UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação da prevalência das espécies, resistência a
antifúngicos e perfil de virulência de *Aspergillus* spp. oriundos
de amostras de origem clínica**

Vanessa Fávaro Braga

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS RIBEIRÃO PRETO

**Determinação da prevalência das espécies, resistência a
antifúngicos e perfil de virulência de *Aspergillus* spp. oriundos
de amostras de origem clínica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Vanessa Fávaro Braga

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Regina von
Zeska Kress

Ribeirão Preto

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Braga, Vanessa Fávaro

Determinação da prevalência das espécies, resistência a antifúngicos e perfil de virulência de *Aspergillus* spp. oriundos de amostras de origem clínica.

110 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Kress, Marcia Regina von Zeska

1. *Aspergillus* spp. 2. Abordagem polifásica. 3. *G. mellonella*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Fávaro Braga

Determinação da prevalência das espécies, resistência a antifúngicos e perfil de virulência de *Aspergillus* spp. oriundos de amostras de origem clínica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Regina von Zeska Kress

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

Braga, V. F. **Determinação da prevalência das espécies, resistência a antifúngicos e perfil de virulência de *Aspergillus* spp. oriundos de amostras de origem clínica.** 2018. 110f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O gênero *Aspergillus* está associado com micoses oportunistas, com quadros clínicos variando de asma, aspergiloma até aspergilose pulmonar invasiva, acometendo, principalmente, indivíduos imunocomprometidos. Este gênero de fungos filamentosos é onipresente e causa infecção sem predileção à idade, sexo e etnia do hospedeiro. Muito vem sendo descrito na literatura sobre isolados de *Aspergillus* spp. que demonstram resistência a uma classe de antifúngicos utilizado para tratamento na clínica, os azóis. Assim, o presente trabalho teve por finalidade o estudo de isolados clínicos de *Aspergillus* spp. obtidos de diferentes sítios anatômicos. Entre os 32 isolados clínicos estudados, foram identificadas as espécies *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. neoniger*, *A. brasiliensis* e *A. terreus* que são agrupados nas seções *Flavi*, *Fumigati*, *Nigri* e *Terrei*. *A. fumigatus* foi a espécie com o maior número isolados. Os isolados clínicos das seções *Fumigati* e *Terrei* foram termotolerantes e apresentaram os menores diâmetros de conídios e os da *Fumigati* apresentaram os maiores diâmetros de colônia. Alto valor da CIM para os azóis foi observado para dois isolados clínicos da seção *Fumigati* e um para *Nigri*. Os isolados clínicos pertencentes às seções *Flavi*, *Fumigati* e *Nigri* foram os que demonstraram maior capacidade de formação de biomassa e matriz de biofilme. A maioria dos isolados clínicos foram virulentos quando inoculados artificialmente em larvas de *Galleria mellonella*, sendo os da seção *Flavi* os mais virulentos.

Palavras-chave: *Aspergillus* spp., abordagem polifásica, teste de susceptibilidade aos antifúngicos, biofilme, *G. mellonella*.

ABSTRACT

BRAGA, V. F. **Determination of species prevalence, antifungal resistance and virulence profile of *Aspergillus* spp. from samples of clinical origin.**

2018. 110p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The genus *Aspergillus* is associated with opportunistic mycoses, with clinical conditions varying from asthma, aspergilloma to invasive pulmonary aspergillosis, mainly affecting immunocompromised individuals. This genus of filamentous fungi is ubiquitous and causes infection without predilection to the host's age, sex and ethnicity. Much has been described in the literature on *Aspergillus* spp. which demonstrate resistance to a class of antifungal agents used for clinical treatment, azole. Thus, the present study aimed to study clinical isolates of *Aspergillus* spp. obtained from different anatomical sites. Among the 32 clinical isolates studied, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. neoniger*, *A. brasiliensis* and *A. terreus* were grouped in the *Flavi*, *Fumigati*, *Nigri* and *Terrei* sections. *A. fumigatus* was the species with the highest number isolated. The clinical isolates of the *Fumigati* and *Terrei* sections were thermotolerant and had the smallest conidial diameters and those of the *Fumigati* had the largest colony diameters. High CIM value for azoles was observed for two clinical isolates from the *Fumigati* section and one for *Nigri*. The clinical isolates belonging to the *Flavi*, *Fumigati* and *Nigri* sections were the ones that showed the greatest formation capacity of both biomass and matrix biofilm. Most of the clinical isolates were virulent when artificially inoculated in *Galleria mellonella* larvae and the *Flavi* section clinical isolates the most virulent.

Keywords: *Aspergillus* spp., polyphasic approach, antifungal susceptibility test, biofilm, *G. mellonella*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conidióforo de <i>Aspergillus fumigatus</i>	4
Figura 2. Diferentes fases da formação do biofilme de <i>Aspergillus fumigatus</i>	9
Figura 3. Tipos de hemócitos de <i>Galleria mellonella</i> em fase larval	11
Figura 4. Concentração inibitória mínima dos isolados clínicos agrupados em seção	42
Figura 5. Concentração fungicida mínima dos isolados clínicos agrupados em seção	46
Figura 6. Concentração inibitória mínima dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol para o biofilme dos isolados clínicos agrupados em seção	57
Figura 7. Sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> pós-infecções artificiais com isolados clínicos pertencentes à <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	59
Figura 8. Sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> pós-infecções artificiais com isolados clínicos pertencentes à <i>Aspergillus</i> seção <i>Fumigati</i>	60
Figura 9. Sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> pós-infecções artificiais com isolados clínicos pertencentes à <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	60

Figura 10. Sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> pós-infecções artificiais com isolados clínicos pertencentes à <i>Aspergillus</i> seção <i>Terrei</i>	61
---	----

Figura 11. Contagem diferencial de hemócitos de larvas de <i>G. mellonella</i> pós-infecções com isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> e <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	63
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i>	17
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR-RFLP para amplificação da região espaçadora intergênica (IGS) dos genes da biossíntese da aflatoxina	18
Tabela 3 – Isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. oriundos do laboratório de microbiologia de Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP no período de 2001 a 2017	26
Tabela 4 – Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. pelo sequenciamento da região ITS do rDNA	28
Tabela 5 - Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. pelo sequenciamento do gene constitutivo que codifica a calmodulina	29
Tabela 6 – Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> pela metodologia PCR-RFLP	31
Tabela 7 – Diâmetro dos conídios dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	36
Tabela 8 – Diâmetro dos conídios dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. agrupados em seção	37
Tabela 9 – Desenvolvimento das colônias dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. em diferentes temperaturas e meios de cultura	38
Tabela 10 – Valores das CIMs dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	41

Tabela 11 – Susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados clínicos agrupados nas suas respectivas seções 42

Tabela 12 – Valores das CFMs dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. 45

Tabela 13 – Concentração fungicida mínima dos isolados clínicos agrupados nas respectivas seções 47

Tabela 14 – Valores das CIMs dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol para o biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. 56

Tabela 15 – Susceptibilidade aos antifúngicos para o biofilme dos isolados clínicos agrupados em seção 57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. pelo sequenciamento da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina	30
Gráfico 2 – Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	31
Gráfico 3 – Diâmetro das colônias dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. agrupados em seção	33
Gráfico 4 – Diâmetro das colônias dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> agrupados em espécies	34
Gráfico 5 – Diâmetro das colônias dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> agrupados em espécies	35
Gráfico 6 – Biomassa do biofilme dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. agrupados em seção	49
Gráfico 7 – Biomassa do biofilme dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	50
Gráfico 8 – Biomassa do biofilme dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	51
Gráfico 9 – Matriz do biofilme dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. agrupados em seção	52
Gráfico 10 – Matriz do biofilme dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	53

Gráfico 11 – Matriz do biofilme dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>	54
---	----

Gráfico 12 – Contagem total de hemócitos de larvas de <i>G. mellonella</i> pós- infecções com isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	62
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
X	Veze
°C	Graus Celsius
>	Maio
<	Menor que
Mg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDH	Contagem direta de hemócitos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CH ₃ COOH	Ácido acético glacial
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
cmd	Calmodulina
CoCl ₂ .5H ₂ O	Cloreto de cobalto pentahidratado
CTH	Contagem total de hemócitos

$\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado
CYA	<i>Czapek Yeast Autolysate Agar</i>
<i>Cyp</i>	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
ECM	Matriz extracelular
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso heptahidratado
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	Grama
gDNA	DNA gênomico
H_3BO_3	Ácido bórico
HC	Hospital das Clínicas
IGS	Região Espaçadora Intergênica
IPS	Solução Fisiológica de Inseto
ITR	Itraconazol
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potássio
L	Litro

LBA	Lavado bronco-alveolar
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MEA	Ágar extrato de malte
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de amônio tetra hidratado
Mg	Miligrama
MG	Média geométrica
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio heptahidratado
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de manganês tetra hidratado
N	Número amostral
NaCl	Cloreto de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dibásico de sódio
NaNO_3	Nitrato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanograma
PB	Pares de bases
PBS	Tampão salina-fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo no comprimento do

	fragmento de restrição
PDA	Ágar batata Dextrose
pH	Potencial de hidrogênio iônico
POS	Posaconazol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
p/v	Razão peso-volume
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
Rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park</i> <i>Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
v/v	Volume/volume
VOR	Voriconazol
YG, YAG	<i>Yeast Glucose</i>
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de gráficos	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspergilose e o gênero <i>Aspergillus</i>	1
1.2. Taxonomia do gênero <i>Aspergillus</i>	2
1.3. Identificação do gênero <i>Aspergillus</i> e suas espécies	4
1.4. Susceptibilidade aos antifúngicos	6
1.4.1. Os antifúngicos e mecanismos de ação	7
1.5. Patogenia e capacidade de formação de biofilme	7
1.6. Modelo animal alternativo <i>Galleria mellonella</i>	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	13
3.1. Verificação da viabilidade e da pureza dos isolados clínicos cedidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP	13
3.2. Abordagem polifásica de identificação dos isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	13
3.2.1. Identificação clássica dos isolados clínicos de fungos filamentosos	13
3.2.2. Estudo fisiológico dos isolados clínicos e termotolerância das colônias	15

3.2.3. Identificação molecular dos isolados clínicos	15
3.3. Análise do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos aos antifúngicos segundo o protocolo M38A e M38A2 do <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	18
3.3.1. Preparação dos antifúngicos	19
3.3.2. Preparo do inóculo	19
3.3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	20
3.3.4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima	20
3.4. Biofilme	21
3.4.1. Quantificação da biomassa de biofilme	21
3.4.2. Quantificação da matriz de biofilme	21
3.5. Concentração Inibitória Mínima de antifúngicos em biofilme	22
3.6. Avaliação da virulência dos isolados clínicos utilizando o modelo animal alternativo <i>G. mellonella</i>	23
3.6.1. Preparo do inóculo, ativação dos conídios e inoculação nas larvas	23
3.6.2. Curva de sobrevivência	24
3.6.3. Contagem de hemócitos	24
3.7. Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	86

Objetivos _____

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspergilose e o gênero *Aspergillus*

Aspergillus spp., agente causador de aspergilose, trata-se do gênero que apresenta espécies comuns e abundantes no planeta, sem predileção geográfica e podendo ser encontrado no ar, solo, água, alimentos e detritos vegetais. Não há também, quando acomete indivíduos, predileção em relação à idade, sexo e etnia, tornando a aspergilose uma micose de ocorrência universal. Pode causar micose oportunista em indivíduos imunocomprometidos, processos alérgicos e micotoxicoses. Além de ser um patógeno humano, essas espécies também podem provocar infecção em pássaros e insetos, acometendo, principalmente, o aparelho respiratório (AMORIM, 2004).

