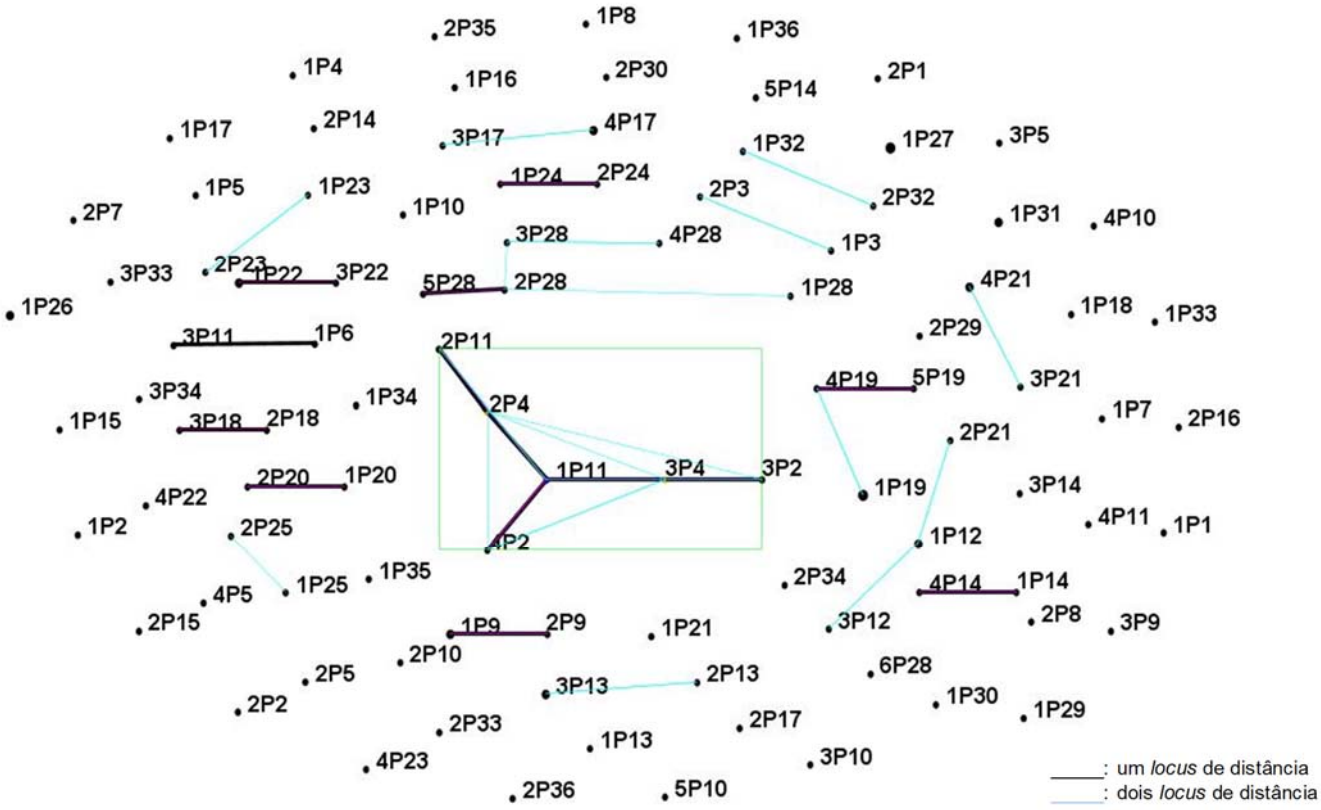
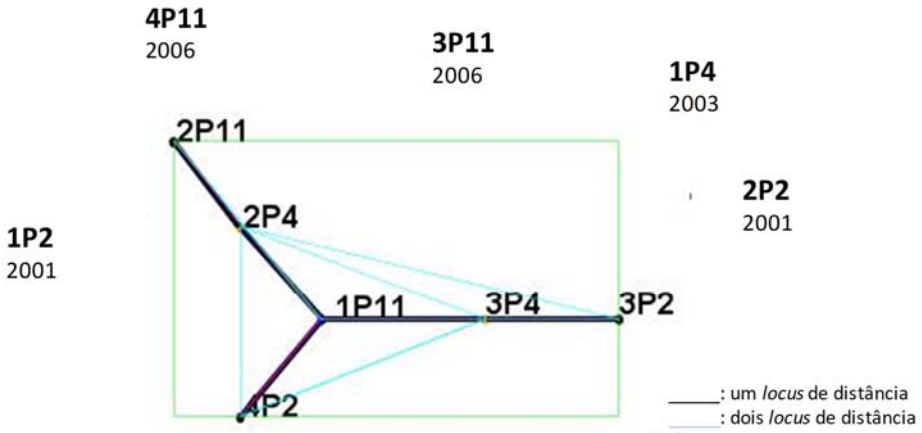


Figura 5: Relação genética de 109 isolados sequenciais de *Aspergillus fumigatus* obtidos de 36 pacientes.

Na Figura 6 está exposto (em separado) o complexo clonal envolvendo 6 *A. fumigatus,* obtidos de 3 pacientes: paciente 18 (P11), paciente 76 (P2) e paciente 83 (P4) hospitalizados de 2001 a 2006 e os demais isolados dos mesmos pacientes (fora do complexo clonal). A figura foi obtida com a utilização da ferramenta e-Burst. Interessante

destacar que todos os isolados pertencentes ao complexo clonal possuem as mesmas substituições de aminoácidos obtidas de mutações de ponto no gene *cyp*51A (Tabela 7).



3P2 e 4P2 – ano 2001
2P4, 3P4, 1P11 e 2P11 – ano 2003

Figura 6: Complexo clonal envolvendo seis isolados de *Aspergillus fumigatus*, coletados de três pacientes (P11=paciente 18, P2=paciente 76 e P4= paciente 83) hospitalizados de 2001 a 2006, obtido por análises realizadas no e-Burst.

Os pacientes 18 (P 11) e 83 (P4) estavam no hospital ao mesmo tempo, mas nunca no mesmo quarto. O paciente 83 (P4) era um fumante com doença pulmonar obstrutiva crônica com enfisema, que foi a óbito logo após o diagnóstico. O paciente 76 (P 2) apresentava leucemia mielóide crônica e recebeu AMB por alguns dias antes de falecer. O paciente teve dois isolados (2P2 e 1P2) que não fazem parte do complexo clonal, ou seja, são genótipos diferentes. O paciente 18 (P11) é portador da síndrome hiper-IgE. Esse paciente recebeu itraconazol, foi submetido à lobectomia do lobo superior esquerdo devido ao aspergiloma e continua sendo monitorado no HC-Unicamp. O paciente teve dois isolados em 2006 (4P11 e 3P11) que não fazem parte do complexo clonal.

Tabela 7: Resultados de CIM e do sequenciamento do gene *cyp*51A obtidos dos pacientes cujos *Aspergillus fumigatus* fazem parte de um complexo clonal (em vermelho)

					CIM (mgL^{-1})				Substituição de aminoácido na proteína CYP 51A						
E-burst ID	**P**	**LIF**	**Data**	**amostra clínica**	**AMB**	**ITZ**	**VRZ**	**PSZ**	**F46Y**	**M172V**	**N248T**	**D255E**	**E427K**	**TR34**	**TR46**
1P11	18	363	10/04/2003	Escarro	2	0,5	0,5	0,5	+	+	+	+	+	_	_
2P11		379	28/05/2003	Líquido pleural	2	1	1	0,25	+	+	+	+	+	_	_
3P11		769	09/01/2006	Escarro	0,5	0,5	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
4P11		900	11/08/2006	Escarro	1	1	2	0,25	NR	NR	NR	NR	NR	_	_
1P2	76	91	05/04/2001	Escarro	2	0,5	1	0,25	_	_	_	_	_	_	_
2P2		95	01/05/2001	Escarro	2	1	4	1	_	_	_	_	_	_	_
3P2		97	04/05/2001	Lavado brônquico	1	2	2	1	+	+	+	+	+	_	_
4P2		98	04/05/2001	fibrina	1	1	1	0,25	+	+	+	+	+	_	_
1P4	83	401	24/07/2003	Escarro	2	0,5	0,5	0,5	_	_	_	_	_	_	_
2P4		402	25/07/2003	Escarro	1	1	1	0,5	+	+	+	+	+	_	_
3P4		403	28/07/2003	Escarro	1	1	4	1	+	+	+	+	+	_	_

CIM: concentração inibitória mínima; P: paciente; AMB: anfotericina B; VRZ: voriconazol; ITZ: itraconazol; PSZ: posaconazol; (+): presença de mutação; (-): ausência de mutação; NR: não realizado

Na figura 7, é possível visualizar a relação genética entre os isolados ambientais, identificados com a letra "E" e seus correspondentes números de identificação. Os isolados ambientais demonstraram alta diversidade genética. Os isolados 102 e 105 são idênticos, sendo que apenas o E102 pode ser visto na figura, com círculo maior. Os isolados LIF 2536 (obtido da cultura de *swab* nasal) e LIF2471 (obtido de amostra clínica de lavado brônquico de um paciente que estava na unidade de Hematologia durante o período das coletas de ar) foram comparados com os isolados ambientais, mas nenhuma relação genética foi observada entre eles.

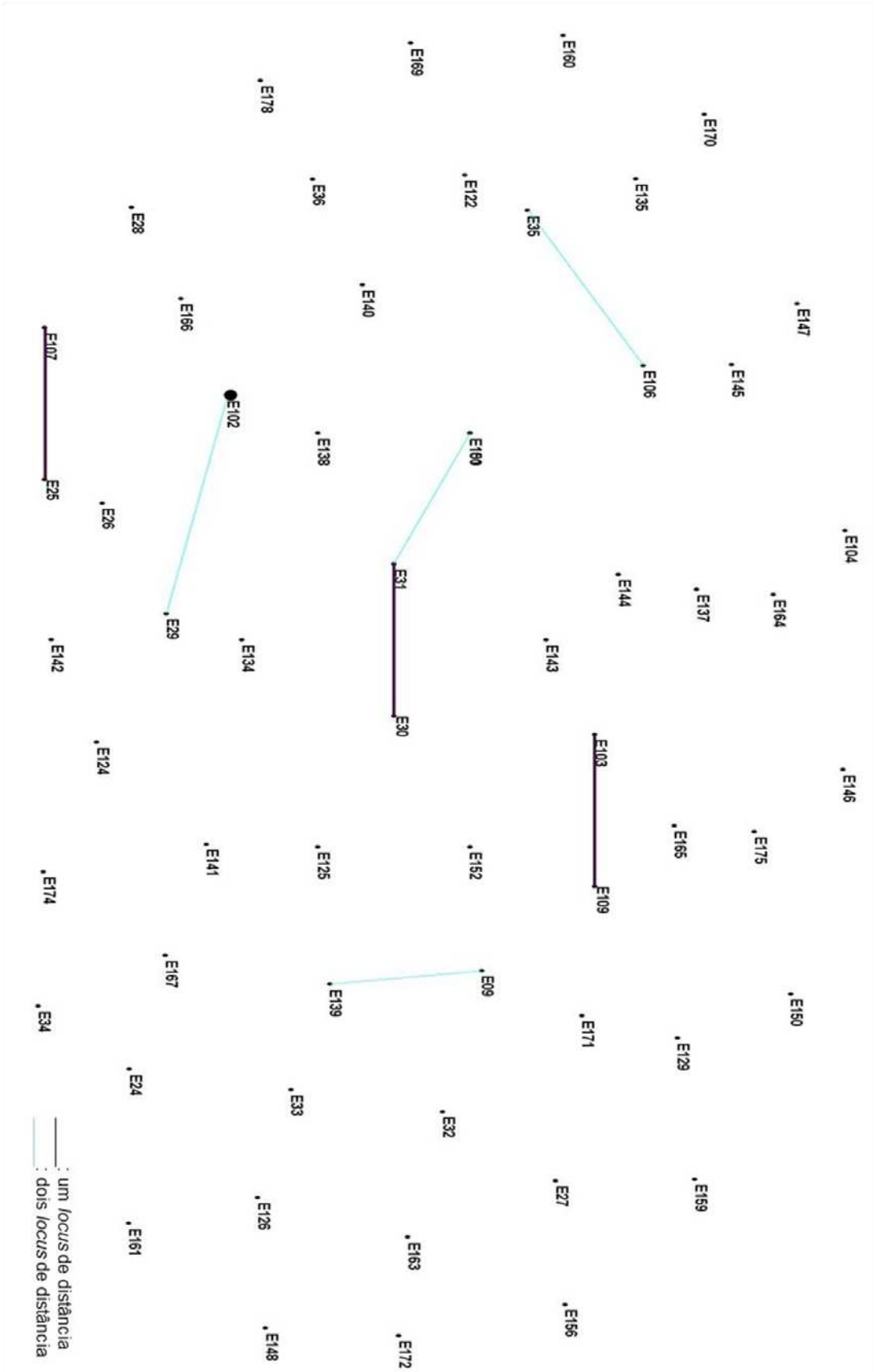


Figura 7: Relação genética entre 62 isolados ambientais de *Aspergillus fumigatus*

Os nove pacientes que apresentaram *A. fumigatus* resistentes aos azólicos tinham como doença de base: aids (n=4); leucemia mielóide crônica (n=2); doença pulmonar obstrutiva crônica (n=1); bronquiectasia (n=1) e síndrome hiper-IgE (n=1), todas associadas à imunodeficiência. Os fatores de risco apontados foram: tuberculose com formação de cavernas no pulmão, uso de antifúngico não alvo-específico, não adesão ao tratamento por parte dos pacientes, dificuldade de diagnóstico laboratorial, atraso no início do tratamento e falha na interpretação de achados clínicos e sintomas. Infecções concomitantes como a tuberculose e pneumonias de repetição foram achados comuns em tais pacientes e podem mascarar uma possível infecção fúngica. Em alguns casos, pacientes realizaram tratamentos profiláticos com FCZ, antifúngico que não é eficaz contra *A. fumigatus,* o que pode ter propiciado a colonização e posterior infecção por esse micro-organismo.

5. Discussão

Indivíduos imunodeficientes são mais suscetíveis às doenças oportunistas causadas por diversos micro-organismos. A incidência de IFI aumentou nos últimos anos devido à expansão do número de pacientes suscetíveis (187). Apesar das diversas opções terapêuticas existentes, a taxa de mortalidade por IFI permanece alta. Infecções causadas por fungos levam um milhão e meio de pessoas a óbito no mundo a cada ano (10). O gênero *Aspergillus* aparece como o mais importante gênero de fungo filamentoso causador de micose sistêmica, especialmente em pacientes com estado imunológico debilitado (10).

Uma pessoa inala centenas de conídios de diversas espécies de *Aspergillus* a cada dia. No hospedeiro saudável, os conídios são facilmente eliminados pelas defesas pulmonares inatas como o movimento mucociliar e macrófagos pulmonares (188). A inalação de conídios é a principal via de aquisição, devido à alta incidência de conídios presentes no ar. Portanto, os conídios podem ser inalados e colonizar os seios nasais, evoluindo posteriormente para o trato respiratório inferior em diversas circunstâncias (79). Além disso, os conídios também podem ser inoculados no hospedeiro humano por trauma, causando infecções cutâneas e ceratite fúngica (189, 190).

No presente estudo, a espécie *A. fumigatus* foi identificada em 74% dos isolados clínicos estudados, seguida por *A. flavus, A terreus* e *A. niger* (Apêndice 3). Características físicas dos conídios como tamanho e hidrofobicidade, somados a capacidade de crescer em qualquer ambiente e em ampla variedade de temperatura (44) e capacidade de evasão imune, são algumas das características que ajudam a explicar o sucesso de adaptação da espécie *A. fumigatus*, fazendo desta a principal espécie causadora de aspergilose (44) na maioria das regiões do globo, seguida de *A. flavus.* Alguns países

como Índia, Arábia Saudita, Sudão e Taiwan têm *A. flavus* como a espécie mais comumente isolada (34-36) a partir de amostras clínicas.

Coletas de amostras de ar foram realizadas durante um ano em unidades de TMO e Hematologia em no HC-Unicamp. O hospital está localizado em uma área cercada por fazendas de cultivo de soja e canola, que podem ser uma fonte potencial de fungos filamentosos isolados no ar hospitalar, uma vez que as espécies são principalmente patógenos ou colonizantes de plantas e contaminantes de ar. O HC-Unicamp se localiza em uma área de clima tropical com invernos secos e verões muito quentes e chuvosos. A associação entre o clima e o desenvolvimento da aspergilose é pouco conhecida. No presente estudo, não foi possível encontrar uma correlação entre as estações e a frequência de isolados de *Aspergillus* spp. recuperados no ar do hospital. Foi possível observar uma diferença significativa quanto a contagem de UFC de fungos filamentosos, sendo o inverno a estação com a menor contagem. Como apenas uma coleta por estação foi realizada, a mesma pode não ser representativa de toda uma estação (Tabela 1).

Como a unidade hematológica não possui ar controlado, o maior número de isolados de *Aspergillus* spp. (n=75) e a diversidade de espécies de *Aspergillus* pode representar a condição aérea externa.

Historicamente, a aspergilose era considerada uma infecção nosocomial, principalmente porque os diagnósticos eram realizados, em sua maioria, após longos períodos de internação. Nos últimos anos, essas infecções têm sido relatadas tardiamente em pacientes que passaram por transplante de células hematopoiéticas, o que seria sugestivo de infecção ambiental (191, 192). Na verdade, a infecção pode ocorrer em ambos os ambientes dependendo da exposição do paciente e de sua capacidade imunológica.

Como as espécies de *Aspergillus* exibem um alto grau de heterogeneidade, a exposição pode ser um evento clonal ou não-clonal, determinando que fontes nosocomiais ou ambientais de infecção podem estar envolvidas. Além disso, o inóculo e o período de incubação necessários para a infecção são altamente variáveis e difíceis de definir, limitando o conhecimento da história natural da infecção (193). A epidemiologia das infecções fúngicas ambientais é largamente influenciada por condições meteorológicas, que variam em regiões de endemicidade (194, 195). No entanto, o impacto das variáveis ambientais sobre a incidência de AI não é bem definido e, provavelmente, varia de acordo com a geografia, riscos do hospedeiro e outros fatores que levam a situações de surto de infecção por *Aspergillu*s spp., como obras de demolição (193).

No presente estudo, de apenas um paciente foi obtida a cultura de *swab* positiva para *A. fumigatus* na cavidade nasal. O paciente estava internado na unidade de TMO e tinha leucemia mielóide aguda como doença de base. Apesar de o paciente não ter outras amostras clínicas com crescimento do micro-organismo, testes positivos de galactomana em soro e lavado brônquico, confirmaram a infecção.

Aspergillus spp. geralmente pode colonizar o trato respiratório superior, onde o progresso da infecção requer a penetração dos conídios nas vias aéreas inferiores, o que está associado com a germinação e invasão tecidual (196). Dado o pequeno tamanho (2–3µm) dos conídios, estes podem alcançar o parênquima pulmonar pelas vias aéreas (188). Fatores predisponentes como imunidade prejudicada e doenças pulmonares subjacentes podem levar à aspergilose. No entanto, pode ser um grande desafio ao clínico diferenciar entre a colonização do pulmão e a infecção fúngica ativa (197).

Com o aumento das micoses sistêmicas e oportunistas nos últimos anos, devido ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, o estudo do perfil de

suscetibilidade aos antifúngicos se torna essencial para a compreensão do comportamento desses micro-organismos e acompanhamento do possível surgimento de isolados resistentes (198). Embora a resistência aos azólicos tenha sido relatada em seis continentes, pouco se sabe sobre a frequência real da resistência em *Aspergillus* spp. globalmente, principalmente porque a maioria dos centros médicos não realiza testes de suscetibilidade de maneira rotineira (164).

Dez isolados clínicos, isolados de 9 pacientes, apresentaram valores elevados de CIM para, pelo menos, um dos azólicos (Tabela 5). Como previamente citado, o gene *cyp*51A de *A. fumigatus* é um gene envolvido na via de biossíntese de ergosterol. Mutações nesse gene podem levar a resistência aos antifúngicos azólicos. Geralmente, dois grupos de mutações podem ser reconhecidos: 1) mutações de origem ambiental e 2) mutações devido à terapia azólica de longa duração. As mutações de resistência de origem ambiental mais comuns são TR34/L98H e TR46/Y121F/ T289A e já foram relatadas globalmente (164). Além disso, outras mutações de resistência de origem ambiental menos prevalentes foram descritas, incluindo TR53, além de três e quatro repetições de TR46 (199). O segundo grupo de mutações de resistência consiste em mutações pontuais no gene *cyp*51A levando a substituições de aminoácidos em diversas posições, incluindo G54, M220, P216, G138 e G448, entre outras (164).

Estudos foram feitos para obter mais informações sobre a origem e propagação desta resistência (164, 200). A genotipagem de *A. fumigatus* epidemiologicamente e geograficamente não relacionadas mostrou uma diversidade genética menor entre os isolados contendo TR34/L98H e TR46/ Y121F/T289A em comparação com os isolados do tipo selvagem, o que sugere que cada mutação pode ter se originado de um genótipo ancestral comum. Essas informações levantam questões sobre a possível existência

prévia desses mutantes antes do contato com azólicos e o efeito da pressão seletiva causada pelos compostos azólicos após exposição aos mesmos.

O sequenciamento do gene *cyp*51A de *A. fumigatus* foi realizado para todos os isolados ambientais (Apêndice 7 e Tabela 6) e para um número limitado de isolados clínicos (Tabela 5) sendo sequenciados apenas os isolados com fenótipo de resistência aos antifúngicos azólicos e os respectivos isolados pertencentes aos mesmos pacientes. Numerosas substituições de aminoácidos foram detectadas, incluindo F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K e N248K. Embora essas substituições de aminoácidos derivadas de mutações de ponto sejam frequentemente relatadas em *A. fumigatus* de pacientes submetidos à terapia de longa duração com azólicos (158, 159, 201), elas foram detectadas em isolados suscetíveis e, provavelmente, não contribuem para a resistência.

Estima-se que 10% dos casos de resistência aos azólicos não sejam mediados por mutações no gene *cyp*51A (202). Outros mecanismos de resistência já foram descritos (203). Além disso, é bastante provável que vários outros mecanismos, ainda não caracterizados, estejam envolvidos na resistência de *A. fumigatus.*

Os isolados clínicos com elevados valores de CIM para os azólicos não apresentaram mutação relacionada com resistência no gene *cyp*51A (Tabela 5). Esses resultados indicam o possível envolvimento de outros mecanismos de resistência. como superexpressão dos genes *cyp*51A e *cyp*51B (204, 205), bombas de efluxo, transportadores de drogas, degradação de drogas ou superexpressão dos transportadores ABC (206).

Estudo de Snelders e colaboradores (150) avaliou 76 isolados de *A. fumigatus* e foram encontradas as mesmas cinco mutações (F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K) encontradas neste estudo em 13 isolados que apresentaram valores baixos de CIM frente

aos azólicos e em um isolado resistente. Essas mesmas mutações foram descritas por Rodriguez e colegas (157) em isolados resistentes e isolados suscetíveis. Portanto, as alterações de aminoácidos encontradas na proteína codificada pelo gene *cyp*51A não estão exclusivamente correlacionadas com o desenvolvimento de resistência. Essas alterações de aminoácidos encontradas não estão próximas a nenhum dos receptores de acesso do composto antifúngico. Sendo assim, não é esperado efeito sobre a atividade biológica da proteína.

Estudo de Kano e colaboradores (207), avaliou a indução de resistência ao tetraconazol (TRZ, composto utilizado na agricultura) após exposição ao mesmo. Três isolados se tornaram resistentes ao TRZ. No entanto, não apresentaram resistência aos antifúngicos ITZ, VRZ e PSZ e nenhuma mutação foi detectada no gene *cyp*51A. Por outro lado, testes de expressão gênica de *cyp*51A e *cyp*51B indicaram que os isolados resistentes ao TRZ expressavam mais esses genes do que o isolado suscetível.

Muito tem sido estudado a respeito da resistência aos antifúngicos azólicos, que não são as únicas opções terapêuticas utilizadas na terapia da aspergilose (45). Importante destacar que o resultado mais inesperado deste estudo foi que 28% dos isolados de *A. fumigatus* (Apêndice 6) apresentaram um fenótipo de baixa suscetibilidade à AMB, com valores de CIM ≥ 2 mg L^{-1} (186). Estudo publicado por Guinea e colaboradores mostrou valores de CIM $\geq$ 4mg L^{-1} para AMB para 1,5% dos 596 *A. fumigatus* estudados (208) e o mesmo foi observado em 2,9% dos isolados do presente estudo. Com o aumento dos relatos de isolados de *A. fumigatus* resistentes aos azólicos, antifúngicos como a AMB, por exemplo, podem ser necessários para o tratamento da aspergilose invasiva. Como esse agente também pode ser ineficaz contra alguns isolados, deixando poucas ou nenhuma opção terapêutica, estratégias de desenvolvimento novos de compostos e de combinação

de drogas devem ser exploradas e o perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos investigado (209). A resistência de *Aspergillus* spp. à AMB ainda não é bem compreendida. Dois mecanismos parecem estar envolvidos: diminuição da concentração de ergosterol na membrana celular devido a mutações na via de síntese e aumento da produção de catalases, que protegem as células do estresse oxidativo causado pelo fármaco (131).

Elevados valores de CIM para AMB também foram observados frente aos isolados clínicos de *A. flavus*. Para os 27 *A. flavus* testados, valores de CIM ≥ 2 mg L^{-1} foram observados em 81% dos isolados (n=22) (Apêndice 6). Valores de CIM de 2 mg L^{-1} foram associadas à falha do tratamento em pacientes com AI (130). Para os dois isolados da espécie relacionada, *A. parasiticus*, valores elevados de CIM para AMB de 8 e 16 mg L^{-1} foram observados. O perfil de suscetibilidade da seção Flavi, mostrando altos valores de CIM para AMB, vem sendo descrito na literatura (210, 211).

Como esperado, devido à sua resistência natural aos poliênicos, valores de CIM elevados foram observados para AMB contra a espécie *A. terreus*. (intervalo de 2 - ≥ 16 mg L^{-1}). Além disso, a suscetibilidade reduzida ao VRZ foi observada em quatro isolados (CIM =4 mg L^{-1}) que apresentaram valores acima do PCE que foi 2 mg L^{-1}. Este perfil de suscetibilidade de *A. terreus* já foi descrito *in vitro* e *in vivo* e tem sido associado a resultados clínicos desfavoráveis (32, 128).

Para apenas um dos isolados de *A. niger* e um isolado de *A. tubingensis* valores elevados de CIM para ITZ e VRZ foram observados, respectivamente. Nenhum isolado dentro deste complexo (Nigri) mostrou resistência à AMB, o que também foi descrito anteriormente na literatura (106).

A maioria dos isolados ambientais de *A. fumigatus* se mostrou suscetível no teste de triagem realizado para os três azólicos ITZ, VRZ e PSZ (Apêndice 7). Testes de triagem são de extrema importância e eles vêm sendo cada vez mais utilizados em estudos que fazem vigilância de resistência (212) e podem ser uma alternativa aos testes de microdiluição. Com o propósito de facilitar a identificação de *A. fumigatus* resistentes aos azólicos nos laboratórios, Buil et al. (213) desenvolveram um teste de triagem feito em ágar RPMI 1640 acrescido com antifúngicos azólicos (ITZ, VRZ e PSZ), que consiste em uma placa própria que contem três poços com antifúngicos azólicos e um poço para controle de crescimento do isolado. Esse teste de triagem foi validado por Arendrup et al. (214) 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 4 mgL^{-1}de ITZ, 2 mgL^{-1}de VRZ e 0,5 mgL^{-1}de PSZ.

Seguindo o propósito do teste de triagem criado na Holanda (213), neste trabalho utilizamos um método desenvolvido *in house*. Foi desenvolvido um teste de triagem rápido e fácil e que pode ser preparado com materiais disponíveis em todos os laboratórios de rotina. O teste foi feito com a utilização de ágar Mueller-Hinton (MH) suplementado com 2% de dextrose com o acréscimo de 1mgL^{-1}de ITZ,1 mgL^{-1} de VRZ e 0,5 mgL^{-1}de PSZ, 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 (dados submetidos para publicação com valor de ITZ=2 mgL^{-1}). Como no momento do presente trabalho utilizando-se a concentração menor de ITZ, três isolados cresceram no teste de triagem, porém se mostraram suscetíveis a este fármaco pela metodologia de microdiluição.

O diagnóstico microbiológico da aspergilose é limitado pelo baixo rendimento das culturas, levando à incerteza sobre a real frequência de resistência. Determinar a

resistência aos antifúngicos é um desafio. Testes de suscetibilidade não são realizados na maioria dos centros de rotina, inclusive no HC-Unicamp. Além disso, muitas vezes o diagnóstico da aspergilose se baseia nos resultados dos biomarcadores, no entanto, os biomarcadores atuais - como galactomanana e 1,3 β, D-glucana - não são capazes de determinar a identificação de espécies e não permitem a realização de testes de susceptibilidade *in vitro.* Dessa forma, a real taxa de resistência a esses compostos é subestimada (215).

Além da AI, que acomete até 10% dos indivíduos submetidos a transplante de medula óssea (neutropenia e doença do enxerto contra o hospedeiro são associadas a riscos aumentados) (191), outras importantes formas clínicas da aspergilose são: o aspergiloma, ou bola fúngica, e as reações alérgicas ou infecções encontradas em pacientes asmáticos e pacientes fibrocísticos. O primeiro processo geralmente ocorre após a colonização de cavidades pós-tuberculose. A tuberculose é considerada a principal doença promotora do aspergiloma. Nesses indivíduos, a colonização por *A. fumigatus* das cavidades deixadas como sequelas pós tuberculose, pode levar a aspergilose pulmonar, no caso, o aspergiloma (72).

Sabe-se que *A. fumigatus* é geneticamente muito diversificado e que múltiplos genótipos podem ser encontrados em pulmões infectados (216). É importante destacar que estudos têm demonstrado que os pacientes podem ser co-infectados ou co-colonizados por ambos isolados resistentes e suscetíveis ao mesmo tempo. Consequentemente, um isolado suscetível obtido de um paciente com uma infecção refratária não descarta a presença de um isolado resistente (217, 218).

Os resultados deste trabalho são consistentes com um cenário no qual o trato respiratório pode ser colonizado por vários genótipos diferentes, já que a inalação de

conídios fúngicos é considerada o principal meio de aquisição de AI e, portanto, diferentes genótipos podem ser inalados ao mesmo tempo (55). Por outro lado, um único genótipo pode se sobressair e invadir o tecido circundante, disseminando-se subsequentemente para o tecido pulmonar ou outros órgãos. Assim, um isolado obtido de amostras respiratórias pode não representar necessariamente o mesmo genótipo encontrado em sítios profundos. Isso também confirma que os indivíduos podem estar constantemente expostos a uma grande variedade de diferentes genótipos de *Aspergillus* spp. do ambiente e estes podem apresentar diferentes perfis frente aos antifúngicos utilizados no tratamento (219).

O que chama a atenção no presente estudo é o complexo clonal, obtido pela técnica de microssatélites, envolvendo seis isolados de três pacientes diferentes: paciente 18 (P11), paciente 76 (P2) e paciente 83 (P4) (Figuras 5 e 6). Os seis isolados apresentaram as mesmas alterações de aminoácidos (Tabela 7) no gene *cyp*51A (F46Y, M127V, N248T, D225E e E427K). Os três pacientes tinham doenças de base imunossupressoras, infecção comprovada por *A. fumigatus* e outros isolados que não fazem parte do complexo clonal e não possuem as mutações de ponto. Estar incluído no complexo clonal significa que os isolados têm a mesma origem clonal, mas com uma diferença de 1 a 3 STs. Os resultados obtidos confirmam estudos anteriores que mostraram a alta diversidade das populações de *A. fumigatus* entre os pacientes e também a diversidade observada em um mesmo paciente (55, 220, 221). Estudos investigando a variabilidade genética desses micro-organismos são mais realizados para a espécie *A. fumigatus*. Porém, a espécie *A. flavus* também vem sendo estudada quanto à sua variabilidade genética em episódios de infecção (57, 117).

Quanto aos pacientes com isolados resistentes aos azólicos, todos apresentaram doença de base imunossupressora, porém não foi possível associar o isolamento de *A. fumigatus* resistentes com o uso prévio de antifúngicos. Em alguns casos, pacientes realizaram tratamentos profiláticos com FCZ, antifúngico que não é eficaz contra *A. fumigatus,* o que pode ter propiciado a colonização e posterior infecção por esse micro-organismo.

Espécies de *Aspergillus* são amplamente encontradas em unidades hospitalares, incluindo aquelas com condições ambientais de proteção, como salas de operação ou unidades de pacientes neutropênicos (220, 222), o que foi também observado no presente estudo em ambas unidades onde o ar foi coletado, inclusive na unidade de TMO onde o ar é controlado por filtros Hepa. Por essa razão, a amostragem interna é aconselhável para monitorar a qualidade do filtro de ar em ambientes controlados (45). A avaliação interna da diversidade genética, principalmente *A. fumigatus*, pode representar uma ferramenta útil para ilustrar a presença ou ausência de clones específicos em unidades clínicas, principalmente quando há suspeitas de surtos.

As populações de *A. fumigatus* tendem a evoluir muito rapidamente. Estudo de Araújo e colaboradores avaliou a diversidade dos isolados ambientais de *A. fumigatus* coletados em enfermarias ao longo de um ano, demonstrando que os isolados foram se distanciando geneticamente ao longo do tempo, ocorrendo maior variação genética entre o início e o fim do estudo (220). Considerando a alta diversidade e alta capacidade de dispersão de *A. fumigatus* em ambientes internos, mais atenção deveria ser dada para medidas preventivas em unidades restritas que são utilizadas principalmente para admissão de pacientes hematológicos de alto risco e transplante de medula óssea.

Quanto aos *A. fumigatus* ambientais do presente estudo, a maioria dos isolados apresentou um padrão único de microssatélites (Apêndice 7), indicando uma estrutura populacional complexa e muito diversificada, o que foi também demonstrado por Hurst e colaboradores (172). Os pesquisadores isolaram *A. fumigatus* sensíveis e resistentes a partir de amostras de detritos de colheitas de amendoim nos Estados Unidos. Os isolados resistentes (TR34/L98H) eram idênticos ou bem próximos geneticamente (um ou dois locus de diferença). Por outro lado, os que se apresentaram suscetíveis aos antifúngicos e não possuíam mutação, mostraram elevada diversidade.

Avaliar todos os *Aspergillus* spp*.,* quanto ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, não é recomendado atualmente pelo *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) a partir das amostras cultivadas durante infecção inicial. No entanto, deveria ser considerada a determinação da CIM quando pacientes apresentarem aspergilose refratária ao tratamento com azólicos ou, para fins epidemiológicos, em qualquer estágio da infecção ou quando houver obtenção de um novo isolado (45, 83).

Embora a resistência aos azólicos tenha sido relatada em seis continentes, pouco se sabe sobre a frequência real da resistência em *Aspergillus* spp. globalmente, principalmente porque a maioria dos centros médicos não realiza testes de suscetibilidade de rotina. A compreensão atual do surgimento da resistência aos antifúngicos azólicos e a outros fármacos em *A. fumigatus* ainda é limitada no HC-Unicamp, assim como a experiência clínica no tratamento de casos com aspergilose causados por isolados resistentes. O diagnóstico de possíveis isolados resistentes poderia ser aprimorado adotando-se algumas medidas: (a) cultura periódica e testes de suscetibilidade de todos os isolados de pacientes na terapia de longo prazo; (b): triagem de resistência com a utilização de placas com antifúngicos dissolvidos em ágar; (c): teste de múltiplas colônias

a partir de culturas positivas. Sempre que possível, tem sido aconselhado testar colônias diferentes, já que diferentes genótipos com diferentes fenótipos de suscetibilidade podem estar presentes em uma única cultura (45).

Mesmo existindo metodologias moleculares capazes de detectar mutações relacionadas com resistência aos azólicos em isolados e até mesmo direto de amostras clínicas, o teste de suscetibilidade ainda se mostra muito importante, pois como visto no presente estudo, o mecanismo de resistência existente pode ser desconhecido e, por isso, será detectado apenas com a utilização de testes fenotípicos. Além disso, um único micro-organismo pode ser resistente a mais de uma classe de compostos antifúngicos.

O presente estudo possuiu algumas limitações. Uma delas é que os isolados clínicos e os isolados ambientais não foram obtidos no mesmo período, sendo os clínicos obtidos retrospectivamente e os ambientais prospectivamente. No entanto, o estudo da população de isolados clínicos obtida no mesmo período em que foram realizadas as coletas ambientais já está sendo realizado.

Para os isolados clínicos, uma limitação poderia ser atribuída aos resultados dos testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos, uma vez que os valores de CIM foram obtidos por testes padronizados que utilizam conídios como inóculo. No entanto, para fungos filamentosos, as estruturas invasoras de tecidos e encontradas em infecções são as hifas e trabalhos anteriores já demonstraram que a sensibilidade das diferentes estruturas de um mesmo isolado frente aos antifúngicos pode ser diferente, sendo as hifas mais sensíveis do que os conídios. Além disso, para fungos filamentosos, pouco se sabe sobre a correlação entre os valores de CIM e os resultados clínicos (223, 224).