O modo que os indivíduos se contaminam é pelo contato e a inalação dos conídios, que dispersam-se por pequenas a longas distâncias. Em indivíduos imunocompetentes, a inalação dos conídios (esporos assexuais) de *Aspergillus* spp. raramente causam infecção, uma vez que são eficientemente eliminados pelo sistema imune do hospedeiro. A imunidade inata é, por si só, capaz de controlar a infecção. Entretanto, se o contato for frequente e/ou o indivíduo entrar em contato com uma quantidade alta de conídios, é preciso que a imunidade adquirida seja ativada para auxiliar na proteção (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

Os indivíduos imunocomprometidos apresentam um risco maior de desenvolver a infecção fúngica pela falta de mecanismos básicos de defesa, ou seja, são mais susceptíveis a infecções por microrganismos que em contato com indivíduos imunocompetentes, inclusive aos microrganismos que apresentam baixa virulência. As imunodeficiências mais comuns para crianças acometidas pela aspergilose são síndromes como a imunodeficiência combinada severa e a síndrome de Wiskott-Aldrich; entre os adultos, leucemias, linfomas, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e transplantados (SILVA, 2010).

Os conídios de *Aspergillus* spp. acomete principalmente os pulmões, podendo adicionalmente levar ao desenvolvimento de sinusite e infecção disseminada e do sistema nervoso central. A sua incidência em transplantados

de rim, fígado, medula óssea e pulmão são, respectivamente, 1, 2, 7 e 9%, sendo que a taxa de mortalidade para esta população varia de 55 a 92%, que representa cerca de 10% das mortes de indivíduos transplantados (SILVA, 2010).

A micose mais importante causada por este gênero fúngico é a aspergilose pulmonar invasiva que é de difícil tratamento podendo levar ao óbito. Sendo assim, a gravidade da infecção varia de acordo com o estado imunológico do paciente, mas está também relacionada com a virulência do fungo.

1.2. Taxonomia do gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é classificado taxonomicamente dentro do reino Fungi, filo Ascomycota, classe Euromycete, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Este gênero é dividido em quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* and *Nidulantes*) e cada subgênero é subdividido em várias seções (ou complexos), totalizando vinte seções, sendo esta divisão proposta por Houbraken *et al.* (2014) e Hubka *et al.* (2014) (SAMSON *et al.*, 2014). Cada seção agrupa diversas espécies com características comuns, mas com diferentes potenciais patogênicos e perfis de sensibilidade a antifúngicos. As seções mais relevantes na clínica são *Fumigati*, *Flavi*, *Terrei* e *Nigri* (BALAJEE *et al.*, 2006).

A seção *Fumigati* (complexo *A. fumigatus*) é a principal causadora de infecção e alergia (AUSTWICK e LONGBOTTOM, 1980), devido a características, como a maior capacidade de adesão a superfície das vias aéreas antes de invadi-las (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013). Essa seção é definida principalmente por *A. fumigatus* e as espécies crípticas *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans*, *A. thermomutatus* (*Neosartorya pseudofischeri*), *A. novofumigatus* e *A. hiratsukae*. Dentro desta seção já foram descritas 63 espécies, entretanto não é uma certeza devido à semelhança entre elas (SAMSON *et al.*, 2007; FRISVAD e LARSEN, 2015). Geralmente, as espécies dessa seção não são identificadas corretamente sendo então a sua real prevalência subestimada. *A. fumigatus* (*sensu stricto*) é a espécie mais isolada

na clínica, seguido de *A. lentulus*. Infecções mistas com ambas as espécies já foram descritas. As infecções invasivas causadas por *A. lentulus* ou outro membro da seção *Fumigati* é relacionada com alta taxa de mortalidade (60%). Doenças alérgicas e infecções crônicas em pacientes com fibrose cística também são associadas a estas espécies crípticas (SHIVAPRAKASH *et al.*, 2009; SYMOENS *et al.*, 2010).

Dentro da seção *Flavi* há seis espécies de grande importância econômica, sendo elas *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamarii*. Estas espécies apresentam íntima relação morfológica e filogenética, sendo então possível diferenciá-las quanto à capacidade de produção de aflatoxinas. As três primeiras espécies citadas, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, são produtoras de aflatoxinas e consideradas um problema tanto para saúde humana quanto animal (GODET e MUNAUT, 2010; HEDAYATI *et al.*, 2007; KUMEDA e ASAO, 2001). Ao lado de *A. fumigatus*, *A. flavus* é a segunda espécie mais comum causadora de aspergilose invasiva e não invasiva e, em algumas áreas geográficas, é o principal agente causador de aspergilose (DENNING *et al.*, 2003).

A. terreus é uma das espécies mais relevantes pertencentes à seção *Terrei*, que atualmente é composta por 14 espécies (PIONTELLI, 2014). Esta espécie está emergindo como causadora de infecção oportunista e torna-se preocupante por demonstrar resistência *in vitro* à anfotericina B (HARA *et al.*, 1989; IWEN *et al.*, 1998; TRITZ e WOODS, 1993). Alguns estudos presentes na literatura relatam que as infecções por *A. terreus* estão associadas com altas taxas de morbidade e mortalidade quando comparadas com outras espécies do gênero (IWEN *et al.*, 1998). Ao lado de *A. terreus*, a espécie *A. alabamensis* também provoca micose oportunista (LASS-FLORL *et al.*, 2000; BADDLEY *et al.*, 2003; BALAJEE, 2009).

Espécies como *A. niger*, pertencente à seção *Nigri*, são também relatados como agentes etiológicos de micose, principalmente em casos de otomicose (KAYA e KIRAZ, 2007). Nesta seção estão incluídos diversas espécies que já foram isolados ao redor do mundo (SCHUSTER *et al.*, 2002; DEAK e BALAJEE, 2010) e são considerados a terceira causa de aspergilose

pulmonar (PASQUALOTTO e DENNING, 2006). As espécies comumente encontradas na clínica são *A. awamori*, *A. brasiliensis* e *A. tubingensis*, sendo a última a espécie mais isolada (IATTA *et al.*, 2016).

1.3. Identificação do gênero *Aspergillus* e suas espécies

Os métodos tradicionais de identificação das espécies de *Aspergillus* são baseados nas suas características morfológicas, sendo realizado pela análise morfológica macroscópica (colônia) e microscópica (estruturas de reprodução assexual) do fungo. Na análise microscópica (microcultivo) são visualizadas hifas septadas hialinas e os conidióforos em vesícula com cadeias de conídios saindo de fiálides, estruturas estas, comuns a todas as espécies de *Aspergillus* (Figura 1) (LAMOTH, 2016). Outras possíveis abordagens para a identificação são a caracterização fenotípica, como a taxa de crescimento em diferentes temperaturas (LAMOTH, 2016).

Figura 1. Conidióforo de *Aspergillus fumigatus*. Adaptado de ALKHAYYAT *et al.*, 2015.

Entretanto, a identificação considerando apenas as características citadas acima torna-se difícil, uma vez que há poucas divergências morfológicas entre isolados pertencentes a uma mesma espécie. Sendo assim, a identificação por abordagem polifásica vem sendo utilizada, aonde novos métodos vem sendo adicionados, como análise de extrólitos e ferramentas moleculares (GEISER *et al.*, 2007). A identificação por abordagem polifásica tem como finalidade integrar diferentes informações (fenotípicas, genéticas e filogenéticas) sobre um dado microrganismo levando a um consenso na taxonomia (SILVA, 2009).

A análise dos extrólitos, como as aflatoxinas e ocratoxinas A, pode ser utilizada para auxiliar na identificação das espécies (LARSEN *et al.*, 2001). Inicialmente, as aflatoxinas foram isoladas de espécies da seção *Flavi*, entretanto, posteriormente, foi visto que não são todas as espécies pertencentes a esta seção que são produtoras desta toxina. Devido a sua alta toxicidade, as aflatoxinas podem resultar em grandes riscos a saúde humana por possuir propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras (NORDIN e LUCHESE, 1998). A ocratoxina A é uma micotoxina considerada nefrotóxica, imunotóxica, genotóxica e teratogênica (IARC, 1993). *A. carbonarius*, que pertence à seção *Nigri*, é a principal espécie envolvida na produção desta toxina (ESTEBAN *et al.*, 2006).

A identificação das espécies fúngicas pode ser realizada com análises mais específicas como o sequenciamento do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossomal (rDNA), que atua como um “código de barras” para os fungos e, frequentemente, utilizado na identificação molecular desses microrganismos. Além do ITS, é ainda necessário o sequenciamento de um segundo marcador para a correta identificação de cada espécie fúngica. Esse marcador secundário deve ser semelhante ao ITS, onde deve ser reconhecido por *primers* universais, ser de fácil amplificação e diferenciar as espécies. Sendo assim, há algumas opções como os genes codificadores da β -tubulina, calmodulina, actina e hidrofobina (HONG *et al.*, 2005; SAMSON *et al.*, 2007; YAGUCHI *et al.*, 2007). A β -tubulina é de fácil amplificação, porém pode resultar na amplificação de genes parálogos. Já a calmodulina também é de

fácil amplificação e com ela é possível distinguir a maior parte das espécies do gênero *Aspergillus*. Com isso, sugere-se a utilização de calmodulina como marcador secundário de *Aspergillus* spp. (SAMSON *et al.*, 2014).

Além da amplificação da região ITS do rDNA e dos genes citados acima, pode ser necessário a utilização de outras técnicas para identificar espécies, como o caso das espécies de *Aspergillus* contidas na seção *Flavi*, que apresentam uma íntima relação morfológica e filogenética. Um exemplo é a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) que se baseia no padrão de clivagem da enzima de restrição, resultando em diferentes fragmentos. Espécies pertencentes à seção *Flavi*, produtoras de aflatoxina e com características morfológicas semelhantes, como *A. flavus* e *A. parasiticus*, podem ser diferenciadas com a utilização desta técnica (KHOURY *et al.*, 2011).