Em relação aos isolados ambientais, o número limitado de isolados de *Aspergillus* spp*.,* provavelmente, se deu ao fato ter sido utilizado um meio que permite o crescimento

de quase todas as espécies de fungos, o meio Sabouraud, sendo que não existe um meio de cultura seletivo para as espécies de *Aspergillus*, fazendo com que crescessem outras espécies contaminantes rapidamente, o que pode ter prejudicado o crescimento das espécies de *Aspergillus*. Como um dos objetivos era conhecer a ocorrência das diferentes espécies de *Aspergillus*, a temperatura de incubação escolhida foi de 37°C, o que possibilita o crescimento de diversas espécies de fungos. Uma alternativa seria aumentar a temperatura de incubação se o objetivo maior for o isolamento apenas da espécie *A. fumigatus* que cresce bem em temperatura de até 45°C. Além disso foi realizado um reduzido número de coletas que, se ampliado, poderia aumentar as chances de isolamento desses micro-organismos. Estudos epidemiológicos adicionais podem ajudar a melhor conhecer os cenários de infecção por esses agentes e ainda estimular políticas de vigilância em resistência.

6. Conclusões

-*A. fumigatus,* representou 74% dos isolados clínicos estudados, seguida por *A. flavus* que representou 12%.

- Por meio das coletas de ar foram obtidos 123 isolados de *Aspergillus* spp.. *A. fumigatus* foi a espécie mais comumente encontrada, representando 50 % dos isolados.

- A partir das coletas de *swab* nasal, um isolado de *A. fumigatus* foi obtido e não apresentou resistência aos antifúngicos, assim como não foi possível relacioná-lo aos achados ambientais.

- As mutações de ponto encontradas no gene *cyp*51A (F46Y, M127V, N248T, D225E e E427K) dos isolados clínicos de *A. fumigatus* avaliados não são associadas com fenótipos de resistência. Mutações relacionadas a resistência aos azólicos não foram observadas, nem mesmo em isolados com elevados valores de CIM.

-Excluindo a espécie *A. terreus,* que é naturalmente resistente, 35% dos isolados estudados apresentaram valores de CIM $\geq$ 2 mgL^{-1} frente ao antifúngico AMB, destacando a necessidade de vigilância já que valores de 2 podem ser associados a falha terapêutica.

- Todos os isolados ambientais de *A. fumigatus* foram considerados suscetíveis aos azólicos avaliados.

- As mutações de ponto encontradas no gene *cyp*51A (F46Y, M127V, N248T, D225E, E427K e N248K) dos isolados ambientais de *A. fumigatus* não são associadas com fenótipos de resistência.

- Apenas um número limitado de genótipos de *A. fumigatus* foi compartilhado entre os pacientes e a co-colonização ou co-infecção com múltiplos genótipos foi observada em um elevado número de pacientes. Entre os isolados ambientais, também foi possível observar elevada diversidade genética desse micro-organismo.

- A consulta aos dados clínicos dos três pacientes que tiveram *A. fumigatus* de mesma origem clonal revelou que dois deles estiveram internados no hospital ao mesmo tempo, mas nunca compartilharam o mesmo quarto. Todos tinham doenças de base imunossupressoras e receberam alguma medicação antifúngica que, no entanto, não pode ser relacionada ao encontro do isolado resistente.

7. Referências

1. Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY, Spatafora JW, et al. The fungi. Curr Biol. 2009;19(18):R840-5.
2. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. Bull World Health Organ. 2001;79(8):780-90.
3. Sykes R. Penicillin: from discovery to product. Bull World Health Organ. 2001;79(8):778-9.
4. Jahromi MF, Liang JB, Ho YW, Mohamad R, Goh YM, Shokryazdan P. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:196264.
5. Romero M, Canton E, Peman J, Gobernado M. [Antifungal inhibitors of glucan synthesis]. Rev Esp Quimioter. 2005;18(4):281-99.
6. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. Sci Transl Med. 2012;4(165):165rv13.
7. Vallabhaneni S, Mody RK, Walker T, Chiller T. The Global Burden of Fungal Diseases. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(1):1-11.
8. 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.
9. Kim JY. Human fungal pathogens: Why should we learn? J Microbiol. 2016;54(3):145-8.
10. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. J Fungi (Basel). 2017;3(4).
11. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS. 2009;23(4):525-30.
12. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. Lancet Infect Dis. 2017;17(11):e367-e77.
13. Zijlstra EE, van de Sande WW, Fahal AH. Mycetoma: A Long Journey from Neglect. PLoS Negl Trop Dis. 10. United States2016. p. e0004244.
14. WHO/ World Health Organization webpage: www.who.int/neglected_diseases 2017
15. Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(3):513-21.
16. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. Mycoses. 2016;59(3):145-50.
17. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol. 2014;78:141-73.
18. Krijgsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, Wang F, Muller WH, Dijksterhuis J, et al. Development in *Aspergillus*. Stud Mycol. 2013;74(1):1-29.
19. Etymologia: Aspergillus. Emerging Infectious Diseases. 2006;12(3):415-.
20. Thom C CM. The Aspergili. Baltimore: Williams & Wilkins; 1926.
21. Raper KB FD. The genus *Aspergillus.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1965.

22. Gams W CM, Onions AH, Pitt JI, Samson RA. Infrageneric taxa of A*spergillus* . In Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics Plenum, New York.: ed. Samson RA, Pitt J; 1985. p. pp. 55–62
23. 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.
24. Hinson KF, Moon AJ, Plummer NS. Broncho-pulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. Thorax. 1952;7(4):317-33.
25. Mann B, Pasha MA. Allergic primary pulmonary aspergillosis and Schonlein-Henoch purpura. Br Med J. 1959;1(5117):282-3.
26. Silva RF. Chapter 8: Fungal infections in immunocompromised patients. J Bras Pneumol. 2010;36(1):142-7.
27. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latge JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;5(2):a019786.
28. SC L, Porto E, Martins JEC, Heinz-Vacari EM, NT. M. Tratado de Micologia Médica. 9, editor. São Paulo: Sarvier; 2002.
29. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. Front Microbiol. 2016;7:683.
30. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. Aspergillus flavus: an emerging non-*fumigatus Aspergillus* species of significance. Mycoses. 2009;52(3):206-22.
31. Badali H, Fakhim H, Zarei F, Nabili M, Vaezi A, Poorzad N, et al. In Vitro Activities of Five Antifungal Drugs Against Opportunistic Agents of *Aspergillus* Nigri Complex. Mycopathologia. 2016;181(3-4):235-40.
32. Hachem R, Gomes MZ, El Helou G, El Zakhem A, Kassis C, Ramos E, et al. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus:* an emerging opportunistic infection with poor outcome independent of azole therapy. J Antimicrob Chemother. 2014;69(11):3148-55.
33. Sadarangani M, Harvey M, McDonald A, Speert DP, Dix D. Brain Abscesses Due to *Aspergillus nidulans* Infection During Induction Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. J Pediatr Hematol Oncol. 2015;37(6):e384-6.
34. Chakrabarti A, Rudramurthy SM, Panda N, Das A, Singh A. Epidemiology of chronic fungal rhinosinusitis in rural India. Mycoses. 2015;58(5):294-302.
35. Zanganeh E, Zarrinfar H, Rezaeetalab F, Fata A, Tohidi M, Najafzadeh MJ, et al. Predominance of non-fumigatus Aspergillus species among patients suspected to pulmonary aspergillosis in a tropical and subtropical region of the Middle East. Microb Pathog. 2018;116:296-300.
36. Nouripour-Sisakht S, Mirhendi H, Shidfar MR, Ahmadi B, Rezaei-Matehkolaei A, Geramishoar M, et al. Aspergillus species as emerging causative agents of onychomycosis. J Mycol Med. 2015;25(2):101-7.
37. Liu Y, Chang CC, Marsh GM, Wu F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. Eur J Cancer. 2012;48(14):2125-36.
38. Mohammed A, Chala A, Dejene M, Fininsa C, Hoisington DA, Sobolev VS, et al. *Aspergillus* and aflatoxin in groundnut (Arachis hypogaea L.) and groundnut cake in Eastern Ethiopia. Food Addit Contam Part B Surveill. 2016;9(4):290-8.
39. Kachapulula PW, Akello J, Bandyopadhyay R, Cotty PJ. Aspergillus section Flavi community structure in Zambia influences aflatoxin contamination of maize and groundnut. Int J Food Microbiol. 2017;261:49-56.

40. Perrone G, Gallo A, Logrieco AF. Biodiversity of *Aspergillus* section Flavi in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. Front Microbiol. 2014;5:377.
41. Paulussen C, Hallsworth JE, Alvarez-Perez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other Aspergillus species. Microb Biotechnol. 2017;10(2):296-322.
42. Wyatt TT, van Leeuwen MR, Golovina EA, Hoekstra FA, Kuenstner EJ, Palumbo EA, et al. Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) and other fungi. Environ Microbiol. 2015;17(2):395-411.
43. Afanou KA, Straumfors A, Skogstad A, Skaar I, Hjeljord L, Skare O, et al. Profile and Morphology of Fungal Aerosols Characterized by Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM). Aerosol Sci Technol. 2015;49(6):423-35.
44. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? PLoS Pathog. 2013;9(12):e1003743.
45. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin Microbiol Infect. 2018;24 Suppl 1:e1-e38.
46. Meheust D, Le Cann P, Reboux G, Millon L, Gangneux JP. Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. Crit Rev Microbiol. 2014;40(3):248-60.
47. Thio CL, Smith D, Merz WG, Streifel AJ, Bova G, Gay L, et al. Refinements of environmental assessment during an outbreak investigation of invasive aspergillosis in a leukemia and bone marrow transplant unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 2000;21(1):18-23.
48. Hahn T, Cummings KM, Michalek AM, Lipman BJ, Segal BH, McCarthy PL, Jr. Efficacy of high-efficiency particulate air filtration in preventing aspergillosis in immunocompromised patients with hematologic malignancies. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002;23(9):525-31.
49. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Summerbell RC, Rex JH, et al. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. Blood. 2003;101(7):2542-6.
50. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Mahfouz TH, Rex JH, et al. Cleaning patient shower facilities: a novel approach to reducing patient exposure to aerosolized *Aspergillus* species and other opportunistic molds. Clin Infect Dis. 2002;35(8):E86-8.
51. Warris A. The biology of pulmonary *Aspergillus* infections. J Infect. 2014;69 Suppl 1:S36-41.
52. Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. Scientifica (Cairo). 2013;2013:459405.
53. Kosmidis C, Denning DW. Republished: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Postgrad Med J. 2015;91(1077):403-10.
54. Lowes D, Chishimba L, Greaves M, Denning DW. Development of chronic pulmonary aspergillosis in adult asthmatics with ABPA. Respir Med. 2015;109(12):1509-15.
55. de Valk HA, Klaassen CH, Yntema JB, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, et al. Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2009;8(2):110-4.

56. de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4112-20.
57. Taghizadeh-Armaki M, Hedayati MT, Ansari S, Omran SM, Saber S, Rafati H, et al. Genetic Diversity and In Vitro Antifungal Susceptibility of 200 Clinical and Environmental *Aspergillus flavus* Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(5).
58. Muldoon EG, Strek ME, Patterson KC. Allergic and Noninvasive Infectious Pulmonary Aspergillosis Syndromes. Clin Chest Med. 2017;38(3):521-34.
59. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. Med Mycol. 2013;51(4):361-70.
60. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173(5):475-82.
61. Reis FJ, Damaceno N. [Cystic fibrosis]. J Pediatr (Rio J). 1998;74 Suppl 1:S76-94.
62. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H. Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med. 1992;326(18):1187-91.
63. Somayaji R, Ramos KJ, Kapnadak SG, Aitken ML, Goss CH. Common clinical features of CF (respiratory disease and exocrine pancreatic insufficiency). Presse Med. 2017;46(6 Pt 2):e109-e24.
64. Sabino R, Ferreira JA, Moss RB, Valente J, Verissimo C, Carolino E, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2015;14(4):474-81.
65. Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. Med Mycol. 2016;54(8):781-6.
66. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. Chest. 2010;137(1):171-6.
67. King J, Brunel SF, Warris A. *Aspergillus infections* in cystic fibrosis. J Infect. 2016;72 Suppl:S50-5.
68. Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. Eur Respir J. 2011;37(4):865-72.
69. Maghrabi F, Denning DW. The Management of Chronic Pulmonary Aspergillosis: The UK National Aspergillosis Centre Approach. Curr Fungal Infect Rep. 2017;11(4):242-51.
70. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. Clin Infect Dis. 2003;37 Suppl 3:S265-80.
71. Lowes D, Al-Shair K, Newton PJ, Morris J, Harris C, Rautemaa-Richardson R, et al. Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. Eur Respir J. 2017;49(2).
72. Muniappan A, Tapias LF, Butala P, Wain JC, Wright CD, Donahue DM, et al. Surgical therapy of pulmonary aspergillomas: a 30-year North American experience. Ann Thorac Surg. 2014;97(2):432-8.
73. Al-Bader N, Sheppard DC. Aspergillosis and stem cell transplantation: An overview of experimental pathogenesis studies. Virulence. 2016;7(8):950-66.
74. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latge JP. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. Nat Rev Microbiol. 2017;15(11):661-74.

75. Brakhage AA, Langfelder K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. Annu Rev Microbiol. 2002;56:433-55.
76. Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus.* Microbes Infect. 2009;11(12):919-27.
77. Margalit A, Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. FEMS Microbiol Rev. 2015;39(5):670-87.
78. Schmidt S, Condorelli A, Koltze A, Lehrnbecher T. NK Cells and Their Role in Invasive Mold Infection. J Fungi (Basel). 2017;3(2).
79. Hope WW. Invasion of the alveolar-capillary barrier by *Aspergillus* spp.: therapeutic and diagnostic implications for immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis. Med Mycol. 2009;47 Suppl 1:S291-8.
80. Krappmann S. How to invade a susceptible host: cellular aspects of aspergillosis. Curr Opin Microbiol. 2016;34:136-46.
81. Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 2010;50(12):1559-67.
82. Global action fund for fungal infection [Internet]. http://www.gaffi.org/why/. 2014.
83. Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016;63(4):e1-e60.
84. Thornton CR. Detection of invasive aspergillosis. Adv Appl Microbiol. 2010;70:187-216.
85. Lackner M, Lass-Florl C. Up-date on diagnostic strategies of invasive aspergillosis. Curr Pharm Des. 2013;19(20):3595-614.
86. Lass-Florl C, Mayr A. Diagnosing invasive fungal diseases - limitations of microbiological diagnostic methods. Expert Opin Med Diagn. 2009;3(4):461-70.
87. Falci DR, Stadnik CMB, Pasqualotto AC. A Review of Diagnostic Methods for Invasive Fungal Diseases: Challenges and Perspectives. Infect Dis Ther. 2017;6(2):213-23.
88. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Cochrane Database Syst Rev. 2015(12):Cd007394.
89. Lahmer T, Neuenhahn M, Held J, Rasch S, Schmid RM, Huber W. Comparison of 1,3-beta-d-glucan with galactomannan in serum and bronchoalveolar fluid for the detection of *Aspergillus* species in immunosuppressed mechanical ventilated critically ill patients. J Crit Care. 2016;36:259-64.
90. Bergeron A, Belle A, Sulahian A, Lacroix C, Chevret S, Raffoux E, et al. Contribution of galactomannan antigen detection in BAL to the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies. Chest. 2010;137(2):410-5.
91. Lamoth F. Galactomannan and 1,3-beta-d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. J Fungi (Basel). 2016;2(3).
92. Vergidis P, Walker RC, Kaul DR, Kauffman CA, Freifeld AG, Slagle DC, et al. False-positive Aspergillus galactomannan assay in solid organ transplant recipients with histoplasmosis. Transpl Infect Dis. 2012;14(2):213-7.

93. Lheureux O, Montesinos I, Taton O, Antoine M, Preiser JC, Nortier J, et al. False-positive galactomannan assay in broncho-alveolar lavage after enteral nutrition solution inhalation: a case report. JMM Case Rep. 2017;4(9):e005116.
94. Rogers TR, Morton CO, Springer J, Conneally E, Heinz W, Kenny C, et al. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. Br J Haematol. 2013;161(4):517-24.
95. Aguado JM, Vazquez L, Fernandez-Ruiz M, Villaescusa T, Ruiz-Camps I, Barba P, et al. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. Clin Infect Dis. 2015;60(3):405-14.
96. 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.
97. Alanio A, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S. Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How? Clin Microbiol Rev. 2017;30(3):671-707.
98. Cheng C, Sun J, Zheng F, Wu K, Rui Y. Molecular identification of clinical "difficult-to-identify" microbes from sequencing 16S ribosomal DNA and internal transcribed spacer 2. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014;13:1.
99. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. Clin Chest Med. 2009;30(2):391-408, viii.
100. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5463-7.
101. Irinyi L, Lackner M, de Hoog GS, Meyer W. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. Fungal Biol. 2016;120(2):125-36.
102. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Stud Mycol. 2007;59:39-46.
103. Tam EWT, Chen JHK, Lau ECL, Ngan AHY, Fung KSC, Lee K-C, et al. Misidentification of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus tamarii* as *Aspergillus flavus:* Characterization by Internal Transcribed Spacer, β-Tubulin, and Calmodulin Gene Sequencing, Metabolic Fingerprinting, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology. 2014;52(4):1153-60.
104. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. Eukaryot Cell. 2006;5(10):1705-12.
105. Blum G, Hortnagl C, Jukic E, Erbeznik T, Pumpel T, Dietrich H, et al. New insight into amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus.* Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(4):1583-8.
106. Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(10):4802-9.
107. Howard SJ. Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. Mycopathologia. 2014;178(5-6):435-9.
108. Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PT, et al. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. J Clin Microbiol. 2014;52(10):3633-40.