1.4. Susceptibilidade aos antifúngicos

A maior parte dos casos de aspergilose são tratados com antifúngicos da classe dos azóis, sendo que o tratamento tem seu início sem o diagnóstico final devido à demora na identificação e a rápida progressão da doença, como ocorre na aspergilose pulmonar invasiva (SALES, 2009).

A utilização dos azóis vem sendo prejudicada devido ao aparecimento de algumas espécies de *Aspergillus* resistentes a estes medicamentos. Em um recente estudo multicêntrico, foi relatada a resistência de 3,2% dos isolados de *A. fumigatus* aos azóis e de 78% entre isolados da seção *Fumigati* (ALCAZAR-FUOLI *et al.*, 2008; ESCRIBANO *et al.*, 2013; ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2014).

A resistência aos azóis é uma preocupação que está em crescimento, uma vez que pode levar a um aumento na taxa de mortalidade de pacientes que apresentam quadro de aspergilose pulmonar invasiva. A resistência tem sido relatada nos 6 continentes (Ásia, África, América do Norte, América do Sul, Europa e Austrália) e em muitas regiões a frequência dessa resistência ainda continua desconhecida (VERWEIJ *et al.*, 2016). O uso inadequado do medicamento antifúngico está relacionado ao surgimento de resistência e limitando o uso de azóis, poliênicos e equinocandinas para o tratamento de

aspergilose. A taxa de mortalidade em pacientes imunossuprimidos com infecção por *Aspergillus* spp. é alta independentemente do tratamento antifúngico de escolha. Sendo assim, é muito importante a realização de testes de suscetibilidade, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Isso permitirá uma orientação para um tratamento mais adequado e também para a avaliação de novos agentes antifúngicos. O teste de microdiluição em caldo é um dos testes utilizados para a avaliação da susceptibilidade e é um método de referência para fungos filamentosos (CLSI,2008) (LOYOLA, 2006).

No tratamento de infecções fúngicas invasivas são utilizadas quatro classes de antifúngicos, sendo os poliênicos, principalmente a anfotericina B, os azóis (triazóis), as equinocandinas e as pirimidinas (PAPPAS *et al.*, 2003; PAPPAS *et al.*, 2009).

1.4.1. Os antifúngicos e mecanismo de ação

A anfotericina B é um poliênico que se liga ao ergosterol presente na membrana plasmática dos fungos, levando a um desarranjo e formando poros ou canais, que resultam na alteração da permeabilidade celular fúngica (GOODMAN e GILMAN'S, 2011).

Os antifúngicos da classe dos azóis inibem a ação da enzima microssômica 14- α -esterol-demetilase, enzima do citocromo P450 (*Cyp*). Com isso, a biossíntese de ergosterol é comprometida ocorrendo acúmulo de 14- α -metilesteróis, levando ao desarranjo da membrana plasmática, impedindo o crescimento do fungo. Essa classe de antifúngicos pode ser dividida em duas subclasses, sendo os imidazóis (cetoconazol, miconazol e tioconazol) e os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) (GOODMAN e GILMAN'S, 2011).

1.5. Patogenia e capacidade de formação de biofilme

O desenvolvimento da aspergilose pulmonar invasiva está diretamente relacionada aos fatores de virulência do fungo e a resposta imune do hospedeiro. O que determina o modo de ativar o sistema imune inato do

hospedeiro são as características biológicas do fungo, como, por exemplo, a fase de crescimento e morfologia. *A. fumigatus* é capaz de crescer em um amplo intervalo de temperatura que se estende de 37°C a 50°C, tornando-o termotolerante; os conídios são pequenos, o que facilita sua dispersão pelo ar e aspiração pelas vias aéreas; capacidade de adesão ao endotélio e epitélio; invasão dos vasos sanguíneos; produção de toxinas como a elastase, entre outras. A parede celular do fungo, que é o primeiro componente que tem contato com o hospedeiro, é composta por β -(1,3) e β -(1,6) glucanas, α -(1,3) glucanas (é o componente mais abundante da parede celular), quitinas e galactomananas, sendo que esta última é o principal exoantígeno liberado pelo fungo ao invadir o tecido, podendo levar a uma ativação do sistema imune inato longe do ponto onde está ocorrendo a infecção. Na superfície dos conídios do fungo é encontrada uma camada de melanina e ácido siálico, além de um componente hidrofóbico que também é encontrado nas hifas (BEAUVAIS e LATGÉ, 2015).

Uma importante condição para que ocorra o início e a manifestação da infecção no indivíduo é a disponibilidade de nutrientes no local da infecção. *A. fumigatus* é capaz de absorver nutrientes de tecidos destruídos do hospedeiro. Além disso, os fungos estão adaptados a competir com outros microrganismos pelos nutrientes e também a mudanças ambientais rápidas. Com isso, os fungos são ditos como versáteis por conseguirem se adaptar a diversas condições impostas pelo local que se encontram. Entretanto, o que vai determinar a progressão da infecção é o estado do sistema imune do hospedeiro (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

A patogenicidade do fungo pode ser determinada pela capacidade de formação de biofilme, que são populações biológicas com elevado grau de organização e embebidas em matrizes poliméricas produzidas por elas próprias, facilitando a adesão a superfícies. O biofilme formado por espécies de *Aspergillus* pode ser tanto em superfícies bióticas quanto abióticas e o processo de formação inicia-se pelos conídios que colonizam e aderem-se ao substrato e, então, ocorre a formação do micélio, o qual é embebido na matriz extracelular (MEC) (MOWAT *et al.*, 2009; LOUSSERT *et al.*, 2010). A MEC é

composta por polissacarídeos (galactomananas e glucanas), pigmentos (melanina) e proteínas (como hidrofobinas) (MUSZIETA *et al.*, 2013) (BEAUVAIS e LATGÉ, 2015). As vantagens do microrganismo em formar biofilme são várias, como proteção ao ambiente, resistência tanto física quanto química e cooperação metabólica (RAMAGE *et al.*, 2009). Em termos de cinética, sabe-se que o biofilme formado por espécies de *Aspergillus* é mais lento em comparação com biofilmes formados por *C. albicans*, que é um fungo leveduriforme. Para *Aspergillus*, há uma fase de adesão e germinação inicial que dura, aproximadamente, 10 horas; em seguida, inicia-se a formação da monocamada, onde as hifas começam a se entrelaçar (com duração em torno de 6 horas), seguida de complexidade estrutural nos tempos subsequentes (Figura 2). Essas características de cada fase são importantes para o resultado do tratamento com a droga antifúngica (KAUR e SINGH, 2013).

Figura 2. Diferentes fases da formação do biofilme de *Aspergillus fumigatus*. ECM, matriz extracelular. Adaptado de KAUR e SINGH, 2013.

Assim sendo, há relatos na literatura que relações de biofilme fúngico e o aumento da resistência aos agentes antifúngicos têm sido atualmente observados, o que pode se tornar um problema na clínica médica, uma vez que, além da resistência, atuam como reservatórios para fontes persistentes de infecção nos pacientes. Os biofilmes recém-formados são significativamente mais susceptíveis aos antifúngicos voriconazol e caspofungina do que os biofilmes maduros e a resistência aos antifúngicos aumentam conforme ocorre a maturação do biofilme (BEAUVAIS e LATGÉ, 2015).

1.6. Modelo animal alternativo *Galleria mellonella*

G. mellonella trata-se de uma lepidótera da família Pyralidae, sendo considerada uma peste para apicultores, uma vez que alimenta-se de pólen, mel e cera de abelha, levando a destruição da colméia. Quando em comparação a outros modelos animais apresenta várias vantagens (VOGEL *et al.*, 2011). Sua utilização é eticamente mais aceita, o custo de manutenção é menor, além do curso de infecção ser mais rápido (MYLONAKIS, 2008). O tamanho da larva permite que quantidades específicas de microrganismos sejam inoculadas, sendo de fácil manipulação e coleta tanto de tecidos quanto de hemolinfa para estudos de patofisiologia (VOGEL *et al.*, 2011). Além do mais, podem ser incubadas em temperatura entre 25 e 37°C permitindo uma melhor reprodução das condições fisiológicas humanas. Mais importante que as vantagens apresentadas por larvas de *G. mellonella*, é a diminuição do uso de animais vertebrados, como ratos, camundongos e coelhos.

Ultimamente estas larvas vêm sendo utilizada em estudos de patogênese e virulência por possuírem mecanismos da imunidade inata semelhantes aos de mamíferos, reproduzindo, assim, resultados semelhantes (BRENNAN *et al.*, 2002; DESBOIS e COOTE, 2011; DUNPHY *et al.*, 2003; FUCHS *et al.*, 2010; THOMAZ *et al.*, 2013). Apesar destes insetos não apresentarem resposta imune adaptativa, a resposta imune inata é bem eficiente devido à ação das proteínas de reconhecimento de padrões, estas capazes de reconhecer o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram-negativas, peptidoglicano das bactérias Gram-positivas e o β - 1,3 - glucano dos fungos (KINGSOLVER *et al.*, 2013; GILBERT, 2012).

As células responsáveis por regular a resposta imune são os hemócitos, que são responsáveis por realizar fagocitose, encapsulamento e coagulação. A resposta humoral consiste na produção de algumas moléculas efetoras, como opsoninas, melanina, profenoloxidase e peptídeos antimicrobianos as quais são responsáveis por levar o patógeno invasor à morte por lise ou melanização (HILLYER, 2016).

Os tipos celulares dos hemócitos mais comuns são os pro-hemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e esferulócitos (LAVINE e STRAND, 2002) (Figura 3). Em geral, é dito que os pro-hemócitos são células tronco

multipotentes; granulócitos e plasmatócitos são ditos como fagócitos e os oenocitóides são células envolvidas no processo de melanização; já os esferulócitos são hemócitos com funções desconhecidas (WAGO, 1991; YAMASHITA e IWABUSCHI, 2001; IWAMA e ASHIDA, 1986).

Figura 3: Tipos de hemócitos de *Galleria mellonella* em fase larval. A e B, plasmatócito; C e D, plasmatócito alongado ou lamelócito; E e F, granulócito; I e J, oenocitóide. Barra de escala= 10 μ m. Fonte: autoria própria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudo das espéciesfúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus* spp. isoladas de diferentes sítios anatômicos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Identificar as espécies de isolados de *Aspergillus* spp. de origem clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP previamente identificados por metodologia clássica;
- 2- Avaliar a susceptibilidade dos isolados clínicos frente aos antifúngicos das classes dos poliênicos e azóis;
- 3- Avaliar a capacidade de formação de biofilme dos isoladosclínicos;
- 4- Avaliar a susceptibilidade dos isolados clínicos em biofilme frente aos antifúngicos das classes dos poliênicos e azóis;
- 5- Avaliar a virulência dos isoladosclínicos em modelo animal alternativo *Galleria mellonella*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1. Verificação da viabilidade e da pureza dos isolados clínicos cedidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Foram analisados neste projeto 32 isolados clínicos de *Aspergillus* spp. gentilmente cedidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Estes isolados clínicos foram obtidos de amostras clínicas de diferentes sítios anatômicos, sendo eles líquido cefalorraquidiano (LCR), bola fúngica do seio esfenoidal, secreção de ouvido, mucosa nasal, lavado bronco-alveolar (LBA), escarro e biópsias nasal, transbrônquica e ganglionar (Tabela 3).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP conforme a 160ª reunião extraordinária realizada em 10.02.2017 segundo o ofício CEP/FCFRP nº 425.