109. Won EJ, Shin JH, Kim SH, Choi MJ, Byun SA, Kim MN, et al. Antifungal susceptibilities to amphotericin B, triazoles and echinocandins of 77 clinical isolates of cryptic *Aspergillus* species in multicenter surveillance in Korea. Med Mycol. 2017.
110. Paholcsek M, Fidler G, Konya J, Rejto L, Mehes G, Bukta E, et al. Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia. BMC Infect Dis. 2015;15:251.
111. 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.
112. Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, et al. *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. PLoS One. 2013;8(6):e64871.
113. Coelho D, Silva S, Vale-Silva L, Gomes H, Pinto E, Sarmento A, et al. *Aspergillus viridinutans:* an agent of adult chronic invasive aspergillosis. Med Mycol. 2011;49(7):755-9.
114. Chong GL, van de Sande WW, Dingemans GJ, Gaajetaan GR, Vonk AG, Hayette MP, et al. Validation of a new Aspergillus real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol. 2015;53(3):868-74.
115. Chong GM, Vonk AG, Meis JF, Dingemans GJ, Houbraken J, Hagen F, et al. Interspecies discrimination of *A. fumigatus* and siblings *A. lentulus* and *A. felis* of the *Aspergillus* section Fumigati using the AsperGenius((R)) assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;87(3):247-52.
116. Vanhee LM, Symoens F, Bouchara JP, Nelis HJ, Coenye T. High-resolution genotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27(10):1005-7.
117. Rudramurthy SM, de Valk HA, Chakrabarti A, Meis JF, Klaassen CH. High resolution genotyping of clinical *Aspergillus flavus* isolates from India using microsatellites. PLoS One. 2011;6(1):e16086.
118. 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.
119. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol. 1998;36(9):2413-8.
120. 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.
121. Pence MA, McElvania TeKippe E, Wallace MA, Burnham CA. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(10):1703-12.
122. Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2267-72.
123. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin Chem. 2015;61(1):100-11.
124. Aslani N, Janbabaei G, Abastabar M, Meis JF, Babaeian M, Khodavaisy S, et al. Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. BMC Infect Dis. 2018;18(1):24.

125. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. J Microbiol Methods. 2017;138:20-9.
126. Theparee T, Das S, Thomson RB, Jr. Total Laboratory Automation and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improve Turnaround Times in the Clinical Microbiology Laboratory: a Retrospective Analysis. J Clin Microbiol. 2018;56(1).
127. Laniado-Laborin R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev Iberoam Micol. 2009;26(4):223-7.
128. Pastor FJ, Guarro J. Treatment of *Aspergillus terreus* infections: a clinical problem not yet resolved. Int J Antimicrob Agents. 2014;44(4):281-9.
129. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. J Antimicrob Chemother. 2002;49 Suppl 1:7-10.
130. Hadrich I, Makni F, Neji S, Cheikhrouhou F, Bellaaj H, Elloumi M, et al. Amphotericin B in vitro resistance is associated with fatal *Aspergillus flavus* infection. Med Mycol. 2012;50(8):829-34.
131. Goncalves SS, Souza AC, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. Mycoses. 2016.
132. 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.
133. Lass-Florl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. Drugs. 2011;71(18):2405-19.
134. Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. Drugs. 2011;71(1):11-41.
135. Bodey GP. Azole antifungal agents. Clin Infect Dis. 1992;14 Suppl 1:S161-9.
136. Lazzarini C, Esposto MC, Prigitano A, Cogliati M, De Lorenzis G, Tortorano AM. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates from an Italian Culture Collection. Antimicrob Agents Chemother. 2015;60(1):682-5.
137. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med. 2008;5(11):e219.
138. 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.
139. Lass-Florl C. In vitro susceptibility testing in *Aspergillus* species: an update. Future Microbiol. 2010;5(5):789-99.
140. CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Approved Standard—Second Edition. 282008. p. 13.
141. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrosky-Zeichner L, Pfaller M, et al. Quality control and reference guidelines for CLSI broth microdilution susceptibility method (M 38-A document) for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol. 2005;43(10):5243-6.
142. Espinel-Ingroff A, Canton E. Comparison of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol. 2008;46(5):1793-803.

143. Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, Messer S, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. J Clin Microbiol. 2007;45(6):1811-20.
144. Szekely A, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1480-3.
145. Arendrup MC, Verweij P, Nielsen HV. Evaluation of MIC Strip Isavuconazole Test for Susceptibility Testing of Wild-Type and Non-Wild-Type *Aspergillus fumigatus* Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(1).
146. Castro C, Serrano MC, Flores B, Espinel-Ingroff A, Martin-Mazuelos E. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with a modified NCCLS M38-A method to determine the activity of voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. J Clin Microbiol. 2004;42(9):4358-60.
147. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Florl C, Hope WW. Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against Candida spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. Drug Resist Updat. 2013;16(6):81-95.
148. Dudakova A, Spiess B, Tangwattanachuleeporn M, Sasse C, Buchheidt D, Weig M, et al. Molecular Tools for the Detection and Deduction of Azole Antifungal Drug Resistance Phenotypes in *Aspergillus* Species. Clin Microbiol Rev. 2017;30(4):1065-91.
149. 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.
150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. Bader O, Tunnermann J, Dudakova A, Tangwattanachuleeporn M, Weig M, Gross U. Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(7):4356-9.
154. Sharma C, Hagen F, Moroti R, Meis JF, Chowdhary A. Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2015;3(2):69-74.
155. Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, Meis JF. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. Future Microbiol. 2014;9(5):697-711.
156. Liu M, Zheng N, Li D, Zheng H, Zhang L, Ge H, et al. cyp51A-based mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus:* Illustration by a new 3D Structural Model of *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. Med Mycol. 2016;54(4):400-8.
157. 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.

158. 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.
159. Alanio A, Cabaret O, Sitterle E, Costa JM, Brisse S, Cordonnier C, et al. Azole preexposure affects the *Aspergillus fumigatus* population in patients. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(9):4948-50.
160. Liu M, Zeng R, Zhang L, Li D, Lv G, Shen Y, et al. Multiple cyp51A-based mechanisms identified in azole-resistant isolates of *Aspergillus fumigatus* from China. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(7):4321-5.
161. 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.
162. 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).
163. Le Pape P, Lavergne RA, Morio F, Alvarez-Moreno C. Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus,* Colombia, 2015. Emerg Infect Dis. 2016;22(1):156-7.
164. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? Clin Infect Dis. 2016;62(3):362-8.
165. Verweij PE, Kema GH, Zwaan B, Melchers WJ. Triazole fungicides and the selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic mould *Aspergillus fumigatus.* Pest Manag Sci. 2013;69(2):165-70.
166. 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.
167. Kidd SE, Goeman E, Meis JF, Slavin MA, Verweij PE. Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia. Mycoses. 2015;58(6):350-5.
168. Pelaez T, Monteiro MC, Garcia-Rubio R, Bouza E, Gomez-Lopez A, Mellado E. First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to Cyp51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naive patient in Spain. New Microbes New Infect. 2015;6:33-4.
169. Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, Hagen F, Meis JF. Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia. Front Microbiol. 2015;6:428.
170. Lavergne RA, Morio F, Favennec L, Dominique S, Meis JF, Gargala G, et al. First description of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in France. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(7):4331-5.
171. Ozmerdiven GE, Ak S, Ener B, Agca H, Cilo BD, Tunca B, et al. First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. J Infect Chemother. 2015;21(8):581-6.
172. 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;72(9):2443-6.
173. 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 Cyp51Ap in South America. Rev Iberoam Micol. 2017;34(1):46-8.

174. Johnson EM, Oakley KL, Radford SA, Moore CB, Warn P, Warnock DW, et al. Lack of correlation of in vitro amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. J Antimicrob Chemother. 2000;45(1):85-93.
175. Lass-Florl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Kreczy A, Dierich MP, et al. In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. J Antimicrob Chemother. 1998;42(4):497-502.
176. Wiederhold NP, Tam VH, Chi J, Prince RA, Kontoyiannis DP, Lewis RE. Pharmacodynamic activity of amphotericin B deoxycholate is associated with peak plasma concentrations in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(2):469-73.
177. Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. Ann N Y Acad Sci. 2015;1354:1-11.
178. Jimenez-Ortigosa C, Moore C, Denning DW, Perlin DS. Emergence of Echinocandin Resistance due to a Point Mutation in the fks1 Gene of *Aspergillus fumigatus* in a Patient with Chronic Pulmonary Aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother. 2017.
179. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). J Clin Microbiol. 2010;48(9):3251-7.
180. 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.
181. Conover W.J. IRL. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. The American Statistician. 351981. p. 124-9.
182. 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.
183. 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.
184. Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. J Clin Microbiol. 2009;47(10):3142-6.
185. Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JF, Lockhart SR. Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011-2013. Emerg Infect Dis. 2014;20(9):1498-503.
186. 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;61(6):360-5.
187. Suleyman G, Alangaden GJ. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(4):1023-52.
188. Latge JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol. 2001;9(8):382-9.
189. Kronen R, Liang SY, Bochicchio G, Bochicchio K, Powderly WG, Spec A. Invasive Fungal Infections Secondary to Traumatic Injury. Int J Infect Dis. 2017;62:102-11.
190. Jain V, Dabir S, Shome D, Dadu T, Natarajan S. Aspergillus iris granuloma: a case report with review of literature. Surv Ophthalmol. 2009;54(2):286-91.

191. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. Blood. 2002;100(13):4358-66.
192. Grow WB, Moreb JS, Roque D, Manion K, Leather H, Reddy V, et al. Late onset of invasive *Aspergillus* infection in bone marrow transplant patients at a university hospital. Bone Marrow Transplant. 2002;29(1):15-9.
193. Panackal AA, Li H, Kontoyiannis DP, Mori M, Perego CA, Boeckh M, et al. Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2010;50(12):1588-97.
194. Zender CS, Talamantes J. Climate controls on valley fever incidence in Kern County, California. Int J Biometeorol. 2006;50(3):174-82.
195. Freedman M, Jackson BR, McCotter O, Benedict K. Coccidioidomycosis Outbreaks, United States and Worldwide, 1940-2015. Emerg Infect Dis. 2018;24(3):417-23.
196. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. Med Mycol. 2009;47(4):387-97.
197. Shahi M, Ayatollahi Mousavi SA, Nabili M, Aliyali M, Khodavaisy S, Badali H. Aspergillus colonization in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Curr Med Mycol. 2015;1(3):45-51.
198. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57 Suppl 19:57-64.
199. Zhang J, Snelders E, Zwaan BJ, Schoustra SE, Meis JF, van Dijk K, et al. A Novel Environmental Azole Resistance Mutation in *Aspergillus fumigatus* and a Possible Role of Sexual Reproduction in Its Emergence. MBio. 2017;8(3).
200. Snelders E, Huis In 't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. Appl Environ Microbiol. 2009;75(12):4053-7.
201. Shalhoub S, Luong ML, Howard SJ, Richardson S, Singer LG, Chaparro C, et al. Rate of cyp51A mutation in *Aspergillus fumigatus* among lung transplant recipients with targeted prophylaxis. J Antimicrob Chemother. 2015;70(4):1064-7.
202. Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL, Fisher MC, Verweij PE. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2016;371(1709).
203. 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.
204. Buied A, Moore CB, Denning DW, Bowyer P. High-level expression of cyp51B in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. J Antimicrob Chemother. 2013;68(3):512-4.
205. 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.
206. Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gonoi 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. 2017;13(1):e1006096.

207. Kano R, Sobukawa H, Murayama SY, Hirose D, Tanaka Y, Kosuge Y, et al. In vitro resistance of *Aspergillus fumigatus* to azole farm fungicide. J Infect Chemother. 2016;22(3):133-6.
208. Guinea J, Pelaez T, Alcala L, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E. Antifungal susceptibility of 596 *Aspergillus fumigatus* strains isolated from outdoor air, hospital air, and clinical samples: analysis by site of isolation. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(8):3495-7.
209. Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, Rottinghaus ST, Bow EJ, Cornely OA, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. Ann Intern Med. 2015;162(2):81-9.
210. Goncalves SS, Stchigel AM, Cano J, Guarro J, Colombo AL. In vitro antifungal susceptibility of clinically relevant species belonging to *Aspergillus* section Flavi. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(4):1944-7.
211. Heo MS, Shin JH, Choi MJ, Park YJ, Lee HS, Koo SH, et al. Molecular identification and amphotericin B susceptibility testing of clinical isolates of *Aspergillus* from 11 hospitals in Korea. Ann Lab Med. 2015;35(6):602-10.
212. Talbot JJ, Subedi S, Halliday CL, Hibbs DE, Lai F, Lopez-Ruiz FJ, et al. Surveillance for azole resistance in clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* in Australia and cyp51A homology modelling of azole-resistant isolates. J Antimicrob Chemother. 2018.
213. 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.
214. 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;72(12):3325-33.
215. Goncalves SS. Global Aspects of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* with Focus on Latin American Countries. J Fungi (Basel). 2017;3(1).
216. de Valk HA, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2007;45(5):1415-9.
217. Ahmad S, Khan Z, Hagen F, Meis JF. Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. Environ Res. 2014;133:20-6.
218. Kolwijck E, van der Hoeven H, de Sevaux RG, ten Oever J, Rijstenberg LL, van der Lee HA, et al. Voriconazole-Susceptible and Voriconazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Coinfection. Am J Respir Crit Care Med. 2016;193(8):927-9.
219. Menotti J, Waller J, Meunier O, Letscher-Bru V, Herbrecht R, Candolfi E. Epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a haematology unit by molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Hosp Infect. 2005;60(1):61-8.
220. Araujo R, Amorim A, Gusmao L. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. Med Mycol. 2010;48(6):832-8.
221. Debeaupuis JP, Sarfati J, Chazalet V, Latge JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus.* Infect Immun. 1997;65(8):3080-5.

222. Araujo R, Cabral JP, Rodrigues AG. Air filtration systems and restrictive access conditions improve indoor air quality in clinical units: *Penicillium* as a general indicator of hospital indoor fungal levels. Am J Infect Control. 2008;36(2):129-34.
223. Biancalana FS, Lyra L, Moretti ML, Schreiber AZ. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71(4):378-85.
224. Teixeira AB, Moretti ML, Machado HC, Nishimura K, Taguchi H, Schreiber AZ. Evaluation of the inhibitory effect of amphotericin B on the apical growth of *F. solani* using the BioCell-Tracer system. Mycoses. 2007;50(3):183-8.

8. Apêndices

Apêndice 1: *Aspergillus* spp. clínicos selecionados para o estudo

Paciente	LIF	Id morfológica prévia	Data da coleta	Ano	Especialidade médica	Amostra clínica
1	1043	*Aspergillus* spp.	5-jun	2007	Hematologia	lavado brônquico
2	671	*A. fumigatus*	18-jul	2005	Doenças infecciosas	escarro
	677	*A. fumigatus*	15-jul	2005	Medicina interna	escarro
3	79	*A. fumigatus*	28-ago	2000	NI	secreção de nasofaringe
	80	*A. fumigatus*	1-set	2000	NI	escarro
4	118	*A. fumigatus*	2-set	2003	Pneumologia	escarro
	375	*A. fumigatus*	19-mai	2003	Pneumologia	escarro
	391	*A. fumigatus*	13-jun	2003	Pneumologia	escarro
	413	*A. fumigatus*	5-ago	2003	Ambulatório de Lupus	escarro
	466	*A. fumigatus*	13-fev	2004	Pneumologia	escarro
5	770	*Aspergillus* spp.	14-jan	2006	Doenças infecciosas	escarro
	771	*Aspergillus* spp.	15-jan	2006	Doenças infecciosas	escarro
	772	*Aspergillus* spp.	16-jan	2006	Doenças infecciosas	escarro
6	268	Aspergillus spp.	3-jul	2002	Pneumologia	escarro
	318	*A. fumigatus*	24-out	2002	Pneumologia	escarro
7	279	*Aspergillus* spp.	5-ago	2002	Pneumologia	lavado brônquico
	420	*Aspergillus* spp.	12-set	2003	Pneumologia	lavado brônquico
8	1086	*Aspergillus* spp.	25-jul	2007	TMO	mucosa nasal
	1088	*Aspergillus s* pp.	1-ago	2007	Hematologia	mucosa do seio etmoidal
	1090	*Aspergillus* spp.	21-jul	2007	TMO	escarro
	1096	*Aspergillus* spp.	14-ago	2007	Hematologia	secreção do seio maxilar
9	523	*Aspergillus* spp.	9-ago	2004	Doenças infecciosas	escarro
	1079	*Aspergillus* spp.	11-jul	2007	Pneumologia	escarro
10	1248	*A. fumigatus*	2-mai	2008	Doenças infecciosas	escarro
	1249	*A. fumigatus*	5-mai	2008	Hematologia	escarro
11	1277	*A.fumigatus*	10-jun	2008	Pneumologia	escarro
	1288	*Aspergillus* spp.	10-jul	2008	Pneumologia	lavado brônquico
	1430	*Aspergillus* spp.	12-mai	2009	Medicina interna	escarro
12	1468	*Aspergillus* spp.	5-ago	2009	Pneumologia	escarro
	1478	*Aspergillus* spp.	22-ago	2009	Pneumologia	escarro
13	1474	*Aspergillus* spp.	11-ago	2009	Doenças infecciosas	biópsia de pele
14	321	*Aspergillus* spp.	26-nov	2002	Ophthalmology	secreção ocular
	355a	*Aspergillus* spp.	18-dez	2002	Ophthalmology	secreção ocular
	355b	*Aspergillus* spp.	18-dez	2002	Ophthalmology	secreção ocular
15	745	*A. fumigatus*	21-nov	2005	Medicina interna	escarro
	748	*Aspergillus* spp.	22-nov	2005	Doenças infecciosas	escarro
16	126a	*A. fumigatus*	19-mai	2004	NI	escarro
	126b	*A. niger*	19-mai		NI	escarro
17	290	*Aspergillus* spp.	3-set	2002	Emergência	escarro
	291	*Aspergillus* spp.	3-set	2002	Emergência	escarro
	1178	*Aspergillus* spp.	30-jan	2008	Medicina interna	escarro
18	362	*Aspergillus* spp.	10-abr	2003	Emergência	escarro
	363	*Aspergillus* spp.	10-abr	2003	Emergência	escarro
	364	Aspergillus *spp.*	10-abr	2003	Emergência	líquido pleural
	379	*A. fumigatus*	28-mai	2003	Emergência	líquido pleural
	769	*Aspergillus* spp.	9-jan	2006	Doenças infecciosas	escarro
	900	*Aspergillus* spp.	11-ago	2006	Doenças infecciosas	escarro

BAL: Lavado brônquico; Id: indentificação; NI: Não infomrado; P: paciente; TMO: Transplante de medula óssea