3.2. Abordagem polifásica de identificação dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

A identificação dos isolados clínicos foi realizada pela concordância dos resultados obtidos nas análises da macro e micromorfologia, fisiologia e molecular.

Para preservação dos isolados clínicos por longos períodos, foram realizados estoques a partir de uma suspensão dos conídios do fungo e adição de glicerol (30%) esterilizado, em tubos criogênicos, seguido do armazenamento em ultra freezer (-80°C).

3.2.1. Identificação clássica dos isolados clínicos de fungos filamentosos

I- Análise macromorfológica

Para a análise macromorfológica cada isolado clínico foi inoculado em placa de Petri de 90 x 15 mm, contendo meio de cultura YAG e incubado a 37°C por 48 horas. Após este período, cada isolado clínico teve seus conídios coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e água destilada

autoclavada e filtrados em lã de vidro autoclavada. Após, foram inoculados 5 µL de conídios a 5×10^6 conídios/mL no centro de placas de Petri de 90 x 15 mm contendo meio de cultura YAG e incubado na temperatura de 37°C no escuro. O diâmetro das colônias foi medido diariamente com uma régua milimétrica até o quarto dia de desenvolvimento. Além disso, foram observadas as características das colônias quanto ao aspecto, superfície (topografia) e cor (frente e verso da placa de Petri).

II- Análise micromorfológica

A- Análise do diâmetro dos conídios

Para a análise do diâmetro dos conídios cada isolado clínico foi inoculado em placa de Petri de 90 x 15 mm, contendo meio de cultura YAG e incubado a 37°C por 48 horas. Após este período, cada isolado clínico teve seus conídios coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e água destilada autoclavada e filtrados em lã de vidro autoclavada. Após, 10 µL de 5×10^6 conídios/mL foram transferidos para uma lâmina, a qual foi depositada uma lamínula. O material foi observado em microscopia de campo claro (N120, Coleman) em aumento de 1000 X e capturado com a câmera HDCE-X5 com o auxílio do software ScopImage9.0. O diâmetro de cada conídio foi medido utilizando o programa de processamento de imagem Java de domínio público ImageJ 1.50i (ABRAMOFF *et al.*, 2014). O experimento foi realizado em duplicata com o número de 20 conídios para cada isolado clínico.

B- Microcultivo de fungos filamentosos

A análise micromorfológica das estruturas de reprodução assexual do fungo filamentoso foi realizada pela semeadura de conídios de cada isolado clínico em blocos (aprox. 1 x 1 x 0,6 cm) de YAG que foi coberto com uma lamínula esterilizada e, em seguida, incubadas a 37°C durante 48 horas, sendo feito em duplicata. Uma das lamínulas foi transferida para uma lâmina com uma gota de lactofenol azul de algodão e a outra lamínula para uma lâmina contendo ácido láctico 70% (SAMSON *et al.*, 2014). O material foi observado em microscopia de campo claro (N120, Coleman) em aumento de 400 e 1000 X e

capturados com a câmera HDCE-X5 com o auxílio do software ScoplImage9.0. Foram analisadas as características das estruturas da reprodução assexual (hifas, conidióforos, haste, vesícula, fiálide e conídios). Foi utilizada a chave de classificação sugerida por De Hoog *et al.* (2000) e artigos com descrição de novas espécies para identificar todos os isolados clínicos.

3.2.2. Estudo fisiológico dos isolados clínicos e termotolerância das colônias

Os isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foram inoculados em meio de cultura CYA, 5 µL da suspensão fúngica a 5×10^6 conídios/mL, e incubados no escuro nas temperaturas de 25, 35 e 45°C por 7 dias. Também foram inoculados em meio de cultura MEA e incubados no escuro a 25°C por 7 dias (SAMSON *et al.*, 2014). Imagens foram capturadas com a câmera DSC-W800 para observação da presença ou ausência de crescimento de colônia fúngica.

3.2.3. Identificação molecular dos isolados clínicos

I- Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico (gDNA) dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foi realizada de acordo com modificações do método descrito por Junghans e Metzlaff (1990). A concentração de 2×10^7 conídios de *Aspergillus* spp. foi inoculada em meio de cultura líquido YG e incubados a 37°C por 16 horas e 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) para a produção do micélio. Este foi coletado por filtração, congelado em nitrogênio líquido e triturados com auxílio de almofariz e pistilo esterilizados. Para cada 40 mg de micélio triturado foi acrescentado 500 µL de tampão de extração de DNA genômico. Em seguida foi acrescentado volume igual de fenol (Sigma Aldrich®) e clorofórmio (JT Baker®) 1:1 (v/v) e a mistura foi homogeneizada vigorosamente por cerca de 10 minutos em agitador mecânico de tubos (Vortex Mixer – Labnet Internacional) para precipitar as proteínas e quebrar as membranas e paredes das células fúngicas. Para sedimentar as proteínas precipitadas e resíduos celulares, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 16000 g (Eppendorf, Alemanha). A fase aquosa foi transferida para

um novo microtubo de 1,5 mL (Axygen Scientific, EUA) e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para retirada de resíduo de fenol e/ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas novamente a 16000 *g* por 5 minutos, e a fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL (Axygen Scientific, EUA) onde foram acrescentados 0,54 volumes de isopropanol (JT Barker, EUA) e leve agitação para a precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 16000 *g* por 1 minuto e o sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 16000 *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol evaporado na temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi suspenso em água esterilizada (Nuclease Free Water - Promega®) e estocado a 4°C. O RNA foi eliminado de cada amostra pelo tratamento com 300 ng/mL de RNase (Pure Link A - Invitrogen™ Thermo Fisher®) a 37°C por 1 hora. A concentração e a pureza do DNA genômico foram avaliadas por espectrofotometria (Implen® - Alemanha) no comprimento de onda de 260 e 280 nm e a sua qualidade foi observada em eletroforese de gel de agarose a 1%. A concentração de cada amostra foi ajustada para 1000 ng/μL.

II-Amplificação por PCR e sequenciamento da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina

A região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do rDNA e o gene constitutivo que codifica a calmodulina de cada isolado clínico foram amplificados por PCR utilizando-se 20 μM de cada *primer* (*forward* e *reverse* – Tabela 1), 10 mM de dNTP, 1 X de tampão apropriado para polimerase (buffer GC), 1 μg de gDNA e 1 U de enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) em volume final de 20 μL de reação. Os fragmentos gerados foram visualizados em eletroforese de gel de agarose 1%. O produto de cada PCR foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), de acordo com as normas do fabricante. As amostras purificadas foram quantificadas por espectrofotometria e a integridade observada em eletroforese de gel de agarose 1% para posteriormente ser realizado o sequenciamento.

Tabela 1: Primers

Nome do gene/região	Primer	Sequência (5' → 3')	Temperatura Anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
Espaçador	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	58	588	White <i>et al.</i> , 1990
transcrito interno	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
				549	Hong <i>et al.</i> , 2005
Calmodulina	cmd5	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	58		
	cmd6	CCGATAGAGGTCATAACGTGG			

Fonte: Autoria própria.

O sequenciamento da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina dos isolados clínicos foi realizado utilizando os respectivos *primers* descritos na tabela 1, no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP – Campus SP) com o aparelho ABI3100 *Fluorescence Futomated Frequencer* (Applied Biosystems). Cada sequência gerada foi analisada no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Australia) e comparada com sequências depositadas no banco de dados no NCBI utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

III- Amplificação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* – PCR-RFLP)

A técnica de PCR-RFLP foi realizada para os isolados clínicos que foram agrupados dentro de *Aspergillus* seção *Flavi*, os quais não foi possível determinar a espécie, mesmo após o sequenciamento da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina. Para essa caracterização molecular, seguiu-se o protocolo de Khoury *et al.* (2011) e Kana *et al.* (2013), o qual é capaz de diferenciar as espécies *A. parasiticus* e *A. flavus*. O DNAg de cada isolado clínico foi submetido a amplificação por PCR da região espaçadora intergênica (IGS) dos genes da biossíntese da aflatoxina, utilizando os *primers* descritos na tabela 2 nas seguintes condições, 20 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse* – Tabela 2), 10 mM de dNTP, 5 X de tampão

apropriado para polimerase, 1 µg do gDNA e 1 U da enzima Gotaq (Promega) e volume final de reação de 25 µL. Os fragmentos gerados foram visualizados em eletroforese de gel de agarose 1%.

Tabela 2: *Primers* utilizados na técnica de PCR-RFLP para amplificação da região espaçadora intergênica (IGS) dos genes da biossíntese da aflatoxina

Primer	Sequência (5' → 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Amplicon (pb)	Referência
IGS F	AGGAATTCAGGAATTCTCAATG	58	674	Khoury <i>et al.</i> , 2011
IGS R	GTCCACCGGCAAATCGCCGTGCG			

Fonte: Autoria própria.

O produto de cada PCR da região IGS foram submetidos à clivagem utilizando enzima de restrição *Bgl*II (Promega) com tampão de enzima apropriado e volume final de reação de 30 µL. Esta reação ocorre a 37°C por 3 horas. Os fragmentos de DNA clivados foram visualizados em eletroforese de gel de agarose 1,5%.

A identificação da espécie baseia-se no padrão de clivagem (polimorfismo de tamanho) obtido. Dessa forma, a presença de 2 fragmentos de 363 e 311 pb refere-se a espécie *A. parasiticus* (Khoury *et al.*, 2011); já a presença de 3 fragmentos de 362, 210 e 102 pb refere-se a *A. flavus* (Kana *et al.*, 2013).

3.3. Análise do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos aos antifúngicos segundo o protocolo M38A e M38A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*

A análise da susceptibilidade dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. aos antifúngicos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M38A e M38A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Os antifúngicos testados são os pertencentes às classes

dos poliênicos (anfotericina B - Sigma Aldrich, EUA) e azóis (itraconazol – Fagron, Índia, voriconazol e posaconazol - Sigma Aldrich, EUA).

Os resultados foram expressos e analisados quanto a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

3.3.1. Preparação dos antifúngicos

Os antifúngicos utilizados foram diluídos no solvente apropriado (Dimetil sulfoxido – DMSO) na concentração 100X a máxima aplicada no teste. Foram feitas diluições para 2X a concentração do teste em meio de cultura RPMI 1640 pH 7,0 (com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH) e tamponado com 0,165 M de ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS), 2X a concentração final.

Foram distribuídos 100 µL de cada antifúngico 2X concentrado, em placas de microdiluição de 96 poços (TPP, Suíça), onde as colunas 11 e 12 foram, respectivamente, controle positivo (crescimento do fungo) e controle negativo (controle do antifúngico e controle da esterilidade do meio de cultura); e as colunas de 1 a 10 foram utilizadas para as diluições seriadas (1:2) do agente antifúngico, sendo as concentrações testadas de 0,03 a 16 µg/mL de cada antifúngico.

3.3.2. Preparo do inóculo

Para os experimentos de susceptibilidade aos antifúngicos, os conídios foram produzidos pela distribuição de conídios na superfície de meio de cultura PDA com o auxílio de uma alça descartável esterilizada e incubada por 48 horas a 37°C. Após esse período, foi feita uma suspensão dos conídios em salina 0,85% esterilizada e a concentração ajustada para $5,0 \times 10^4$ conídios/mL. O volume de 100 µL da suspensão de conídios foi adicionado em cada poço da placa de microdiluição com exceção da coluna 12, já que essa foi utilizada como controle da droga e controle da esterilidade do meio de cultura RPMI 1640.

Como linhagem controle de cada experimento foi utilizado o fungo filamentoso *Aspergillus flavus* ATCC®204304™. As placas de microdiluição

foram incubadas a 37°C e a leitura feita em 48 horas de desenvolvimento do fungo.

3.3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada droga antifúngica seguiu as normas descritas para fungos filamentosos no protocolo M38A e M38A2 – CLSI (2008). De acordo com o documento, CIM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que causa redução visível do crescimento do microrganismo.

Os resultados foram considerados válidos somente quando a linhagem utilizada como controle apresentou valores de CIM de acordo com o que é padronizado pelo protocolo M38A e M38A2 – CLSI (2008).

A CIM para cada um dos isolados clínicos foi determinada quando observado 100% de inibição de desenvolvimento do fungo. Os resultados foram expressos relatando o intervalo da CIM para cada antifúngico testado e calculando-se a média geométrica (MG). A MG calculada é a média que indica a tendência central dos valores “n” das CIMs encontradas utilizando a extração da raiz “n” desses números, sendo sua fórmula matemática expressa pela equação: “ $M_{\text{geométrica}} = \sqrt[n]{n_1 \times n_2 \times n_3}$ ”, onde “n” representa os valores das CIM encontradas.

3.3.4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Após a leitura e determinação da CIM descrita no item acima, item 3.3.3, foi realizada a técnica denominada *drop out*, para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM). Nesta técnica, 10µL de cada poço que visualmente não apresentou crescimento do fungo nas placas de 96 poços (inibição pela ação do antifúngico) foi inoculado em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo meio de cultura PDA e incubado a 37°C por 48 horas. A CFM para cada um dos isolados clínicos foi observada a partir da ausência do crescimento do fungo no meio de cultura no qual foi inoculado. Esta ausência de crescimento demonstra uma ação fungicida do antifúngico ao isolado clínico.

3.4. Biofilme

3.4.1. Quantificação da biomassa de biofilme

A quantificação da biomassa de biofilme foi realizada de acordo com o método descrito por Li *et al.* (2012), com modificações. Em uma placa para cultura de células de 96 poços de fundo chato foi adicionado 200 µL de meio de cultura RPMI contendo 1×10^5 conídios dos isolados clínicos e incubado a 37°C por 3, 18 e 42 horas para a germinação e formação do biofilme. Após, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado cinco vezes com 200 µL de tampão PBS 1X para a remoção das células fúngicas não aderidas. As células aderidas foram fixadas pela incubação com 150 µL de metanol 100% durante 15 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e 150 µL de corante violeta 0,5% (p/v) foram adicionados em cada poço e incubados por 2 minutos à temperatura ambiente. O corante foi removido e cada poço foi lavado cinco vezes com tampão PBS 1X para retirar o excesso de corante. O cristal violeta presente na biomassa de células aderidas na parede de cada poço foi extraído pela incubação com 200 µL de ácido acético 33% por 5 minutos na temperatura ambiente. O volume de 150 µL do material extraído foi transferido para uma nova placa de 96 poços e a absorbância lida no comprimento de onda de 570 nm em leitor de placas (680XR - BioRad). O experimento foi realizado em quintuplicata.

3.4.2. Quantificação da matriz de biofilme

A quantificação da matriz de biofilme foi realizada de acordo com o método descrito por Seidler *et al.* (2008), com modificações. Em uma placa para cultura de células de 96 poços de fundo chato foi adicionado 200 µL de meio de cultura RPMI contendo 1×10^5 conídios dos isolados clínicos e incubados a 37°C por 3, 18 e 42 horas para germinação e formação do biofilme. Após, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado cinco vezes com 200 µL de tampão PBS 1X para a remoção das células fúngicas não aderidas. As células aderidas foram fixadas pela incubação com 150 µL de metanol 100% durante 15 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e foi adicionado em cada poço 100 µL do corante safranina 1% (0,1 g/10 mL de

dH₂O) (Sigma) e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. O corante foi removido e cada poço foi lavado cinco vezes com tampão PBS 1X para retirar o excesso do corante. A safranina presente na matriz de células aderidas na parede de cada poço foi extraída pela incubação com 200 µL de ácido acético 33% por 10 minutos em temperatura ambiente. O volume de 150 µL do material extraído foi transferido de cada poço para uma nova placa de 96 poços e a absorbância lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de placas (680XR - BioRad). O experimento foi realizado em quintuplicata.

3.5. Concentração Inibitória Mínima de antifúngicos em biofilme

A CIM de antifúngicos em biofilme foi realizada de acordo com o método descrito por Pierce *et al.* (2010), com modificações. Em uma placa para cultura de células de 96 poços de fundo chato foi adicionado 200 µL de meio de cultura RPMI contendo 1×10^5 conídios dos isolados clínicos e incubados a 37°C por 18 horas para germinação e formação do biofilme. Após, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado cinco vezes com 200 µL de tampão PBS 1X para a remoção das células fúngicas não aderidas. Após as lavagens, os antifúngicos anfotericina B, voriconazol, itraconazol e posaconazol (estes listados e modo de preparação descritos nos tópicos 3.3 e 3.3.1, respectivamente) foram adicionados aos poços, sendo as concentrações testadas de 0,5 a 32 µg/mL para cada antifúngico. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, foram adicionados 50 µL de resazurina (100 µM, Sigma) em cada poço e incubado a 37°C por 24 horas. Após esse período de incubação, as placas foram submetidas à leitura da fluorescência no comprimento de onda de 560/590 nm em leitor de placas (SpectraMax Paradigm®, Molecular Devices®).

Como linhagem controle de cada experimento foi utilizado o fungo filamentoso *Aspergillus flavus* ATCC®204304™. Os resultados foram considerados válidos somente quando a linhagem utilizada como controle apresentou valor de CIM de acordo com o que é padronizado pelo protocolo M38A e M38A2 – CLSI (2008).

A CIM foi considerada como a menor concentração de antifúngico em que houve alteração significativa da fluorescência quando comparada aos poços em que não houve crescimento. Os resultados foram expressos pelo intervalo da CIM para cada antifúngico e média geométrica.

3.6. Avaliação da virulência dos isolados clínicos utilizando o modelo animal alternativo *G. mellonella*

Para caracterizar o perfil de virulência dos isolados clínicos, adotou-se o protocolo segundo Renwick (2006) onde foram utilizadas larvas da espécie *Galleria mellonella*. Neste trabalho, as larvas criadas foram mantidas a 27°C no escuro, em recipiente de vidro (30 cm de altura x 20 cm de largura) com capacidade de 2 L. A ração utilizada é composta de 200 g de cera de abelha, 96 g de leite em pó, 188 g de extrato de levedo, 385 g de fubá, 416 mL de mel, 160 g de soja triturada e 300 mL de água. Os componentes da ração foram misturados no fogo alto e autoclavado. As larvas foram mantidas com acesso a ração até alcançarem o sexto instar, cujo peso está entre 200 a 250 mg. Após o completo desenvolvimento, as larvas foram privadas de alimentação e separadas em grupos de 10 unidades em placas de Petri de vidro para cada isolado clínico. PBS 1 X e as linhagens *Aspergillus flavus* ATCC®204304™ e *Aspergillus fumigatus* ATCC®46645™ e PBS 1X foram os controles do experimento.

3.6.1. Preparo do inóculo, ativação dos conídios e inoculação nas larvas

Os conídios foram obtidos a partir cultura em meio de cultura YAG incubada a 37°C por 48 horas. Os conídios foram coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e PBS 1X e filtrados em lã de vidro autoclavada.

A concentração de 2×10^8 conídios foi ressuspensa em 500 µL de meio de cultura YG acrescido de 5% de soro bovino fetal (Cultlab) e incubado a 37°C por 2 horas a 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT – Switzerland) para a ativação do metabolismo da célula. Após esse período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 2,5 minutos a 10000 rpm (Eppendorf,

Alemanha). O sobrenadante foi descartado e os conídios ativados foram ressuspensos em 100 µL de PBS 1X autoclavado.

Para a infecção artificial em larvas de *G. mellonella*, foi utilizado micro seringa de Hamilton para cromatografia gasosa modelo 7000.5KH de volume de 10 µL. Para cada larva inoculou-se no centro da ventosa da última pró-pata direita 5 µL de conídios na concentração final de 2×10^8 conídios/mL. O mesmo foi feito para linhagens ATCCs e para o controle, com apenas PBS 1X autoclavado. Entre uma infecção e outra, uma rigorosa bateria de lavagens foi realizada na pipeta de Hamilton, 3 vezes com hipoclorito de sódio, etanol 70% e IPS. Após a infecção, as larvas foram incubadas em placas de Petri de vidro a 37°C e privadas de ração e iluminação direta.

Durante todo o período experimental, diariamente as larvas foram retiradas da pré-pupa com a finalidade de retardar sua metamorfose.

3.6.2. Curva de sobrevivência

Os grupos de *G. mellonella* infectados e incubados foram monitorados diariamente, observando se ocorria falta de movimento da larva mesmo frente ao toque com pinça, indicando sua morte. Os dados foram sistematicamente anotados até completar 14 dias do experimento.

3.6.3. Contagem de hemócitos

A obtenção da hemolinfa e observação dos hemócitos ocorreu segundo descrito por Bergin *et al.* (2005) e Blanco *et al.* (2017), com modificações. As larvas infectadas foram anestesiadas por resfriamento em gelo por, aproximadamente, 5 minutos. A superfície da larva foi esterilizada com etanol 70% e a hemolinfa coletada em microtubo de 1,5 mL (Axygen Scientific, EUA) com o auxílio de um corte com bisturi esterilizado.