Apêndice 1: *Aspergillus* spp. clínicos selecionados para o estudo

Paciente	LIF	Id morfológica prévia	Data da coleta	Ano	Especialidade médica	Amostra clínica
19	197	*Aspergillus* spp.	27-ago	2001	Pneumologia	lavado brônquico
	198	*Aspergillus* spp.	30-ago	2001	Reumatologia	escarro
	200	*Aspergillus* spp.	12-set	2001	Reumatologia	escarro
20	1714	*A. flavus*	11-set	2010	Nefrologia	raspado inguinal
21	37	*A. flavus*	13-dez	1999	NI	swab de nasofaringe
	38	*A. flavus*	21-dez	1999	NI	BAL- pulmão direito
	40	*A. flavus*	4-jan	2000	NI	swab de orofaringe
	41	*Aspergillus* spp.	4-jan	2000	NI	swab perianal
	53	*A. terreus*	10-abr	2000	NI	swab de orofaringe
22	1165	*A. niger*	10-jan	2008	Pneumologia	escarro
	1169	*Aspergillus* spp.	11-jan	2008	Pneumologia	escarro
	1175	*Aspergillus* spp.	23-jan	2008	Pneumologia	lavado brônquico
23	898	*A. fumigatus*	9-ago	2006	Doenças infecciosas	escarro
	902	*A. fumigatus*	17-ago	2006	Doenças infecciosas	escarro
24	807	*A. fumigatus*	10-abr	2006	Medicina interna	escarro
25	109	*Aspergillus* spp.	23-jan	2002	NI	sangue
	108	*Aspergillus* spp.	23-jan	2002	NI	sangue
26	896	*A. fumigatus*	9-ago	2006	Medicina interna	escarro
	899	*A. fumigatus*	10-ago	2006	Medicina interna	escarro
	913	*Aspergillus* spp.	5-ago	2006	Medicina interna	escarro
	914	*Aspergillus* spp.	5-ago	2006	Medicina interna	escarro
27	104	*Aspergillus* spp.	24-jun	2002	Oncologia	escarro
	105	*Aspergillus* spp.	28-jun	2002	Oncologia	escarro
	264	*Aspergillus spp.*	26-jun	2002	Oncologia	escarro
	286	*A. fumigatus*	23-ago	2002	Oncologia	escarro
	269a	*Aspergillus* spp.	3-jul	2002	Pneumologia	lavado brônquico
	269b	*Aspergillus* spp.	3-jul	2002	Pneumologia	lavado brônquico
28	871	*A. fumigatus*	5-jul	2006	Fibrose cística	escarro
29	781	*Aspergillus* spp.	8-fev	2006	Pneumologia	escarro
	1515	*A. fumigatus*	22-out	2009	Pneumologia	lavado brônquico
30	1576	*Aspergillus* spp.	22-fev	2010	Pneumologia	lavado brônquico
	1381a	*A. fumigatus*	13-jan	2009	Medicina interna	escarro
	1381b	*A. fumigatus*	13-jan	2009	Medicina interna	escarro
31	825	*A. flavus*	18-mai	2006	Hematologia	raspado de língua
	835	*A. flavus*	23-mai	2006	Hematologia	úlcera de língua
32	2121	*A.terreus*	5-mai	2014	Pneumologia	escarro
33	1385	*A. fumigatus*	28-jan	2009	Nefrologia	escarro
	1386	*A. fumigatus*	30-jan	2009	Nefrologia	escarro
	1463	*A. fumigatus*	24-jul	2009	Nefrologia	escarro
	1464	*A. fumigatus*	27-jul	2009	Cirurgia toráxica	lavado brônquico
	1465	*A. fumigatus*	27-jul	2009	Cirurgia toráxica	lavado brônquico
	1466	*A. flavus*	27-jul	2009	Cirurgia toráxica	lavado brônquico
34	1123	*A. flavus*	17-out	2007	Hematologia	perfuração de septo
	1140	*A. flavus*	30-out	2007	Hematologia	biópsia de pele
35	1428	*Aspergillus* spp.	9-mai	2009	Pneumologia	escarro
	1572	*Aspergillus* spp.	30-jan	2010	Doenças infecciosas	escarro
	1597	*Aspergillus* spp.	26-abr	2010	Medicina interna	escarro
	1621	*A. fumigatus*	2-jan	2011	Emergência	escarro

BAL: Lavado brônquico; Id: indentificação; NI: Não infomrado; P: paciente; TMO: Transplante de medula óssea

Apêndice 1: *Aspergillus* spp. clínicos selecionados para o estudo

Paciente	LIF	Id morfológica prévia	Data da coleta	Ano	Especialidade médica	Amostra clínica
36	447	A. fumigatus	19-nov	2003	Cirurgia toráxica	lavado brônquico
	473	*A. fumigatus*	11-mar	2004	Doenças infecciosas	lavado brônquico
	475	*A. fumigatus*	11-mar	2004	Doenças infecciosas	BAL - pulmão esquerdo
	476	*A. fumigatus*	25-mar	2004	Doenças infecciosas	BAL - pulmão esuqerdo
	477	*A. fumigatus*	25-mar	2004	Doenças infecciosas	BAL - pulmão direito
37	824	*A. fumigatus*	16-mai	2006	Emergência	escarro
	885	*Aspergillus* spp.	24-jul	2006	Doenças infecciosas	escarro
38	222	*Aspergillus* spp.	18-jan	2002	Medical clinic	escarro
	1186	*Aspergillus* spp.	21-fev	2008	Medicina interna	escarro
	1188	*A. flavus*	25-fev	2008	Medicina interna	lavado brônquico
	1388	*Aspergillus* spp.	7-fev	2009	Pneumologia	escarro
39	1737	*A. flavus*	26-out	2010	Hematologia	secreção de nasofaringe
40	1031	*Aspergillus* spp.	8-mai	2007	Doenças infecciosas	escarro
	1134	*Aspergillus* spp.	4-out	2007	Doenças infecciosas	escarro
41	1089	*Aspergillus* spp.	3-jul	2007	Pneumologia	escarro
	1420	*A. niger*	6-mai	2009	Medicina interna	escarro
42	1482	*Aspergillus* spp.	7-set	2009	Medicina interna	escarro
	1673	*Aspergillus* spp.	24-set	2010	Medicina interna	escarro
43	1469	*A. fumigatus*	5-ago	2009	Cirurgia gástrica	escarro
44	382	*Aspergillus* spp.	26-mai	2003	Gastroenterologia	escarro
	383	*Aspergillus* spp.	30-mai	2003	Doenças infecciosas	escarro
45	1332	*Aspergillus* spp.	11-set	2008	Doenças infecciosas	escarro
	1756	*Aspergillus* spp.	11-fev	2011	Emergência	escarro
46	1325	*A.fumigatus*	4-set	2008	Medicina interna	secreção de cavidade nasal esquerda
47	170a	*Aspergillus* spp.	11-jul	2001	Imunologia	escarro
	170b	*Aspergillus* spp.	11-jul	2001	Imunologia	escarro
	252a	*Aspergillus* spp.	24-mai	2002	Pneumologia	escarro
	252b	*Aspergillus* spp.	24-mai	2002	Pneumologia	escarro
48	1028	*Aspergillus* spp.	1-mai	2007	Emergência	escarro
	1029	*Aspergillus* spp.	2-mai	2007	Emergência	escarro
49	122	*A. fumigatus*	9-out	2000	Pneumologia	swab de drenno pleural
	125	*A. fumigatus*	19-dez	2000	Pneumologia	secreção de pleurostomia
50	535	*Aspergillus* spp.	2-set	2004	Doenças infecciosas	biópsia brônquica
	538	*Aspergillus* spp.	2-set	2004	Doenças infecciosas	lavado brônquico
	1353	*Aspergillus* spp.	14-nov	2008	Pneumologia	escarro
	1354	*Aspergillus* spp.	15-nov	2008	Pneumologia	escarro
	1355	*Aspergillus* spp.	16-nov	2008	Pneumologia	escarro
51	1168	*A. fumigatus*	14-jan	2008	Doenças infecciosas	escarro
	1361	*Aspergillus* spp.	3-dez	2008	Doenças infecciosas	escarro
52	665	*Aspergillus* spp.	8-jul	2005	Pneumologia	escarro
	685	*A. fumigatus*	1-ago	2005	Pneumologia	lavado brônquico
	945	*A. fumigatus*	21-nov	2006	Pneumologia	lavado brônquico
	953	*Aspergillus* spp.	11-jan	2006	Pneumologia	escarro
53	932	*A. fumigatus*	30-out	2006	Pneumologia	escarro
	935	*A. fumigatus*	7-nov	2006	Pneumologia	escarro
	1519	*A. fumigatus*	30-out	2009	Medicina interna	escarro
54	1954	*A. fumigatus*	27-out	2012	Doenças infecciosas	biópsia pulmão esquerdo

BAL: Lavado brônquico; Id: indentificação; NI: Não infomrado; P: paciente; TMO: Transplante de medula óssea

Apêndice 1: *Aspergillus* spp. clínicos selecionados para o estudo

Paciente	LIF	Id morfológica prévia	Data da coleta	Ano	Especialidade médica	Amostra clínica
54	1955	*A. fumigatus*	27-out	2012	Doenças infecciosas	biópsia pulmão esquerdo
55	456	*Aspergillus* spp.	2-jan	2004	Doenças infecciosas	escarro
56	1780	*A. flavus*	27-abr	2011	Hematologia	biópsia da crosta mucoseptal direita
57	2109	*Aspergillus* spp.	19-dez	2013	Oftalmologia	córnea olho direito
	2110	*Aspergillus* spp.	19-dez	2013	Oftalmologia	raspado olho de olho direito
58	289	*Aspergillus* spp.	29-ago	2002	Oncologia	escarro
	358	*A. niger*	7-abr	2003	Pneumologia	lavado brônquico
59	880	*A. fumigatus*	18-jul	2006	Doenças infecciosas	escarro
	883	*A. niger*	20-jul	2006	Doenças infecciosas	raspado de couro cabeludo
60	180	*Aspergillus* spp.	9-ago	2001	Doenças infecciosas	escarro
	205	A. fumigatus	28-set	2001	Doenças infecciosas	secreção pulmonar
61	1952	*Aspergillus* spp.	25-out	2012	Pneumologia	escarro
	1953	*Aspergillus* spp.	25-out	2012	Pneumologia	escarro
	1962	*A. niger*	25-out	2012	Doenças infecciosas	escarro
	1956a	*Aspergillus* spp.	1-nov	2012	Doenças infecciosas	lavado brônquico
	1956b	*Aspergillus* spp.	1-nov	2012	Doenças infecciosas	lavado brônquico
62	789	*A. niger*	9-mar	2006	Pneumologia	escarro
	808	*A. niger*	10-abr	2006	Doenças infecciosas	escarro
63	191	*A. fumigatus*	21-nov	2001	Emergência	swab de pleurostomia
64	658	*Aspergillus* spp.	28-jun	2005	Nefrologia	urina
	664	*A. flavus*	7-jul	2005	Nefrologia	cateter pigtail
	715	*A. flavus*	7-jul	2005	Nefrologia	cateter pigtail
	723	*Aspergillus* spp.	14-ago	2005	Nefrologia	urina
65	1546	*Aspergillus* spp.	24-dez	2009	Pneumologia	escarro
	1553	*Aspergillus* spp.	23-dez	2010	Medicina interna	escarro
	1569	*Aspergillus* spp.	26-jan	2010	Medicina interna	escarro
	1889	*Aspergillus* spp.	16-dez	2011	Pneumologia	escarro
66	1091	*Aspergillus* spp.	6-ago	2007	Pneumologia	escarro
	1097	*Aspergillus* spp.	16-ago	2007	Pneumologia	lavado brônquico
67	83	*Aspergillus* spp.	30-mai	2006	Pneumologia	escarro
	669	*Aspergillus* spp.	15-jul	2005	Tisiologia	escarro
	838	*A. fumigatus*	1-jun	2006	Pneumologia	escarro
	855	*Aspergillus* spp.	6-jun	2006	Pneumologia	escarro
	864	*A. fumigatus*	21-jun	2006	Pneumologia	escarro
	968	*Aspergillus* spp.	7-fev	2007	Pneumologia	escarro
68	1283	*Aspergillus* spp.	25-jun	2008	Pneumologia	lavado brônquico
69	577	*Aspergillus* spp.	10-dez	2004	Pneumologia	escarro
	578	*Aspergillus* spp.	13-dez	2004	Pneumologia	BAL-pulmão direito
	579	*Aspergillus* spp.	13-dez	2004	Pneumologia	BAL-pulmão esquerdo
70	780	*A. niger*	29-dez	2006	Pneumologia	escarro
	978	*A. fumigatus*	28-fev	2007	Pneumologia	escarro
71	1270	*Aspergillus* spp.	4-ago	2008	Pneumologia	escarro
	1443	*A. flavus*	15-jun	2009	Pneumologia	escarro
72	2115	*Aspergillus clavatus*	14-nov	2013	Nefrologia	líquido peritoneal
73	1534	*A. fumigatus*	26-nov	2009	Medicina interna	secreção endotraqueal
	1543	*A. fumigatus*	14-dez	2009	Pneumologia	secreção endotraqueal
74	1351	*Aspergillus* spp.	10-nov	2008	Pneumologia	escarro

BAL: Lavado brônquico; Id: indentificação; NI: Não infomrado; P: paciente; TMO: Transplante de medula óssea

Apêndice 1: *Aspergillus* spp. clínicos selecionados para o estudo

Paciente	LIF	Id morfológica prévia	Data da coleta	Ano	Especialidade médica	Amostra clínica
74	1670	*Aspergillus* spp.	12-ago	2010	Pneumologia	lavado brônquico
75	417	*Aspergillus* spp.	28-ago	2003	Neurologia	escarro
	419	*A. fumigatus*	11-set	2003	Doenças infecciosas	Lavado brônquico
76	91	*A. fumigatus*	5-abr	2001	NI	escarro
	95	*A. fumigatus*	1-mai	2001	NI	escarro
	97	*A. fumigatus*	4-mai	2001	NI	Lavado brônquico
	98	*A. fumigatus*	4-mai	2001	NI	mucosa
77	150	*A. niger*	22-mai	2001	Pneumologia	escarro
	187	*Aspergillus* spp.	5-set	2001	Emergência	escarro
78	1075	*Aspergillus* spp.	7-jul	2007	Doenças infecciosas	escarro
	1076	*Aspergillus* spp.	9-jul	2007	Doenças infecciosas	escarro
	1083	*Aspergillus* spp.	19-jul	2007	Pneumologia	lavado brônquico
	1084	*Aspergillus* spp.	19-jul	2007	Pneumologia	biópsia brônquica
79	561	*Aspergillus* spp.	5-nov	2004	Tisiologia	escarro
	582	*Aspergillus* spp.	21-mai	2005	Pneumologia	escarro
	588	*Aspergillus* spp.	21-jan	2005	Pneumologia	escarro
80	1293	*A. fumigatus*	21-jun	2008	Doenças infecciosas	escarro
81	1527	*A. flavus*	17-nov	2009	Doenças infecciosas	escarro
	1530	*Aspergillus* spp.	18-nov	2009	Doenças infecciosas	escarro
82	862	*A. fumigatus*	20-jun	2006	Pneumologia	escarro
	1018	*Aspergillus* spp.	18-abr	2007	Pneumologia	escarro
83	401	*A. fumigatus*	24-jul	2003	Pneumologia	escarro
	402	*A. fumigatus*	25-jul	2003	Pneumologia	escarro
	403	*Aspergillus* spp.	28-jul	2003	Pneumologia	escarro
84	499	*Aspergillus* spp.	8-jun	2004	Doenças infecciosas	secreção ocular
85	686	*Aspergillus* spp.	3-ago	2005	Doenças infecciosas	escarro
	691	*Aspergillus* spp.	10-ago	2005	Doenças infecciosas	escarro
86	1305	*Aspergillus* spp.	22-jul	2008	Pediatria	escarro
	1315	*A. terreus*	15-ago	2008	Pediatria	escarro
	1316	*Aspergillus* spp.	15-ago	2008	Pediatria	escarro
87	736	*Aspergillus* spp.	25-out	2005	Pneumologia	escarro
	872	*Aspergillus* spp.	5-jul	2006	Pneumologia	escarro
	1957	*Aspergillus* spp.	7-nov	2012	Doenças infecciosas	escarro
88	603	*A. fumigatus*	2-mar	2005	Medicina interna	escarro
	649	*A. fumigatus*	14-jun	2005	Doenças infecciosas	escarro
	651	*A. fumigatus*	16-jun	2005	Doenças infecciosas	escarro
	697	*A. fumigatus*	18-ago	2005	Medicina interna	escarro
89	1617	*Aspergillus* spp.	18-mai	2010	Oftalmologia	secreção ocular olho esquerdo
	1643	*A. flavus*	31-mai	2010	Oftalmologia	receptor cornea
90	1618	*Aspergillus* spp.	13-set	2010	Dermatologia	raspado de pele de hallux esquerdo
	1675	*Aspergillus* spp.	13-set	2010	Dermatologia	raspado de pele de hallux direito
91	388	*A. fumigatus*	17-jun	2003	Doenças infecciosas	escarro
	411	*A. fumigatus*	30-jul	2003	Doenças infecciosas	escarro
92	72	*A. fumigatus*	16-jul	2000	NI	escarro
	74	*Aspergillus* spp.	16-jul	2000	NI	escarro

BAL: Lavado brônquico; Id: indentificação; NI: Não infomrado; P: paciente; TMO: Transplante de medula óssea

Apêndice 2: Identificação molecular da região ITS4/5 e β-tubulina 2A/2B dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Identificação molecular de *Aspergillus* spp.			
		ITS 4/5	BT2AB
LIF	Identificação preliminar	Identificação	Identificação
37	*A. flavus*	*A flavus*	*A.flavus*
38	*A. flavus*	*A flavus Davidiella sp A.oryzae*	*A.flavus*
40	*A. flavus*	*A flavus*	*A.flavus*
41	*Aspergillus sp (terreus)*	*A.terreus*	*A.terreus*
53	*A. terreus*	*A.terreus*	*A.terreus*
72	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
74	*Aspergillus sp (terreus)*	*A.terreus*	*A.terreus*
79	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
80	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
91	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
95	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
97	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
98	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
104	*Aspergillus sp*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
105	*Aspergillus sp*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
108	*Aspergillus sp (terreus)*	*A.terreus*	*A.terreus*
109	*Aspergillus sp (terreus)*	*A.terreus*	*A.terreus*
118	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
122	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
125	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
126a	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
126b	*A. niger*	*A.niger*	*A.niger*
150	*A. niger*	*A.tubingensis*	*A.tubingensis*
170a	*Aspergillus* sp	*A.niger A.awamori*	*A.niger*
180	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
187	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
191	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
197	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
198	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
200	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
205	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
222	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
252a	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
252b	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
264	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
268	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
269a	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
269b	*Aspergillus* sp	*A.terreus*	*A.terreus*
279	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
286	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
289	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
290	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
291	*Aspergillus* sp	*A.parasiticus*	*A.parasiticus*
318	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
321	*Aspergillus* sp	*A.flavus*	*A.flavus*
355 a	*Aspergillus* sp	*A.flavus, A.parasititicus*	*A.flavus*
355b	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
358	*A. niger*	*A.niger*	*A.niger*
362	*Aspergillus* sp (terreus)	*A.terreus*	*A.terreus*
363	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
364	*Aspergillus sp (terreus)*	*A.terreus, A.tubingensis, Aspergillus sp*	*A.terreus*
375	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
379	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
382	*Aspergillus* sp	*A.flavus*	*A.flavus*
383	*Aspergillus* sp	*A.nidulans, A.variecolor, E.nidulans*	*A.nidulans*
388	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*