I- Contagem total dos hemócitos

Os hemócitos circulantes foram analisados nos tempos de 0, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos pós-infecção das larvas. O volume de 10 µL da hemolinfa de cada larva foi adicionado em microtubos de 0,2 mL (Axygen

Scientific, EUA) contendo 90 μ L de IPS. A contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada em câmara de Neubauer. O resultado foi expresso em hemócitos/ μ L de hemolinfa. Grupos de três larvas foram analisados para cada condição.

II- Contagem diferencial dos hemócitos

A contagem diferencial dos hemócitos (CDH) foi realizada para larvas inoculadas com PBS1 X e para as larvas infectadas com os isolados clínicos que apresentaram um aumentona contagem total de hemocitos (CTH). Assim, a CDH foi realizada nos tempos antes, durante e após o aumento da CTH. Para a contagem diferencial, grupos de 3 larvas infectadas tiveram toda a sua hemolinfa coletada e uma lâmina foi confeccionada com esfregaço por distensão. Este material foi corado com corante panótico (Panótico rápido Laborclin) e observado em microscopia de campo claro em aumento de 1000 X (N120, Coleman). Os hemócitos foram analisados quanto a sua morfologia e coloração, determinando se havia a presença de cinco tipos celulares, sendo eles os prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos e oenocitóides (Blanco *et al.*, 2017). Foram contadas 100 células. Os resultados foram expressos em porcentagens.

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi baseada no método *one-way analysis of variance* (*one-way* ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para análise comparativa dos experimentos. Para o teste de virulência, adotou-se o método estatístico Long-rank (Mantel-Cox) com a finalidade de avaliar a significância das curvas de sobrevivência.

Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos e o resultado foi considerado estatisticamente diferente. Todas as análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism (v 5.0; Graph pad Software, La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Isolados Clínicos

A identificação clássica dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foi realizada pelo laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foram analisados isolados clínicos de diferentes materiais biológicos, tanto estéreis quanto não estéreis, de 27 pacientes, sendo eles 16 homens e 11 mulheres. Neste estudo existem pacientes com mais de um isolado clínico com diferentes períodos de coleta e coleta em duplicata do mesmo sítio na mesma data, totalizando 32 isolados clínicos. Os fungos foram isolados de diferentes sítios anatômicos como LCR (3,1%), biópsia nasal (3,1%), biópsia transbrônquica (3,1%), biópsia ganglionar (3,1%), bola fúngica do seio esfenoidal (3,1%), secreção de ouvido (9,4%), mucosa nasal (9,4%), LBA (9,4%) e escarro (56,3%) (Tabela 3 e Apêndice VII).

Tabela 3: Isolados clínicos de *Aspergillus* spp. oriundos do laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP no período de 2001 a 2017.

Paciente	Número do isolado	Gênero do Paciente	Data da coleta	Sítio de isolamento
1	LMC6001.01	M	Jan2001	Escarro
2	LMC6003.01	M	Jun 2008	Secreção de ouvido
3	LMC6007.01	M	Jun 2013	LCR
4	LMC6008.01	F	Ago 2013	Escarro
5	LMC6009.01	M	Abr 2014	Escarro
6	LMC6010.01	F	Mar 2015	Escarro
	LMC6010.02	F	Mar 2015	Escarro
7	LMC6011.01	M	Mai 2015	Escarro
8	LMC6012.01	M	Mai 2015	Biópsia nasal
9	LMC6013.01	F	Jun 2015	Biópsia transbrônquica
10	LMC6014.01	F	Jun 2015	Escarro
11	LMC6015.01	M	Set 2015	Escarro
12	LMC6016.01	F	Set 2015	Escarro
13	LMC6017.01	F	Out 2015	Escarro
	LMC6017.02	F	Dez 2016	Escarro

	LMC6017.03	F	Mar 2017	Escarro
14	LMC6018.01	M	Dez 2015	LBA
15	LMC6019.01	F	Fev 2016	Mucosa nasal
16	LMC6020.01	M	Mar 2016	Escarro
17	LMC6021.01	F	Abr 2016	Escarro
18	LMC6022.01	F	Abr 2016	LBA
19	LMC6023.01	M	Mai 2016	Escarro
	LMC6023.02	M	Set 2016	Escarro
	LMC6023.03	M	Set 2013	Escarro
20	LMC6024.01	M	Jun 2016	Secreção de ouvido
21	LMC6025.01	M	Set 2016	LBA
22	LMC6026.01	M	Set 2016	Secreção de ouvido
23	LMC6027.01	M	Set 2016	Biópsia ganglionar
24	LMC6028.01	M	Ago 2013	Escarro
25	LMC6029.01	M	Ago 2013	Mucosa nasal
26	LMC6030.01	M	Out 2016	Mucosa nasal
27	LMC6031.01	F	Fev 2017	Bola fúngica do seio esfenoidal

M, Masculina; F, Feminino; LCR, líquido cefalorraquidiano; LBA, lavado broncoalveolar.

Fonte: Autoria própria

4.2. Abordagem polifásica de identificação dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

4.2.1. Identificação Molecular

A identificação molecular das espécies dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foi realizada pelo sequenciamento da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina. As sequências geradas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados público *GenBank* (Tabelas 4 e 5). Entre os 32 os isolados clínicos, todos foram identificados no gênero *Aspergillus*, sendo eles distribuídos nas seções *Flavi* n= 16 (50%), *Fumigati* n= 13 (40,6%), *Nigri* n=2 (6,3%) e *Terrei* n=1 (3,1%) (gráfico I).

Para *Aspergillus* seção *Fumigati*, os 13 isolados clínicos foram identificado como *A. fumigatus*. Para *Aspergillus* seção *Nigri*, foram identificados 2 isolados clínicos, onde um é pertencente a espécie *A. neoniger* e outro, *A. brasiliensis*. Para *Aspergillus* seção *Terrei*, foi identificado 1 isolado

Resultados

clínico, sendo *A. terreus*. Já para *Aspergillus* seção *Flavi*, foram identificados 16 isolados clínicos onde somente 2 foram identificados como sendo da espécie *A. tamarii*, enquanto que os outros 14 obtiveram resultados inconclusivos pelo sequenciamento da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina (Tabelas 4 e 5 e Gráfico 1). Para identificar as espécies destes isolados foi realizada a técnica de polimorfismo PCR-RFLP.

Tabela 4: Identificação molecular dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. pelo sequenciamento da região ITS do rDNA.

Isolado clínico	Sequência referência GenBank	Espécie	Identidade (%)	E-value	Máx. score
LMC6001.01	KX098315.1	<i>A. brasiliensis</i>	99	0.0	979
LMC6003.01	KF928291.1	<i>A. neoniger</i>	94	8e-178	593
LMC6007.01	KC964099.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	963
LMC6008.01	KY697107.1	Seção <i>Flavi</i>	96	0.0	1029
LMC6009.01	EF661515.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	974
LMC6010.01	AB976023.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	1005
LMC6010.02	KC964099.1	Seção <i>Flavi</i>	100	0.0	915
LMC6011.01	KJ194123.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	983
LMC6012.01	KY697107.1	Seção <i>Flavi</i>	95	0.0	1046
LMC6013.01	KX066060.1	<i>A. fumigatus</i>	95	6e-146	529
LMC6014.01	KJ194123.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	994
LMC6015.01	KJ194123.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	990
LMC6016.01	KJ194123.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	996
LMC6017.01	JX518254.1	<i>A. terreus</i>	69	0.0	143
LMC6017.02	KT826618.1	<i>A. fumigatus</i>	100	0.0	920
LMC6017.03	KY523044.1	<i>A. fumigatus</i>	100	0.0	911
LMC6018.01	AB976023.1	<i>A. fumigatus</i>	96	0.0	1013
LMC6019.01	KR812470.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	989
LMC6020.01	KJ194123.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	989
LMC6021.01	KC964099.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	972
LMC6022.01	LN482482.1	Seção <i>Flavi</i>	93	0.0	846
LMC6023.01	KP641150.1	<i>A. tamarii</i>	99	0.0	990
LMC6023.02	KU882055.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	1002

Resultados

LMC6023.03	KC964099.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	1053
LMC6024.01	MF377553.1	Seção <i>Flavi</i>	100	0.0	996
LMC6025.01	KM207771.1	<i>A. fumigatus</i>	90	0.0	824
LMC6026.01	HQ026738.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	1055
LMC6027.01	KP641150.1	<i>A. tamarii</i>	99	0.0	989
LMC6028.01	KC964099.1	Seção <i>Flavi</i>	100	0.0	944
LMC6029.01	KC964099.1	Seção <i>Flavi</i>	100	0.0	913
LMC6030.01	MF319893.1	Seção <i>Flavi</i>	100	0.0	918
LMC6031.01	MF599709.1	Seção <i>Flavi</i>	100	0.0	909

Fonte: Autoria própria

Tabela 5: Identificação molecular dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. pelo sequenciamento do gene constitutivo que codifica a calmodulina.

Isolado clínico	Sequência referência GenBank	Espécie	Identidade (%)	E-value	Máx. score
LMC6001.01	KC796372.1	<i>A. brasiliensis</i>	86	5e-175	625
LMC6003.01	KJ775340.1	<i>A. neoniger</i>	99	0.0	942
LMC6007.01	EF661515.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	939
LMC6008.01	EF661515.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	939
LMC6009.01	EF661515.1	Seção <i>Flavi</i>	99	0.0	942
LMC6010.01	KC701201.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	976
LMC6011.01	KJ175558.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	976
LMC6012.01	EF661515.1	Seção <i>Flavi</i>	98	0.0	939
LMC6013.01	KJ175558.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	1059
LMC6014.01	KJ175558.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	1062
LMC6015.01	LN901183.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	697
LMC6016.01	LN890512.1	<i>A. fumigatus</i>	84	4e-84	322
LMC6017.01	EU1475921.1	<i>A. terreus</i>	97	2e-172	616
LMC6017.02	LN890512.1	<i>A. fumigatus</i>	95	1e-169	606
LMC6017.03	LN890512.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	736
LMC6018.01	KU884319.1	<i>A. fumigatus</i>	96	3e-78	302
LMC6019.01	KJ175558.1	<i>A. fumigatus</i>	100	0.0	1061
LMC6020.01	KP771800.1	<i>A. fumigatus</i>	83	4e-58	235
LMC6021.01	KU554593.1	Seção <i>Flavi</i>	83	1e-150	544
LMC6022.01	EF202059.1	Seção <i>Flavi</i>	92	6e-163	584
LMC6023.01	KU554593.1	<i>A. tamarii</i>	96	0.0	896
LMC6023.02	KT150504.1	<i>A. fumigatus</i>	99	0.0	974

Resultados

LMC6023.03	KJ767732.1	Seção Flavi	99	0.0	839
LMC6024.01	EF661514.1	Seção Flavi	99	0.0	950
LMC6025.01	KJ175558.1	<i>A. fumigatus</i>	89	0.0	723
LMC6026.01	-	-	-	-	-
LMC6027.01	KX894621.1	<i>A. tamarii</i>	99	0.0	977
LMC6028.01	KX621189.1	Seção Flavi	99	0.0	870
LMC6029.01	KX621189.1	Seção Flavi	99	0.0	863
LMC6030.01	KY88642.1	Seção <i>Flavi</i>	95	5e-143	518
LMC6031.01	-	-	-	-	-

-, resultado inconclusivo

Fonte: Autoria própria

Gráfico 1: Identificação molecular dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. pelo sequenciamento da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina.

Fonte: Autoria própria

Para os 14 isolados clínicos inconclusivos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi* foi realizada a identificação pela metodologia de PCR-RFLP, onde os fragmentos gerados após a clivagem com enzima de restrição foram observados quanto ao número de pares de bases para determinação da

Resultados

espécie, conforme observado na literatura. Foram identificados 9 isolados clínicos da espécie *A. parasiticus* e 5 *A. flavus* (Tabela 6 e Gráfico 2).

Tabela 6: Identificação molecular dos isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Flavi* pela metodologia de PCR-RFLP.

Isolado clínico	Espécie
LMC6007.01	<i>A. parasiticus</i>
LMC6008.01	<i>A. parasiticus</i>
LMC6009.01	<i>A. parasiticus</i>
LMC6010.02	<i>A. parasiticus</i>
LMC6012.01	<i>A. parasiticus</i>
LMC6021.01	<i>A. parasiticus</i>
LMC6023.03	<i>A. parasiticus</i>
LMC6028.01	<i>A. parasiticus</i>
LMC6029.01	<i>A. parasiticus</i>
LMC6022.01	<i>A. flavus</i>
LMC6024.01	<i>A. flavus</i>
LMC6026.01	<i>A. flavus</i>
LMC6030.01	<i>A. flavus</i>
LMC6031.01	<i>A. flavus</i>

Fonte: Autoria própria.

Gráfico 2: Identificação molecular dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Fonte: Autoria própria.

4.2.2. Identificação clássica dos isolados clínicos de fungos filamentosos

I- Análise macromorfológica

De cada isolado clínico foi visualizado a macromorfologia onde foram observadas as características gerais de cada colônia em meio de cultura sólido (YAG), como aspecto veludoso a pulverulento, podendo ter as cores branca, verde, amarela, marrom e preta, típicos de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*. O diâmetro das colônias de cada isolado clínico foi medido diariamente até o quarto dia de desenvolvimento.

Em observação ao primeiro dia de incubação das colônias, os isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*, sendo as espécies *A. parasiticus*, *A. flavus* e *A. tamarii* e os isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri*, sendo um isolado clínico da espécie *A. neoniger* e outro da espécie *A. brasiliensis*, apresentaram colônias com a média de 1,4 cm de diâmetro. Já *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, a média foi de 1,1 cm e em *Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus*, apresentaram colônias com menor diâmetro, sendo a média de 0,9 cm (Gráfico 3).

No segundo dia de incubação, as colônias dos isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, sendo todos identificados como pertencentes à espécie *A. fumigatus*, apresentaram a média de 3,0 cm de diâmetro, sendo este maior em relação a todos os outros isolados clínicos. Estes mesmos isolados clínicos da seção *Fumigati* também apresentaram maior diâmetro de colônia no terceiro e quarto dia de desenvolvimento (Gráfico 3).

Aspergillus seção *Terrei* apresenta um único isolado clínico o qual foi identificado como da espécie *A. terreus*. Este isolado clínico apresentou diâmetro de colônia nos dias 1, 2, 3 e 4 de incubação de 1,1, 1,9, 2,8 e 3,6 cm, respectivamente. Sendo estes diâmetros de colônia muito menor em relação aos demais isolados clínicos deste trabalho. Além disso, por ser um único isolado, a análise estatística para esta seção ficou inviabilizada.

Gráfico 3: Diâmetro das colônias dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. agrupados em seção

* $p < 0,05$

Fonte: Autoria própria.

Entre as espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, após o primeiro e o segundo dia de desenvolvimento, as colônias de todas as espécies apresentaram diâmetro de colônia próximo ($p > 0,05$). Após o terceiro dia de desenvolvimento, o diâmetro da colônia dos isolados clínicos identificados como *A. parasiticus* foi menor que das demais espécies desta seção, tendo, aproximadamente, 2,8 cm de diâmetro, enquanto que de *A. flavus* e *A. tamarii* foi de, aproximadamente, 3,8 cm. O mesmo ocorreu na análise do quarto dia de desenvolvimento, onde o diâmetro de *A. parasiticus* foi de cerca de 3,7 cm, enquanto as demais espécies, 5,2 cm ($p < 0,05$) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Diâmetro das colônias dos isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Flavi* agrupados em espécies

* $p < 0,05$

Fonte: Autoria própria.

Na análise das espécies pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri* foi observado que nos três primeiros dias de desenvolvimento da colônia, os isolados clínicos apresentaram valores de diâmetro próximos tanto para *A. neoniger* quanto para *A. brasiliensis*, ocorrendo diferença somente no quarto dia, onde o isolado pertencente a espécie *A. neoniger* apresentou colônia com cerca de 5,5 cm e o pertencente a espécie *A. brasiliensis*, 6,4 cm, mas sem diferença estatística significativa, possivelmente inviabilizada pelo reduzido número de isolados clínicos estudados neste trabalho que foram identificados como pertencentes a esta seção ($p > 0,05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5: Diâmetro das colônias dos isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Nigri* agrupados em espécies

Fonte: Autoria própria.

II- Análise micromorfológica

A. Análise do diâmetro do conídio

A média do diâmetro dos conídios dos isolados clínicos de espécies pertencentes a *Aspergillus* seção *Flavi* foi de 5,3 μm para *A. tamarii*, 4,6 μm para *A. parasiticus* e 3,96 μm para *A. flavus*. Já para *Aspergillus* seção *Fumigati*, os isolados clínicos da espécie *A. fumigatus* apresentaram a média de 2,6 μm . *Aspergillus* seção *Nigri*, o isolado clínico *A. brasiliensis* apresentou diâmetro de conídio maior que *A. neoniger*, sendo a média de 4,74 e 3,23 μm , respectivamente (Tabela 7 e Apêndice VII).

Tabela 7: Diâmetros dos conídios dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Isolados clínicos	Diâmetro (µm)	Espécie
LMC6007.01	4,42	<i>A. parasiticus</i>
LMC6008.01	4,17	<i>A. parasiticus</i>
LMC6009.01	4,63	<i>A. parasiticus</i>
LMC6010.02	4,33	<i>A. parasiticus</i>
LMC6012.01	4,62	<i>A. parasiticus</i>
LMC6021.01	4,98	<i>A. parasiticus</i>
LMC6023.03	4,65	<i>A. parasiticus</i>
LMC6028.01	4,58	<i>A. parasiticus</i>
LMC6029.01	5,04	<i>A. parasiticus</i>
LMC6022.01	3,74	<i>A. flavus</i>
LMC6024.01	3,76	<i>A. flavus</i>
LMC6026.01	4,48	<i>A. flavus</i>
LMC6030.01	3,81	<i>A. flavus</i>
LMC6031.01	4,01	<i>A. flavus</i>
LMC6023.01	5,09	<i>A. tamarii</i>
LMC6027.01	5,52	<i>A. tamarii</i>
LMC6010.01	2,50	<i>A. fumigatus</i>
LMC6011.01	2,50	<i>A. fumigatus</i>
LMC6013.01	2,70	<i>A. fumigatus</i>
LMC6014.01	2,70	<i>A. fumigatus</i>
LMC6015.01	2,60	<i>A. fumigatus</i>
LMC6016.01	2,60	<i>A. fumigatus</i>
LMC6017.02	2,70	<i>A. fumigatus</i>
LMC6017.03	2,60	<i>A. fumigatus</i>
LMC6018.01	2,60	<i>A. fumigatus</i>
LMC6019.01	2,50	<i>A. fumigatus</i>
LMC6020.01	2,60	<i>A. fumigatus</i>
LMC6023.02	2,50	<i>A. fumigatus</i>
LMC6025.01	2,70	<i>A. fumigatus</i>
LMC6001.01	4,74	<i>A. brasiliensis</i>
LMC6003.01	3,23	<i>A. neoniger</i>
LMC6017.01	2,32	<i>A. terreus</i>

Fonte: Autoria própria.

O diâmetro dos conídios dos isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi* foram maiores que dos isolados clínicos das demais seções, enquanto que, o único isolado clínico pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei* apresentou o menor diâmetro de conídio (Tabela 8).

Tabela 8: Diâmetro dos conídios dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. agrupados em seção

Seção	Média (µm)	Amplitude (µm)
Flavi (n=16)	4,6	3,74 – 5,52
Fumigati (n=13)	2,6	2,5 – 2,7
Nigri (n=2)	3,99	3,23 – 4,74
Terrei (n=1)	2,32	-

Fonte: Autoria própria.

B. Microcultivo dos isolados clínicos

Os conidióforos dos isolados clínicos do gênero *Aspergillus* demonstraram-se eretos, não ramificados, com vesícula apical onde desenvolvem-se fiálides (uniseriada) e, dependendo da espécie, foram seguidas de metulas (bisseriada). Os conídios foram produzidos em cadeia a partir das fiálides ou metulas. A disposição dos conídios apresentaram-se com característica colunar ou divergente (radial) (ApêndiceV).

III- Estudo fisiológico e termotolerância dos isolados clínicos

Os isolados clínicos estudados neste trabalho apresentaram desenvolvimento de colônia a 25°C nos meios de cultura MEA e CYA e a 37°C em meio de cultura CYA. Na temperatura de 45°C em meio de cultura CYA, 14 isolados clínicos (43,75%) apresentaram desenvolvimento, indicando ser termotolerantes, sendo eles pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati* (*A. fumigatus*) e *Aspergillus* seção *Terrei* (*A. terreus*). Os demais não desenvolveram em até 7 dias de incubação, sendo eles pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi* e seção *Nigri* (Tabela 9 e ApêndicesV e VII).