Apêndice 2: Identificação molecular da região ITS4/5 e β-tubulina 2A/2B dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Identificação molecular de *Aspergillus* spp.			
		ITS 4/5	BT2AB
LIF	Identificação preliminar	Identificação	Identificação
391	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
401	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
402	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
403	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
411	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
413	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
417	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
419	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
420	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
447	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
456	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
466	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
473	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
475	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
476	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
477	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
499	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
523	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
535	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
538	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
561	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
577	*Aspergillus* sp	*E.nidulans, E.rugulosa, A.variecolor*	*A.nidulans*
578	*Aspergillus* sp	*A.ochraceus, A.sepultus, A.ostianus*	*A.ochraceus*
579	*Aspergillus* sp	*A.clavatus*	*A.clavatus*
582	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
588	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
603	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
649	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A fumigatus*
651	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
658	*Aspergillus* sp	*A.flavus*	*A.flavus*
664	*A. flavus*	*A.flavus*	*A.flavus*
665	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
669	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
671	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
677	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
685	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
686	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A fumigatus*
691	*Aspergillus* sp	*A.flavus*	*A.flavus*
697	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
715	*A. flavus*	*A.flavus*	*A.flavus*
723	*Aspergillus* sp (flavus)	*A.flavus*	*A.flavus*
736	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
745	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
748	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
769	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
770	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
771	*Aspergillus* sp	*A.versicolor/ A.sidowii*	*A.sidowii*
772	*Aspergillus* sp	*A.versicolor/ A.sidowii*	*A.sidowii*
780	*A. niger*	*A.tubingensis/ A.niger*	*A.tubingensis*
781	*Aspergillus sp*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
789	*A. niger*	*A.niger/ A.awamori*	*A.niger*
807	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
808	*A. niger*	*A.niger/A.awamori*	*A.niger*
824	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
825	*A. flavus*	*A.flavus/ A.oryzae*	*A.flavus*
835	*A. flavus*	*A.flavus/ Davidiella sp.*	*A.flavus*
837	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus/ Aspergillus sp*	*A.fumigatus*
838	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*

Apêndice 2: Identificação molecular da região ITS4/5 e β-tubulina 2A/2B dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Identificação molecular de *Aspergillus* spp.			
		ITS 4/5	BT2AB
LIF	Identificação preliminar	Identificação	Identificação
855	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus/ Aspergillus sp*	*A.fumigatus*
862	*A. fumigatus*	*A.fumigatus/ Aspergillus sp*	*A.fumigatus*
864	A. fumigatus	*A.fumigatus/ Aspergillus sp*	*A.fumigatus*
871	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
872	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
880	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
883	*A. niger*	*A.niger*	*A.niger*
885	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
896	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
898	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
899	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
900	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
902	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
913	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
914	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
932	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
935	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
945	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
953	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
968	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
978	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1018	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1028	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1029	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1031	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1043	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1075	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1076	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1079	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1083	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1084	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1086	*Aspergillus* sp (flavus)	*A.flavus*	*A.flavus*
1088	*Aspergillus sp (flavus)*	*A.flavus*	*A.flavus*
1089	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1090	*Aspergillus sp (flavus)*	*A.flavus*	*A.flavus*
1091	*Aspergillus* sp	*A.clavatus*	*A.clavatus*
1096	*Aspergillus sp (flavus)*	*A.flavus*	*A.flavus*
1097	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1123	*A. flavus*	*A.flavus*	*A.flavus*
1134	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1140	*A. flavus*	*A.flavus*	*A.flavus*
1165	*A. niger*	*A.niger A.tubingensis*	*A.niger*
1168	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1169	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1175	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1178	*Aspergillus* sp (niger)	*A.niger*	*A.niger*
1186	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1188	*A. flavus*	*A.flavus/ A.oryzae*	*A.flavus*
1248	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1249	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1270	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1277	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1283	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1288	*Aspergillus* sp	*N.hiratsukae*	*N.hiratsukae*
1293	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1305	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1315	*A. terreus*	*A.terreus*	*A.terreus*
1325	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1332	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1351	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*

Apêndice 2: Identificação molecular da região ITS4/5 e β-tubulina 2A/2B dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Identificação molecular de *Aspergillus* spp.			
		ITS 4/5	BT2AB
LIF	Identificação preliminar	Identificação	Identificação
1353	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1354	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1355	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1361	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1381a	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1381b	*A. fumigatus*	*A.flavus*	*A.flavus*
1385	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1386	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1388	*Aspergillus* sp	*A.flavus Davidiella sp*	*A.flavus*
1428	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1430	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1443	*A. flavus*	*A.partasiticus* *A.transmontanesis*	*A.parasiticus*
1463	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1464	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1465	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1466	*A. flavus*	*A.flavus A.parvisclerotigenus*	*A.flavus*
1468	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1469	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1474	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1478	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1482	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1515	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1519	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1527	*A. flavus*	*A.flavus*	*A.flavus*
1530	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1534	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1543	A. fumigatus	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1546	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1553	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1569	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1572	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1576	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1597	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1618	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1621	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1643	*A. flavus*	*A.flavus*	*A.flavus*
1670	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1673	*Aspergillus* sp (terreus)	*A.terreus*	*A.terreus*
1675	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1714	*A. flavus*	*A.flavus/A.oryzae*	*A.flavus*
1737	*A. flavus*	*A.flavus A.minisclerotigenes*	*A.flavus*
1756	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1780	*A. flavus*	*A.flavus A.parasiticus*	*A.parasiticus*
1889	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1952	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1953	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1954	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1955	*A. fumigatus*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1956a	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1957	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
1962	*A. niger*	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
2109	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
2110	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
2115	*Aspergillus* sp	*A.fumigatus*	*A.fumigatus*
2121	*A.terreus*	*A.terreus*	*A.terreus*

Apêndice 3: *Aspergillus* spp. ambientais obtidos no presente estudo e identificação molecular da β-tubulina 2A/2B

Isolados ambientais de *Aspergillus*

LIF	Morfologia	Sítio de coleta	Data	Espécie BT2A/2B
AF1	*A. flavus*	540-1	16/03/15	*A. parasiticus*
AF2	*A. flavus*			*A. flavus*
AF3	*A. flavus*	540-2	16/03/15	*A. parasiticus*
				A. chungii
AF4	*A. flavus*	540-3	16/03/15	*A. flavus*
AF5	*A. flavus*	540-3	16/03/15	*A. parasiticus*
				A. chungii
AF6	*A. flavus*	540-4	16/03/15	*A. chungii*
				A. flavus
AF7	*A. flavus*	540-4	16/03/15	*A. parasiticus*
				A. sojae
AF8	*A. flavus*	540-4	16/03/15	*A. parasiticus*
				A. sojae
AF9	*A. fumigatus*	540-4	16/03/15	*A. fumigatus*
AF10	*A. niger*	542-1	16/03/15	*A. brasiliensis*
AF11	*A. flavus*	542-1	16/03/15	*A. flavus*
AF12	*A. flavus*	542-2	16/03/15	*A. flavus*
AF13	*A. flavus*	542-2	16/03/15	*A. flavus*
AF14	*A. flavus*	542-3	16/03/15	*A. chungii*
				A. flavus
				A. arachidicola
				A. sojae
AF15	*A. flavus*	542-3	16/03/15	*A. flavus*
				A. oryzae
AF16	*A. flavus*	542-3	16/03/15	*A. flavus*
				A. oryzae
AF17	*A. flavus*	542-3	16/03/15	*A. oryzae*
AF18	*A. flavus*			*A. parasiticus*
				A. sojae
AF19	*Aspergillus* spp.	532-2	26/05/15	_
AF20	*A. niger*	532-1	26/05/15	*A. niger*
AF21	*A. niger*	542-2	26/05/15	*A. tubingensis*
AF22	*A. niger*	542-3	26/05/15	*A. niger*
AF23	*A. niger*	532-2	26/05/15	*A. japonicus*
				A. violaceofuscus
AF24	*A. fumigatus*	542-1	26/05/15	*A. fumigatus*
AF25	*A. fumigatus*	534-3	26/05/15	*A. fumigatus*
AF26	*A. fumigatus*	532-4	26/05/15	*A. fumigatus*
AF27	*A. fumigatus*	534-2	26/05/15	*A. fumigatus*
AF28	*A. fumigatus*	532-1	26/05/15	*A. fumigatus*
AF29	*A. fumigatus*	532-4	26/05/15	*A. fumigatus*
AF30	*A. fumigatus*	532-1	26/05/15	*A. fumigatus*
AF31	*A. fumigatus*	534-1	26/05/15	*A. fumigatus*
AF32	*A. fumigatus*	456-2	26/05/15	*A. fumigatus*
AF33	*A. fumigatus*	456-2	26/05/15	*A. fumigatus*
AF34	*A. fumigatus*	534-3	26/05/15	*A. fumigatus*
AF35	*A. fumigatus*	532-4	26/05/15	*A. fumigatus*
AF36	*A. fumigatus*	546-4	26/05/15	*A. fumigatus*

Apêndice 3: *Aspergillus* spp. ambientais obtidos no presente estudo e identificação molecular da β-tubulina 2A/2B

Isolados ambientais de *Aspergillus*

LIF	Morfologia	Sítio de coleta	Data	Espécie BT2A/2B
AF37	*A.clavatus*	542-3	26/05/15	*A. clavatonanicus*
				A. clavatus
AF38	*A. flavus*	542-2	26/05/15	*A. flavus*
				A. oryzae
AF39	*Aspergillus* spp.	450	26/05/15	*A. sydowii*
AF 42	*Aspergillus* spp.	450	26/05/15	*A. sydowii*
AF100	*A. fumigatus*	534-1	26/05/15	*A. fumigatus*
AF101	*A. flavus*	542-4	26/05/15	*A. chungii*
				A. parasiticus
				A. arachidicola
				A. sojae
AF102	*A. fumigatus*	450-1	11/06/15	*A. fumigatus*
AF103	*A. fumigatus*	450-4	11/06/15	*A. fumigatus*
AF104	*A. fumigatus*	450-4	11/06/15	*A. fumigatus*
AF105	*A. fumigatus*	corredor 450	11/06/15	*A. fumigatus*
AF106	*A. fumigatus*	corredor 450	11/06/15	*A. fumigatus*
AF107	*A. fumigatus*	corredor 450	11/06/15	*A. fumigatus*
AF108	*Aspergillus spp.*	swab úmido saída	11/06/15	*A. sydowii*
AF109	*A. fumigatus*	corredor entrada	11/06/15	*A. fumigatus*
AF121	*Aspergillus spp.*	swab úmido saída	11/06/15	*A. sydowii*
AF122	*A. fumigatus*	534-1	28/07/15	*A. fumigatus*
AF123	*A. flavus*	542-1	28/07/15	*A. flavus*
AF124	*A. fumigatus*	542-1	28/07/15	*A. fumigatus*
AF125	*A. fumigatus*	544-3	28/07/15	*A. fumigatus*
AF126	*A. fumigatus*	544-3	28/07/15	*A. fumigatus*
AF127	*Aspergillus spp.*	544-3	28/07/15	*A. calidoustus*
				A. pseudodeflectus
				A. ustus
AF128	*Aspergillus spp.*	456-2	28/07/15	*A. unguis*
AF129	*A. fumigatus*	Corredor TMO 1	28/07/15	*A. fumigatus*
AF130	*A. flavus*	Corredor Hemato 2	28/07/15	*A. arachidicola*
				A. parasiticus
				A. chungii
				A. sojae
AF131	*A. niger*	Corredor Hemato 3	28/07/15	*A. brasiliensis*
AF132	*A. niger*	Corredor Hemato 3	28/07/15	*A. niger*
AF133	*A. flavus*	Corredor Hemato 3	28/07/15	*A. flavus*
				A. oryzae
AF134	*A. fumigatus*	Corredor Hemato 4	28/07/15	*A. fumigatus*
AF135	*A. fumigatus*	454-1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF136	*A. fumigatus*	454-3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF137	*A. fumigatus*	454-4	10/11/15	*A. fumigatus*
AF138	*A. fumigatus*	454-4	10/11/15	*A. fumigatus*
AF139	*A. fumigatus*	460-1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF140	*A. fumigatus*	460-3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF141	*A. fumigatus*	Corredor TMO 1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF142	*A. fumigatus*	Corredor TMO 1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF143	*A. fumigatus*	Corredor TMO 1	10/11/15	*A. fumigatus*

Apêndice 3: *Aspergillus* spp. ambientais obtidos no presente estudo e identificação molecular da β-tubulina 2A/2B

Isolados ambientais de *Aspergillus*

LIF	Morfologia	Sítio de coleta	Data	Espécie BT2A/2B
AF144	*A. fumigatus*	Corredor TMO 1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF145	*A. fumigatus*	Corredor TMO 1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF146	*A. fumigatus*	Corredor TMO 1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF147	*A. fumigatus*	Corredor TMO 2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF148	*A. fumigatus*	Corredor TMO 2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF149	*A. niger*	Corredor TMO 2	10/11/15	*A. tubingensis*
AF150	*A. fumigatus*	Corredor TMO 3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF151	*A. fumigatus*	Corredor TMO 3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF152	*A. fumigatus*	Corredor TMO 3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF153	*Aspergillus spp.*	Corredor TMO 3	10/11/15	*A. spinulosporus* *A. delacroxii* *A. nidulans*
AF154	*A. niger*	Corredor TMO 4	10/11/15	*A. tubingensis*
AF155	*A.terreus*	Corredor TMO 4	10/11/15	*A. terreus*
AF156	*A. fumigatus*	Corredor TMO 4	10/11/15	*A. fumigatus*
AF157	*A. niger*	532-1	10/11/15	*A. niger*
AF158	*A. niger*	532-1	10/11/15	*A. niger*
AF159	*A. fumigatus*	532-1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF160	*A. fumigatus*	532-1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF161	*A. fumigatus*	532-1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF162	*A. flavus*	532-1	10/11/15	*A. flavus* *A. parasiticus* *A. sojae* *A. arachidicola*
AF163	*A. fumigatus*	532-2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF164	*A. fumigatus*	532-2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF165	*A. fumigatus*	532-2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF166	*A. fumigatus*	532-2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF167	*A. fumigatus*	532-2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF168	*A. fumigatus*	532-3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF169	*A. fumigatus*	532-3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF170	*A. fumigatus*	532-3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF171	*A. fumigatus*	532-3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF172	*A. fumigatus*	532-3	10/11/15	*A. fumigatus*
AF173	*A.terreus*	532-4	10/11/15	*A. terreus*
AF174	*A. fumigatus*	534-1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF175	*A. fumigatus*	534-1	10/11/15	*A. fumigatus*
AF176	*A. niger*	534-1	10/11/15	*A. niger*
AF177	*A. niger*	534-1	10/11/15	*A. niger*
AF178	*A. fumigatus*	534-2	10/11/15	*A. fumigatus*
AF179	*A. niger*	534-2	10/11/15	*A. niger*
AF180	*A. niger*	534-3	10/11/15	*A. niger*
AF181	*A. niger*	548-1	10/11/15	*A. tubingensis*
AF182	*Aspergillus spp.*	548-2	10/11/15	*A. delacroxii* *A. nidulans*
AF183	*A. niger*	548-2	10/11/15	*A. niger*
AF184	*A. niger*	548-4	10/11/15	*A. tubingensis*
AF185	*A. niger*	548-4	10/11/15	*A. niger*

Apêndice 3: *Aspergillus* spp. ambientais obtidos no presente estudo e identificação molecular da β-tubulina 2A/2B

Isolados ambientais de *Aspergillus*				
LIF	**Morfologia**	**Sítio de coleta**	**Data**	**Espécie BT2A/2B**
AF186	*A.terreus*	548-4	10/11/15	*A. terreus*
AF187	*Aspergillus spp.*	548-4	10/11/15	*Emericella spp.* *A. nidulans* *A. delacroxii* *A. spinulosporus*
AF188	*A.terreus*	548-4	10/11/15	*A. terreus*
AF189	*A. niger*	Corredor Hemato 2	10/11/15	*A. niger*
AF190	*A. niger*	Corredor Hemato 2	10/11/15	*A. brasiliensis*
AF191	*A. niger*	Corredor Hemato 2	10/11/15	*A. niger*
AF192	*A. niger*	Corredor Hemato 3	10/11/15	*A. niger*
AF193	*A. niger*	Corredor Hemato 4	10/11/15	*A. niger*

Apêndice 4: Resultados de CIM e CEM de 5 antifúngicos contra isolados clínicos de *Aspergillus*

LIF	Id Molecular	CIM/CEM* mg L^{-1}				
		AMB	ITZ	VRZ	MCF*	CPF*
37	*A.flavus*	4	0,5	1	≤0,015	0,25
38	*A.flavus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
40	*A.flavus*	4	0,5	1	0,06	0,5
41	*A.terreus*	2	1	2	≤0,015	0,25
53	*A.terreus*	2	1	4	≤0,015	0,25
72	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
74	*A.terreus*	2	1	4	≤0,015	0,25
79	*A.fumigatus*	2	1	1	≤0,015	0,25
80	*A.fumigatus*	2	2	4	≤0,015	0,125
91	*A.fumigatus*	2	0,5	1	≤0,015	0,25
95	*A.fumigatus*	2	1	4	0,06	0,25
97	*A.fumigatus*	1	2	2	≤0,015	0,25
98	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
104	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
105	*A.fumigatus*	2	1	1	0,03	0,25
108	*A.terreus*	>16	0,5	4	≤0,015	0,25
109	*A.terreus*	>16	0,5	2	≤0,015	0,25
118	*A.fumigatus*	2	0,5	1	≤0,015	0,25
122	*A.fumigatus*	2	0,5	1	≤0,015	0,25
125	*A.fumigatus*	2	1	1	0,03	0,25
150	*A.tubingensis*	1	2	4	≤0,015	0,25
180	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	0,03	0,25
187	*A.fumigatus*	4	1	1	0,03	0,25
191	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	0,03	0,25
197	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	≤0,015	0,125
198	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	≤0,015	0,125
200	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	≤0,015	0,125
205	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	≤0,015	0,25
222	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
264	*A.fumigatus*	2	1	1	0,03	0,25
268	*A.fumigatus*	1	1	2	≤0,015	0,25
279	*A.fumigatus*	8	0,5	0,5	≤0,016	0,25
286	*A.fumigatus*	1	1	1	0,06	0,25
289	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
290	*A.fumigatus*	2	0,5	1	0,03	0,125
291	*A.parasiticus*	2	0,25	1	0,03	0,5
318	*A.fumigatus*	0,5	1	1	≤0,015	0,25
321	*A.flavus*	4	0,25	1	0,03	0,5
358	*A.niger*	1	2	2	≤0,015	0,25
362	*A.terreus*	2	1	2	≤0,015	0,25
363	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	0,03	0,5

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; isolados; CEM*: concentração efetiva mínima; MCF: micafungina; CPF: caspofungina; NC: não cresceu no teste

Apêndice 4: Resultados de CIM e CEM de 5 antifúngicos contra isolados clínicos de *Aspergillus*

LIF	Id Molecular	CIM/CEM* mg L^{-1}				
		AMB	ITZ	VRZ	MCF*	CPF*
364	*A.terreus*	2	1	2	≤0,015	0,25
375	*A.fumigatus*	2	1	1	≤0,015	0,25
379	*A.fumigatus*	2	1	1	0,03	0,25
382	*A.flavus*	2	0,25	0,5	0,03	0,5
383	*E.nidulans*	2	0,5	0,25	0,03	0,125
388	*A.fumigatus*	2	0,5	2	0,03	0,25
391	*A.fumigatus*	1	0,5	2	≤0,015	0,25
401	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	0,03	0,5
402	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
403	*A.fumigatus*	1	1	4	0,03	0,25
411	*A.fumigatus*	1	1	4	≤0,015	0,25
413	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,5
417	*A.fumigatus*	4	0,5	0,5	0,03	0,25
419	*A.fumigatus*	2	0,5	1	0,03	0,25
420	*A.fumigatus*	1	1	1	0,06	0,25
447	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
456	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,125
466	*A.fumigatus*	8	0,25	0,25	NC	NC
473	*A.fumigatus*	0,5	0,5	1	0,03	0,25
475	*A.fumigatus*	1	1	2	0,06	0,25
476	*A.fumigatus*	1	1	2	0,06	0,25
477	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,5
499	*A.fumigatus*	1	1	2	0,06	0,25
523	*A.fumigatus*	1	0,5	1	0,03	0,25
535	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
538	*A.fumigatus*	1	1	2	≤0,015	0,25
561	*A.fumigatus*	1	1	2	0,03	0,25
577	*E.nidulans*	4	1	1	≤0,015	0,5
578	*A.ochraceus, A.ostianus*	4	1	0,5	≤0,015	0,5
579	*A.clavatus*	1	2	2	0,03	0,5
582	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	≤0,015	0,25
588	*A.fumigatus*	1	1	2	≤0,015	0,25
603	*A.fumigatus*	0,5	0,5	1	0,03	0,25
649	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
651	*A.fumigatus*	0,5	0,5	1	≤0,015	0,25
658	*A.flavus*	2	0,5	1	0,03	0,5
664	*A.flavus*	2	0,5	1	0,03	0,5
665	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
669	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
671	*A.fumigatus*	1	0,5	2	0,03	0,25
677	*A.fumigatus*	1	0,5	1	0,03	0,25

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; isolados; CEM*: concentração efetiva mínima; MCF: micafungina; CPF: caspofungina; NC: não cresceu no teste

Apêndice 4: Resultados de CIM e CEM de 5 antifúngicos contra isolados clínicos de *Aspergillus*

LIF	Id Molecular	CIM/CEM* mg L^{-1}				
		AMB	ITZ	VRZ	MCF*	CPF*
685	*A.fumigatus*	0,5	0,5	1	0,03	0,25
686	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	NC	0,25
691	*A.flavus*	1	1	0,5	0,03	0,25
697	*A.fumigatus*	0,5	0,5	4	0,03	0,25
715	*A.flavus*	1	0,5	0,5	0,03	0,5
723	*A.flavus*	2	1	1	0,06	0,5
736	*A.fumigatus*	1	1	2	0,03	0,25
745	*A.fumigatus*	0,5	0,5	1	≤0,015	0,25
748	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
769	*A.fumigatus*	0,5	0,5	1	0,03	0,25
770	*A.fumigatus*	4	1	4	≤0,015	0,06
771	*A.sidowii*	4	1	2	≤0,015	0,06
772	*A.sidowii*	1	2	1	≤0,015	0,25
780	*A.tubingensis*	0,5	0,5	1	≤0,015	0,25
781	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
789	*A.niger/ A.awamori*	0,5	1	1	≤0,015	0,25
807	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
808	*A.niger*	0,5	1	2	≤0,015	0,25
824	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
825	*A.flavus/ A.oryzae*	2	0,5	1	0,06	0,5
835	*A.flavus*	2	0,5	1	0,03	0,5
837	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
838	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
855	*A.fumigatus*	0,5	1	2	≤0,015	0,25
862	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
864	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
871	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
872	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
880	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
883	*A.niger*	0,5	1	1	≤0,015	0,25
885	*A.fumigatus*	1	1	8	0,03	0,25
896	*A.fumigatus*	2	1	1	0,03	0,25
898	*A.fumigatus*	1	0,5	1	0,03	0,25
899	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
900	*A.fumigatus*	1	1	2	≤0,015	0,25
902	*A.fumigatus*	1	1	2	0,06	0,25
913	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	0,03	0,25
914	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	0,06	0,25
932	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
935	*A.fumigatus*	1	1	0,5	≤0,015	0,25

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; isolados; CEM*: concentração efetiva mínima; MCF: micafungina; CPF: caspofungina; NC: não cresceu no teste

Apêndice 4: Resultados de CIM e CEM de 5 antifúngicos contra isolados clínicos de *Aspergillus*

LIF	Id Molecular	CIM/CEM* mg L^{-1}				
		AMB	ITZ	VRZ	MCF*	CPF*
945	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
953	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
968	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
978	*A.fumigatus*	2	1	2	0,03	0,25
1018	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,06
1028	*A.fumigatus*	2	0,5	1	0,03	0,25
1029	*A.fumigatus*	1	1	2	0,03	0,25
1031	*A.fumigatus*	1	1	1	0,03	0,25
1043	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
1075	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
1076	*A.fumigatus*	1	0,5	1	0,03	0,25
1079	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
1083	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	0,03	0,25
1084	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
1086	*A.flavus*	4	0,25	0,5	0,03	0,5
1088	*A.flavus*	2	0,5	1	0,03	0,5
1089	*A.fumigatus*	1	0,5	1	0,03	0,25
1090	*A.flavus*	2	0,25	0,5	0,03	0,5
1091	*A.clavatus*	0,25	1	2	≤0,015	1
1096	*A.flavus*	2	0,5	1	0,03	0,5
1097	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,125
1123	*A.flavus*	2	0,125	0,5	0,03	0,5
1134	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,06
1140	*A.flavus*	2	0,125	0,5	0,03	0,5
1165	*A.niger*	0,5	1	2	≤0,015	0,25
1168	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,5
1169	*A.fumigatus*	0,5	1	4	0,03	0,25
1175	*A.fumigatus*	0,5	1	2	0,03	0,25
1178	*A.niger, A.awamori, A.welwotshiae*	1	4	2	≤0,015	0,25
1186	*A.fumigatus*	2	1	1	0,03	0,25
1188	*A.flavus/ A.oryzae*	1	0,5	1	0,03	0,5
1248	*A.fumigatus*	2	1	2	≤0,015	0,25
1249	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
1270	*A.fumigatus*	0,25	0,5	2	0,03	0,25
1277	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,06
1283	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
1288	*N.hiratsukae*	1	1	1	≤0,015	0,25
1293	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
1305	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
1315	*A.terreus*	2	1	0,5	≤0,015	0,25

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; isolados; CEM*: concentração efetiva mínima; MCF: micafungina; CPF: caspofungina; NC: não cresceu no teste

Apêndice 4: Resultados de CIM e CEM de 5 antifúngicos contra isolados clínicos de *Aspergillus*

LIF	Id Molecular	CIM/CEM* mg L^{-1}				
		AMB	ITZ	VRZ	MCF*	CPF*
1325	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,5
1332	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
1351	*A.fumigatus*	0,5	0,5	2	≤0,015	0,25
1353	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
1354	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
1355	*A.fumigatus*	2	1	0,5	≤0,015	0,25
1361	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
1385	*A.fumigatus*	1	1	2	≤0,015	0,125
1386	*A.fumigatus*	0,5	1	1	≤0,015	0,125
1388	*A.flavus*	2	0,5	0,5	0,03	0,125
1420	*A.fumigatus*	2	1	2	≤0,015	0,25
1428	*A.fumigatus*	-	-	-	-	-
1430	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,125
1443	*A.parasiticus* *A.arachidicola*	8	0,5	2	≤0,015	0,125
1463	*A.fumigatus*	0,5	0,5	1	≤0,015	0,125
1464	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,5
1465	*A.fumigatus*	2	1	1	≤0,015	0,25
1466	*A.flavus*	2	0,5	0,5	0,03	0,125
1468	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	0,03	0,5
1469	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,125
1474	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,125
1478	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,06
1482	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,125
1515	*A.fumigatus*	2	1	0,5	0,03	0,125
1519	*A.fumigatus*	2	1	2	0,03	0,25
1527	*A.flavus*	4	0,5	0,5	0,03	0,125
1530	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
1534	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	0,03	0,125
1543	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,06
1546	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25
1553	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,5
1569	*A.fumigatus*	2	1	1	≤0,015	0,5
1572	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,5
1576	*A.fumigatus*	1	1	1	0,06	0,25
1597	*A.fumigatus*	1	1	2	≤0,015	0,25
1618	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,125
1621	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,5
1643	*A.flavus*	4	0,5	0,5	0,03	0,125
1670	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,125
1673	*A.terreus*	4	1	4	≤0,015	0,25
1675	*A.fumigatus*	1	1	1	≤0,015	0,25

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol;VRZ: voriconazol; isolados; CEM*: concentração efetiva mínima; MCF: micafungina; CPF: caspofungina; NC: não cresceu no teste

Apêndice 4: Resultados de CIM e CEM de 5 antifúngicos contra isolados clínicos de *Aspergillus*

LIF	Id Molecular	CIM/CEM* mg L^{-1}				
		AMB	**ITZ**	**VRZ**	**MCF***	**CPF***
1714	*A.flavus/ A.oryzae*	1	0,5	2	≤0,015	0,25
1737	*A.flavus*	2	0,25	0,5	0,03	0,25
1756	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
1780	*A.parasiticus*	>16	0,5	1	0,03	0,25
1889	*A.fumigatus*	1	4	8	0,03	0,25
1952	*A.fumigatus*	2	1	1	0,03	0,25
1953	*A.fumigatus*	2	0,5	1	≤0,015	0,25
1954	*A.fumigatus*	1	0,5	0,5	≤0,015	0,25
1955	*A.fumigatus*	2	0,5	1	0,03	0,25
1957	*A.fumigatus*	1	1	2	≤0,015	0,125
1962	*A.fumigatus*	1	1	2	0,03	0,25
2109	*A.fumigatus*	2	0,5	1	0,03	0,25
2110	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	≤0,015	0,25
2121	*A.terreus*	2	1	1	≤0,015	0,25
126a	*A.fumigatus*	2	0,5	1	≤0,015	0,25
126b	*A.niger*	0,5	2	2	≤0,015	0,25
1381a	*A.fumigatus*	0,5	0,5	2	0,03	0,25
1381b	*A.flavus*	2	0,25	0,5	0,03	0,5
170a	*A.niger*	0,5	1	1	≤0,015	0,25
1956a	*A.fumigatus*	2	1	2	≤0,015	0,25
252a	*A.fumigatus*	1	0,5	1	≤0,015	0,25
252b	*A.fumigatus*	2	1	2	≤0,015	0,25
269a	*A.fumigatus*	2	0,5	0,5	0,03	0,25
269b	*A.terreus*	2	1	2	≤0,015	0,25
355a	*A.flavus*	2	0,5	1	0,03	0,5
355b	*A.fumigatus*	2	1	2	≤0,015	0,5

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; isolados; CEM*: concentração efetiva mínima; MCF: micafungina; CPF: caspofungina; NC: não cresceu no teste

Apêndice 5: *Aspergillus fumigatus* ambientais: triagem de resistência frente aos antifúngicos ITZ, VRZ e PSZ; sequenciamento do gene *cyp*51A e resultados de microssatélites

Teste de triagem				Troca de aminoácidos derivada das mutações de ponto						TR34	TR46	Valores de Microssatélites obtidos no programa Peak ScannerTM									
LIF	ITZ 1mgL^{-1}	VRZ 2mgL^{-1}	PSZ 0,5 mgL^{-1}	F46Y	M172V	N248T	D255E	E427K	N248K			2A	2B	3A	3B	4A	4B	BDA	BDB	BDC	BDD
AF9	C	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	208	168	209	181	123	104	166	98
AF24	C	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	154	214	167	218	177	102	102	171	90
AF25	C	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	176	126	214	164	176	176	121	104	167	94
AF26	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	186	144	213	179	221	181	123	102	168	88
AF27	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	177	126	217	203	217	181	120	127	167	113
AF28	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	177	147	236	161	208	185	122	122	168	107
AF29	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	181	168	208	167	204	197	121	127	175	100
AF30	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	186	147	174	162	212	189	116	164	168	90
AF31	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	186	147	174	162	212	189	118	164	168	90
AF32	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	186	167	188	185	122	102	167	107
AF33	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	186	168	188	185	122	102	168	108
AF34	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	173	126	214	164	176	177	122	104	168	94
AF35	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	186	143	214	178	221	181	124	102	168	88
AF36	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	182	147	227	170	221	181	102	102	173	98
AF100	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	186	147	174	161	212	189	118	164	167	90
AF102	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	182	169	208	167	204	197	122	127	175	100
AF103	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	178	126	217	203	216	181	119	127	167	113
AF104	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	178	126	216	181	180	203	120	127	168	113
AF105	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	182	169	208	167	204	197	122	127	175	100
AF106	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	186	143	214	180	221	180	124	102	167	88
AF107	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	176	126	214	165	176	176	121	104	167	94
AF109	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	178	126	217	203	216	180	119	127	167	113
AF122	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	195	161	184	180	115	104	164	90
AF124	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	129	200	165	187	176	122	104	167	94
AF125	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	194	127	199	188	199	188	123	101	167	109
AF126	SC	SC	SC	+	+	+	+	+	_	_	_	170	145	180	174	200	188	112	123	166	80
AF129	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	201	164	188	177	122	104	167	94
AF134	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	134	221	165	180	177	121	144	168	94
AF135	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	208	200	217	181	121	102	167	107
AF136	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	180	134	198	215	196	201	124	108	169	70
AF137	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	236	182	188	177	123	141	169	94
AF138	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	182	122	177	161	188	177	117	205	173	94
AF139	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	208	218	209	181	123	104	166	96
AF140	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	134	189	177	176	176	122	141	167	98
AF141	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	172	147	149	167	205	164	112	131	166	80
AF142	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	199	143	211	170	204	177	122	104	167	90
AF143	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	178	150	186	164	238	184	102	102	173	98
AF144	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	126	178	224	167	188	177	121	104	169	96

ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol, PSZ: posaconazol; C: crescimento; SC: sem crescimento

Apêndice 5: *Aspergillus fumigatus* ambientais: triagem de resistência frente aos antifúngicos ITZ, VRZ e PSZ; sequenciamento do gene *cyp*51A e resultados de microssatélites

Teste de triagem				Troca de aminoácidos derivada das mutações de ponto						TR34	TR46	Valores de Microssatélites obtidos no programa Peak ScannerTM									
LIF	ITZ 1mgL^{-1}	VRZ 2mgL^{-1}	PSZ 0,5 mgL^{-1}	F46Y	M172V	N248T	D255E	E427K	N248K			2A	2B	3A	3B	4A	4B	BDA	BDB	BDC	BDD
AF145	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	208	215	188	177	123	104	164	98
AF146	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	182	126	192	173	192	181	122	99	167	86
AF147	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	182	122	192	164	238	185	121	103	167	96
AF148	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	180	158	205	164	208	189	122	156	167	98
AF150	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	184	143	237	164	197	181	126	104	173	90
AF151	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	154	189	164	218	184	122	102	171	94
AF152	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	178	156	192	164	246	184	122	102	173	109
AF156	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	163	147	281	158	180	192	104	112	185	98
AF159	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	180	158	195	164	208	188	122	168	165	98
AF160	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	168	156	255	158	180	192	104	110	185	86
AF161	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	188	141	255	170	188	180	138	108	164	80
AF163	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	186	124	174	161	188	201	117	99	168	102
AF164	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	143	174	170	217	176	116	133	173	78
AF165	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	240	184	188	177	123	142	169	94
AF166	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	169	147	149	239	205	164	124	127	166	80
AF167	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	+	_	_	178	141	224	164	188	180	116	101	167	78
AF168	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	180	126	149	164	180	176	115	101	164	107
AF169	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	182	147	227	173	188	184	102	101	173	100
AF170	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	172	147	132	227	184	164	112	129	166	80
AF171	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	170	147	149	230	188	164	124	127	166	80
AF172	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	194	143	217	178	200	180	122	142	168	100
AF174	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	126	174	214	180	180	115	104	164	106
AF175	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	172	149	211	270	205	164	98	100	165	80
AF178	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	184	126	167	175	200	180	142	102	168	84
LIF 2471	SC	SC	SC	+	+	+	+	+	_	_	_	184	140	132	179	196	189	118	123	169	86
LIF 2536	SC	SC	SC	_	_	_	_	_	_	_	_	178	138	183	168	180	177	123	129	163	94

ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol, PSZ: posaconazol; C: crescimento; SC: sem crescimento

Apêndice 6: Resultados de microssatélites obtidos com a utilização do software Peak Scanner para isolados clínicos de *A. fumigatus*

Valores de Microssatélites obtidos no programa Peak ScannerTM											
LIF	**STRAf-2A**	**STRAf-2B**	**STRAf-3A**	**STRAf-3B**	**STRAf-4A**	**STRAf-4B**	**BDA**	**BDB**	**BDC**	**BDD**	**ID e-Burst**
79	194	139	186	183	200	84	112	104	165	79	1P1
80	193	138	186	183	200	189	113	104	165	78	2P1
118	186	141	278	194	188	176	124	205	169	95	1P10
375	191	127	149	165	212	177	123	104	167	88	2P10
391	178	142	152	194	188	177	124	108	170	94	3P10
413	192	127	230	182	212	176	124	199	167	88	4P10
466	178	127	149	165	188	188	102	104	167	107	5P10
770	178	126	240	165	188	188	123	108	167	97	1P6
363	192	140	132	171	196	188	112	123	164	98	1P11
379	192	140	132	171	196	189	112	124	164	98	2P11
769	178	126	240	165	188	176	123	108	168	97	3P11
900	178	153	186	165	180	180	116	102	164	90	4P11
197	170	144	142	206	218	164	124	116	165	79	1P12
198	170	144	142	206	218	164	124	116	165	79	2P12
200	170	144	142	205	218	164	124	115	165	79	3P12
1169	186	126	185	223	209	181	115	103	166	99	1P8
1175	186	126	186	222	209	181	115	103	166	98	2P8
896	165	126	183	199	205	176	115	103	164	99	1P13
899	164	127	183	199	205	176	115	102	164	99	2P13
913	164	126	183	199	205	176	115	102	164	98	3P13
914	164	126	183	199	205	176	115	102	169	170	4P13
104	178	126	149	224	218	177	121	102	165	97	1P14
105	178	126	149	223	217	176	122	101	167	97	2P14
264	178	127	149	224	200	177	121	103	167	97	3P14
286	178	126	149	224	218	177	121	101	167	97	4P14
269a	178	126	149	223	218	176	122	122	167	98	5P14
781	178	126	211	162	200	180	119	100	167	92	1P15
1515	178	127	211	162	201	181	121	104	167	92	2P15
1381a	162	125	221	162	188	180	104	102	168	124	1P16
1576	162	135	161	171	176	164	153	110	171	70	2P16
1385	178	127	189	173	188	176	122	102	164	103	1P17
1386	192	145	284	180	196	188	112	102	172	81	2P17
1463	161	128	267	165	235	164	143	118	166	134	3P17
1464	161	128	270	165	235	164	144	118	166	134	4P17
1465	161	128	270	165	235	164	144	118	166	134	5P17
1428	192	147	168	171	196	188	113	121	166	101	1P18
1572	192	148	168	171	196	189	112	122	165	101	2P18
1597	192	148	168	171	196	188	112	122	165	101	3P18
447	123	126	162	165	180	176	104	110	179	70	1P19
473	123	126	162	164	180	176	104	110	179	70	2P19
475	126	123	162	165	180	176	104	110	179	70	3P19
476	184	122	162	165	180	176	104	110	179	70	4P19
477	184	122	162	165	180	177	104	110	179	70	5P19
824	180	154	189	158	180	180	102	111	173	99	1P7
885	178	126	201	194	180	180	104	104	0	0	2P7
122	172	144	164	156	218	218	98	100	165	82	1P20
125	172	144	165	156	218	218	98	100	165	82	2P20
535	186	135	224	171	204	176	121	121	167	120	1P21
538	170	144	142	209	218	164	124	116	167	80	2P21
1353	186	143	255	171	208	176	117	135	167	121	3P21
1354	186	144	255	171	208	176	117	135	167	122	4P21
1355	186	144	255	171	208	176	117	135	167	122	5P21
665	180	143	189	171	188	188	118	170	167	98	1P22
685	180	143	189	171	188	188	118	170	167	98	2P22
945	180	144	189	171	188	188	118	170	166	98	3P22
953	180	143	189	171	188	188	117	169	167	99	4P22
932	178	134	211	194	188	180	123	105	171	94	1P23
935	178	134	208	193	188	180	123	105	171	94	2P23
1519	178	135	208	194	188	180	124	104	171	95	3P23
1954	178	144	171	170	216	177	115	131	173	78	1P24
1955	178	144	171	170	217	177	115	131	173	78	2P24
2109	178	135	170	171	188	197	116	103	163	95	1P25

Apêndice 6: Resultados de microssatélites obtidos com a utilização do software Peak Scanner para isolados clínicos de *A. fumigatus*

Valores de Microssatélites obtidos no programa Peak ScannerTM											
LIF	**STRAf-2A**	**STRAf-2B**	**STRAf-3A**	**STRAf-3B**	**STRAf-4A**	**STRAf-4B**	**BDA**	**BDB**	**BDC**	**BDD**	**ID e-Burst**
2110	178	135	171	170	188	197	116	103	163	95	2P25
180	192	135	208	162	200	185	124	103	165	78	1P26
205	192	135	208	162	199	185	124	103	166	78	2P26
1952	178	127	186	182	188	189	123	176	167	88	1P27
1953	178	127	186	182	188	189	123	176	167	88	2P27
1956a	178	127	186	182	188	189	123	176	167	88	3P27
1546	164	136	189	161	184	180	115	101	164	92	1P9
1553	165	136	189	161	184	180	115	101	163	92	2P9
1569	163	141	236	218	204	176	121	103	167	94	3P9
1889	164	136	189	161	184	180	115	101	163	92	4P9
669	193	147	177	165	204	180	117	139	163	98	1P28
837	193	147	177	164	204	181	117	139	163	99	2P28
838	192	147	177	164	204	181	117	139	163	99	3P28
855	194	147	177	164	204	180	117	139	163	99	4P28
864	193	148	177	164	204	181	117	139	163	98	5P28
968	192	148	177	164	204	180	117	139	163	97	6P28
1534	172	129	149	168	205	165	124	116	165	80	1P29
1543	186	138	224	170	212	176	121	122	167	126	2P29
1351	178	151	162	172	188	173	154	110	164	70	1P30
1670	178	151	224	162	188	180	104	102	167	124	2P30
417	192	144	177	171	188	177	117	175	164	128	1P31
419	192	144	177	171	188	177	118	175	164	128	2P31
91	199	134	171	171	204	196	121	104	169	93	1P2
95	199	134	205	179	188	176	117	101	164	98	2P2
97	192	139	132	170	196	196	112	123	165	98	3P2
98	192	138	132	171	196	188	112	123	166	98	4P2
1083	176	176	198	179	188	176	117	150	167	88	1P32
1084	176	176	195	179	188	176	118	150	168	88	2P32
561	176	135	220	171	188	176	102	104	169	94	1P33
582	180	144	330	172	200	188	118	135	168	98	2P33
588	180	144	330	171	200	188	117	117	168	98	3P33
401	176	127	149	188	188	176	123	104	167	94	1P4
402	192	140	132	171	196	189	112	123	164	98	2P4
403	192	140	132	170	196	188	112	123	163	98	3P4
736	186	126	168	224	209	180	115	104	166	98	1P34
872	186	134	278	162	204	184	117	103	166	122	2P34
1957	193	140	132	170	196	189	112	124	163	99	3P34
603	180	134	224	183	192	193	123	141	163	89	1P5
649	180	134	224	165	197	196	123	141	163	89	2P5
651	180	135	224	165	192	177	123	141	163	90	3P5
697	180	134	224	165	192	177	123	142	163	91	4P5
388	192	145	279	180	196	189	111	102	171	81	1P3
411	192	145	279	180	196	188	111	102	171	79	2P3
1618	165	137	189	162	184	181	115	103	164	100	1P35
1675	164	138	189	161	184	181	115	102	163	93	2P35
279	182	134	195	206	196	182	129	108	169	70	1P36
420	182	135	195	206	196	193	126	108	169	70	2P36

9. Anexos

Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido entregue aos pacientes que tiveram coletas de swab nasal

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título da Pesquisa: Avaliação de isolados clínicos e ambientais de espécies de *Aspergillus*: caracterização morfológica e molecular de espécies, perfil de suscetibilidade e busca por mutações de resistência aos antifúngicos azólicos.

Pesquisadores: Franqueline Reichert Lima, Dra Angélica Zaninelli Schreiber

O senhor. (a) está sendo convidado a participar como voluntário (a) desta pesquisa que tem por finalidade estudar fungos causadores de infecção em pacientes que apresentem doenças onco-hematológicas (doenças que causam alterações das células sanguíneas). Para tanto, será necessário coletar amostras de mucosa nasal e consultar dados clínicos do seu prontuário médico. O objetivo da pesquisa e analisar a presença de fungos na mucosa nasal, identificando as espécies, bem como estudar esses fungos quanto ao perfil de suscetibilidade frente a antifúngicos e a presença de possíveis micro-organismos resistentes aos antifúngicos.
O estudo poderá implicar em alguns riscos diretos ao Sr. (a), pois serão realizadas coletas de mucosa nasal, com a utilização de cotonetes estéreis. Algumas pessoas podem sentir algum desconforto, ou menos frequentemente, pequenos sangramentos. Os procedimentos aos quais o Sr. (a) será submetido constituem instrumentos normatizados para o diagnóstico de infecções fúngicas. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação, além de comunica-lo acerca de qualquer dado relevante que represente risco ou benefício a sua saúde. Informamos que não haverá envio de material nasal coletado do Sr. (a) para o exterior.
Sendo a sua participação voluntária, o Sr. (a) não terá nenhum prejuízo, caso não queira participar e também poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis. Da mesma forma, sendo sua participação voluntária, o Sr. (a) não terá nenhum tipo de ressarcimento pela sua participação. Sempre que quiser tirar suas dúvidas em relação aos aspectos éticos, fazer denúncias ou reclamações sobre o Projeto de Pesquisa de sua participação, entrar em contato, através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário, através do e-mail, telefone ou endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP.
Este documento é emitido em duas vias idênticas, fincando uma via com o Sr. (a) e uma via com a pesquisadora. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, por favor, preencha os seguintes itens:

Consentimento Livre e Esclarecido

Após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos, concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Nome do Participante da Pesquisa	Assinatura do Participante da Pesquisa
Assinatura da Pesquisadora	Assinatura do Orientador

TELEFONES:
Franqueline Reichert Lima: (19) 98106-5678
Profa Dra Angélica Zaninelli Schreiber/ Profa Dra Maria Luiza Moretti: (19) 3521-7451 ou (19) 3521-7054
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126. CEP: 13083-887 Campinas-SP.
Comitê de Ética FCM/UNICAMP: Fone: (19) 3521-8936 ou 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2: Ficha de coleta de dados de pacientes

No LIF: _____

Nome:_____Gênero: ____

Nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Etnia: _____

Prontuário:_____ Escolaridade:_____

Procedência: _____ Doença de base: _____

Comorbidades: _____

Data de Internação:_____ Unidade: _____

Fatores de risco para infecção:

Diabetes melito: S/N	Doença cárdio-vascular: S/N	Doença Pulmonar crônica: S/N
Doenças renal crônica: S/N	Doença hematológica: S/N	Transplante: : S/N

Outra:_____

Dados da infecção:

A) Local:
B) Microrganismo (s):
C) Critério diagnóstico (cultura, histopatologia, radiologia, etc.)
D) Tratamento:

Anti-fúngicos:

Fármaco	**Dose**	**Início**	**Fim**	**Motivo**
		__/__/__	__/__/__	
		__/__/__	__/__/__	
		__/__/__	__/__/__	
		__/__/__	__/__/__	

Antibióticos concomitantes: Não / Sim-qual_____

Corticoesteróide concomitante: Não / Sim

Dose:_____ __/__/__ a __/__/__ _____ __/__/__ a __/__/__

Desfecho: Término do tratamento: __/__/__ Saída: __/__/__
Desfecho: Alta / Óbito atribuído à infecção / Óbito não atribuído à Patologia
Cura clínica: N – S Cura microbiológica: N- S

Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de isolados clínicos e ambientais de espécies de Aspergillus: caracterização morfológica e molecular de espécies, perfil de suscetibilidade e detecção de genes de resistência aos antifúngicos azólicos

Pesquisador: Franqueline Reichert Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35629514.9.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Correções projeto de Doutorado

Justificativa: Envio notificação solicitada pelo parecer consubstanciado do CEP-UNICAMP.

Data do Envio: 31/10/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.108.528

Data da Relatoria: 05/05/2015

Apresentação da Notificação:

Mantidos em relação ao projeto original:

Membros do gênero Aspergillus são patógenos fúngicos oportunistas responsáveis por altas taxas de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos, que se infectam após inalação dos conídios presentes no ar. O derivado azólico voriconazol (VRC) é a primeira linha na terapia e o surgimento de isolados de A.fumigatus resistentes aos azólicos está sendo investigado em diversos países. Isolados resistentes apresentam mutações no gene cyp51A, que codifica a 14-demetilase, enzima alvo para estes compostos. As mutações podem surgir durante o tratamento com estes antifúngicos, mas também podem ocorrer sem a exposição prévia, devido à exposição

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

ambiental do fungo aos inibidores da enzima, como fungicidas e herbicidas utilizados na agricultura. No Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC-UNICAMP) muitos pacientes de alto risco estão suscetíveis a agentes infecciosos oportunistas como os do gênero Aspergillus. Sendo assim, o acompanhamento do possível surgimento de isolados resistentes se faz necessário. Neste contexto, o presente trabalho busca estudar a ocorrência das espécies e o perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados do gênero Aspergillus obtidos a partir de coletas de ar realizadas na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) e no Setor de Hematologia do HC, isolados obtidos a partir de coletas de mucosa nasal realizadas em pacientes internados nas mesmas unidades, bem como de isolados obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes com aspergilose tratados nesse hospital, além de analisar a presença de mutações no gene cyp51A dos isolados resistentes aos antifúngicos. Para a identificação de espécies será realizada a técnica de Sequenciamento de DNA das regiões ITS. O perfil de suscetibilidade aos antifúngicos será avaliado de acordo com o documento M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os antifúngicos avaliados serão fluconazol (FCL), itraconazol (ITC) e voriconazol (VRC). Os isolados de A. fumigatus com elevados valores de CIM serão analisados quanto a presença de mutações no gene cyp51A através da técnica de sequenciamento

Objetivo da Notificação:

Mantidos em relação ao projeto original:

Objetivo Primário: - Estudar a ocorrência das espécies e o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos de isolados do gênero Aspergillus obtidos a partir de coletas ambientais realizadas na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) e no setor de Hematologia do HC-UNICAMP e de isolados obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes com aspergilose tratados neste hospital.

Objetivo Secundário: - Identificar as espécies, através de características morfológicas e por técnicas moleculares como sequenciamento de DNA, de isolados de Aspergillus obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes com aspergilose tratados no HC-UNICAMP, no período de 2009 a 2013. - Realizar coletas de ar de ambientes dentro do HC-UNICAMP para identificação de espécies de Aspergillus. Identificar as espécies através de características morfológicas e por técnicas moleculares como sequenciamento de DNA; -Identificar as espécies, através de características morfológicas e por técnicas moleculares como sequenciamento de DNA, de isolados de Aspergillus obtidos de coletas de mucosa nasal realizadas em pacientes internados na unidade de TMO e no

Setor de Hematologia para avaliação da possível colonização por espécies de Aspergillus; -Avaliar o perfil de suscetibildiade in vitro de isolados clínicos previamente obtidos, isolados ambientais de Aspergillus fumigatus e isolados de Aspergillus spp. obtidos de coletas de mucosa nasal frente aos antifúngicos fluconazol (FCL), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Mantidos em relação ao projeto original:

Riscos: As coletas de mucosa nasal, realizadas com swab, podem causar certo desconforto em alguns pacientes. Além disso, poderão ocorrer pequenos sangramentos em alguns casos. Por essas razões, as coletas serão realizadas por profissionais da enfermagem de cada uma das unidades.
Benefícios: Não estão previstos benefícios diretos aos participantes. Como benefício geral gerado pelo estudo, a 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 poderão ser aplicadas no atendimento ao paciente com aspergilose ou na prevenção de infecções em pacientes suscetíveis a agentes oportunistas como os das espécies de Aspergillus.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
A pesquisadora anexou carta resposta as recomendações do CEP para que as correções (desenho do estudo, hipótese, desfecho e tamanho amostral) sejam descritas na forma de uma notificação a ser anexada na Plataforma, conforme descrito abaixo:

1-O desenho do estudo é apresentado como "retrospectivo e prospectivo", no entanto é "retrospectivo e transversal". Desenho de estudo: O desenho do estudo foi apresentado com "retrospectivo e prospectivo", no entanto é "retrospectivo e transversal".
2-No campo "hipótese" há uma introdução ao tema da pesquisa, justificando-a, mas não foi descrita a hipótese do estudo. O Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC-NICAMP) é uma instituição

terciária de referência, que atende a milhares 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. Acreditamos que apesar das medidas preventivas vigentes ainda seja possível detectar várias espécies de Aspergillus em suspensão no ar dos quartos das Unidades estudadas. Alguns pacientes por sua vez, ja vem colonizados do ambiente externo. A ideia e correlacionar contaminantes ambientais e possíveis colonizantes com os isolados de infecções sistêmicas. Aspergillus resistentes aos antifúngicos azólicos não foram identificados em nossa instituição até o presente momento (com exceção do antifúngico fluconazol, para o qual isolados de Aspergillus apresentam resistência intrínseca). No entanto, sem a vigilância continua para o possível surgimento de isolados resistentes, não é possível garantir que micro-organsimos resistentes não possam colonizar e causar doenças nos pacientes atendidos no HC-UNICAMP. Com a realização dos testes de suscetibilidade, teremos a possibilidade de detecção de resistência fenotípica aos antifúngicos azólicos testados, com posterior comprovação da resistência com testes de biologia molecular que permitirão a análise das possíveis mutações no gene alvo envolvido na via de ação dos derivados azólicos. 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 aplicadas no atendimento ao paciente com aspergilose ou na prevenção de infecções em pacientes suscetíveis a agentes oportunistas como os das espécies de Aspergillus.
3-No item "desfecho", foi descrita a expectativa do pesquisador em relação ao estudo e não os desfechos a serem avaliados ("desfechos" se referem aos parâmetros que serão analisados ao final do estudo - o que será "medido" para se chegar aos objetivos do estudo (por exemplo: frequência e número de espécies identificadas; correlação entre isolados ambientais e clínicos; frequência de isolados resistentes, frequência de genes de reistencia etc). -Desfecho: Serão analisados: a ocorrência e o número das diferentes espécies de fungos do gênero Aspergillus que acredita-se estarem presentes no ar dos quartos da Unidade de Transplante de Medula Óssea e no Setor de Hematologia; a colonização, por, em mucosa nasal de pacientes internados nos quartos das unidades supracitadas por espécies do gênero Aspergillus; a correlação entre as espécies de Aspergillus encontradas como colonizante nos pacientes e no ar dos quartos onde os mesmos estão internados, bem como dos possíveis isolados clínicos; a presença e frequência de isolados clínicos e ambientais de Aspergillus fumigatus que apresentarem resistência fenotípica aos

antifúngicos azólicos; a presença de mutações no gene cyp51A dos isolados de Aspergillus fumigatus, quando houver resistência fenotípica aos antifúngicos azólicos. 4-Está anotado: "zero". O pesquisador deve fazer uma estimativa do número de indivíduos a serem incluídos como voluntários para a coleta de material clínico Tamanho da amostra e número de indivíduos incluídos: Na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) existem 9 leitos enquanto que no setor de Hematologia existem 18 leitos. Para cada unidade, o número de leitos corresponde ao número máximo de pacientes que podem ser internados. O número de pacientes é variável e, além disso, muitos permanecem por longos períodos e também trocam de localização entre as unidades estudadas.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Notificação aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito 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.

- 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 sujeito 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.

- 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. 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”.

CAMPINAS, 16 de Junho de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)