Tabela 9: Desenvolvimento das colônias dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. em diferentes temperaturas e meios de cultura

Isolado clínico	MEA 25°C	CYA 25°C	CYA 37°C	CYA 45°C
LMC6001.01	S	S	S	N
LMC6003.01	S	S	S	N
LMC6007.01	S	S	S	N
LMC6008.01	S	S	S	N
LMC6009.01	S	S	S	N
LMC6010.01	S	S	S	S
LMC6010.02	S	S	S	N
LMC6011.01	S	S	S	S
LMC6012.01	S	S	S	N
LMC6013.01	S	S	S	S
LMC6014.01	S	S	S	S
LMC6015.01	S	S	S	S
LMC6016.01	S	S	S	S
LMC6017.01	S	S	S	S
LMC6017.02	S	S	S	S
LMC6017.03	S	S	S	S
LMC6018.01	S	S	S	S
LMC6019.01	S	S	S	S
LMC6020.01	S	S	S	S
LMC6021.01	S	S	S	N
LMC6022.01	S	S	S	N
LMC6023.01	S	S	S	N
LMC6023.02	S	S	S	S
LMC6023.03	S	S	S	N
LMC6024.01	S	S	S	N
LMC6025.01	S	S	S	S
LMC6026.01	S	S	S	N
LMC6027.01	S	S	S	N
LMC6028.01	S	S	S	N
LMC6029.01	S	S	S	N
LMC6030.01	S	S	S	N
LMC6031.01	S	S	S	N

S, presença de colônia; N, ausência de colônia.

Fonte: Autoria própria

4.3. Teste de susceptibilidade dos isolados clínicos aos antifúngicos

4.3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A susceptibilidade dos isolados clínicos foi testada com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol onde foi observada a menor concentração capaz de inibir 100% o crescimento do fungo (Tabela 10, Apêndice VII e Figura 4).

Os resultados foram divididos por seção onde os 16 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*, apresentaram a MG de 1,680, 0,770, 2,000 e 0,220 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Analisando separadamente cada espécie dentro desta seção, foi observado que os isolados clínicos *A. parasiticus* apresentaram MG de 2,520, 0,680, 1,710 e 0,540 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Já para *A. flavus*, a MG foi de 1,320, 0,870, 3,030 e 0,220 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *A. tamarii*, a MG foi de 0,500, 1,000, 1,400 e 0,040 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 13 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, espécie *A. fumigatus*, a MG foi 1,000, 1,000, 2,350 e 0,730 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 2 isolados clínicos pertencentes a *Aspergillus* seção *Nigri* foram obtidos os valores de MG 0,710, 4,000, 2,830 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Analisando cada espécie desta seção, foram obtidas para *A. neoniger* as CIMs de 0,250, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Já para *A. brasiliensis*, as CIMs foram 2,000, >16,000, 4,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Terrei*, espécie *A. terreus*, por apresentar somente um isolado clínico, a CIM foi 1,000, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 32 isolados clínicos de *Aspergillus* spp., a MG apresentou os seguintes valores 1,260, 0,980, 2,170 e 0,420 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente.

Além da MG, foi calculada por seção a CIM 50 e CIM 90, ou seja, a concentração mínima capaz de inibir 50% e 90%, respectivamente, da população dos isolados clínicos pertencentes a cada seção. Para *Aspergillus* seção *Flavi*, os valores de CIM 50 foram 2,000, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. As CIMs 90 apresentadas para a *Aspergillus* seção *Flavi* foram de 4,000, 1,000, 4,000 e 1,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Fumigati*, os valores observados para a CIM 50 foram de 1,000, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente; e, para CIM 90 os valores de 2,000, 2,000, 4,000 e 1,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. *Aspergillus* seção *Nigri* apresentou para CIM 50 os valores de 0,250, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente; e, para CIM 90 os valores de 2,000, 16,000, 4,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. *Aspergillus* seção *Terrei* apresenta um isolado clínico, inviabilizando a determinação dos valores de CIM50 e CIM90 (Tabela 11).

Tabela 10: Valores das CIMs dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Isolados clínicos	Anfotericina B (µg/mL)	Itraconazol (µg/mL)	Voriconazol (µg/mL)	Posaconazol (µg/mL)	Espécie
LMC6007.01	2,000	0,500	1,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6008.01	2,000	0,500	4,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6009.01	2,000	0,500	0,500	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6010.02	2,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6012.01	2,000	0,500	2,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6021.01	2,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6023.03	4,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6028.01	4,000	0,500	2,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6029.01	4,000	1,000	2,000	0,125	<i>A. parasiticus</i>
LMC6022.01	1,000	1,000	4,000	0,500	<i>A. flavus</i>
LMC6024.01	1,000	1,000	4,000	0,125	<i>A. flavus</i>
LMC6026.01	1,000	1,000	2,000	0,125	<i>A. flavus</i>

Resultados

LMC6030.01	2,000	0,500	2,000	0,500	<i>A. flavus</i>
LMC6031.01	2,000	1,000	4,000	0,125	<i>A. flavus</i>
LMC6023.01	0,500	1,000	1,000	0,006	<i>A. tamari</i>
LMC6027.01	0,500	1,000	2,000	< 0,003	<i>A. tamari</i>
LMC6010.01	0,500	0,500	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6011.01	1,000	> 16,000	2,000	8,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6013.01	1,000	1,000	4,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6014.01	1,000	0,500	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6015.01	1,000	1,000	4,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6016.01	1,000	0,500	2,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6017.02	2,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6017.03	2,000	1,000	8,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6018.01	1,000	2,000	2,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6019.01	1,000	0,500	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6020.01	1,000	0,500	1,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6023.02	0,500	1,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6025.01	1,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6001.01	2,000	> 16,000	4,000	0,500	<i>A. brasiliensis</i>
LMC6003.01	0,250	1,000	2,000	0,500	<i>A. neoniger</i>
LMC6017.01	1,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. terreus</i>

Fonte: Autoria própria

Resultados

Antifúngico (µg/mL)	MG	Intervalo	CIM 50	CIM 90
AMB	0,710	0,250– 2,000	0,250	2,000
ITR	4,000	1,000– 16,000	1,000	16,000
VOR	2,830	2,000 – 4,000	2,000	4,000
POS	0,500	0,500	0,500	0,500

Seção *Terrei*

Antifúngico (µg/mL)	CIM	Intervalo	CIM 50	CIM 90
AMB	1,000	.	.	.
ITR	1,000	.	.	.
VOR	2,000	.	.	.
POS	0,500	.	.	.

MG, média geométrica; CIM, concentração inibitória mínima; AMB, anfotericina B; ITR, itraconazol, VOR, voriconazol; POS, posaconazol.

Fonte: Autoria própria

Dentre todos os isolados clínicos analisados quanto à susceptibilidade aos antifúngicos, destacaram-se 2 isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati* e um *Aspergillus* seção *Nigri*. O isolado clínico LMC6011.01 que pertence à *Aspergillus* seção *Fumigati*, espécie *A. fumigatus*, foi o isolado clínico que apresentou maiores valores de CIM comparado com os demais isolados clínicos apresentados neste trabalho, tendo como resultado CIM >16,000 µg/mL para itraconazol e 8,000 µg/mL para posaconazol. Outro isolado de destaque de *Aspergillus* seção *Fumigati*, espécie *A. fumigatus*, foi o LMC6017.03 que apresentou CIM de 8,000 µg/mL para voriconazol. O isolado LMC6001.01, espécie *A. brasiliensis* (*Aspergillus* seção *Nigri*) apresentou CIM >16,000 µg/mL para itraconazol (Tabela 10 e Apêndice VII).

4.3.2. Determinação da Concentração Fungicida Mínima

A CFM dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol foram observadas como a menor concentração capaz de matar 100% do fungo, visualizado pelo não crescimento em meio de cultura sólido (PDA) sem adição de seleção (Tabela 12, Apêndice VII e Figura 5).

A MG foi calculada para cada seção onde os 16 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*, apresentaram MG de 2,090, 0,810, 2,000 e 0,320 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e

Resultados

posaconazol, respectivamente. Analisando as espécies separadamente, foi observado que os isolados clínicos *A. parasiticus* apresentaram MG de 3,170, 0,680, 1,710 e 0,540 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Já para os isolados clínicos *A. flavus*, as MGs foram de 1,320, 1,000, 3,030 e 0,250 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *A. tamarii*, as MGs foram de 1,000, 1,000, 1,410 e 0,060 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 13 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, espécie *A. fumigatus*, as MGs foram de 3,595, 1,704, 2,350 e 0,807 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 2 isolados clínicos pertencentes a *Aspergillus* seção *Nigri*, as MGs foram de 1,000, 4,000, 2,830 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Analisando cada espécie desta seção separadamente, as CFMs para *A. neoniger* foram de 0,500, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Já para *A. brasiliensis*, as CFMs foram de 2,000, >16,000, 4,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Terrei*, espécie *A. terreus*, por apresentar somente um isolado clínico, a CFM foi 1,000, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 32 isolados clínicos de *Aspergillus* spp., as MGs foram de 2,430, 1,215, 2,181 e 0,488 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente.

Além da MG, foi calculada por seção a CFM 50 e CFM 90, ou seja, a concentração mínima capaz de matar 50% e 90%, respectivamente, da população dos isolados pertencentes a cada seção. Para *Aspergillus* seção *Flavi*, os valores de CFM 50 foram 2,000, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. As CFMs 90 apresentadas para a *Aspergillus* seção *Flavi* foram de 4,000, 1,000, 4,000 e 1,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Fumigati*, os valores

Resultados

observados para a CFM 50 foram de 2,000, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente; e, para CFM 90 os valores de 16,000, 16,000, 4,000 e 1,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. *Aspergillus* seção *Nigri* apresentou para CFM 50 os valores de 0,500, 1,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente; e, para CFM 90 os valores de 2,000, 16,000, 4,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. *Aspergillus* seção *Terrei* apresenta um isolado clínico, inviabilizando a determinação dos valores de CIM50 e CIM90 (Tabela 13).

Tabela 12: Valores das CFMs dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Isolados clínicos	Anfotericina B (µg/mL)	Itraconazol (µg/mL)	Voriconazol (µg/mL)	Posaconazol (µg/mL)	Espécie
LMC6007.01	4,000	0,500	1,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6008.01	2,000	0,500	4,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6009.01	2,000	0,500	0,500	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6010.02	4,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6012.01	2,000	0,500	2,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6021.01	4,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6023.03	4,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. parasiticus</i>
LMC6028.01	4,000	0,500	2,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6029.01	4,000	1,000	2,000	0,125	<i>A. parasiticus</i>
LMC6022.01	1,000	1,000	4,000	0,500	<i>A. flavus</i>
LMC6024.01	1,000	1,000	4,000	0,250	<i>A. flavus</i>
LMC6026.01	1,000	1,000	2,000	0,125	<i>A. flavus</i>
LMC6030.01	2,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. flavus</i>
LMC6031.01	2,000	1,000	4,000	0,125	<i>A. flavus</i>
LMC6023.01	1,000	1,000	1,000	0,125	<i>A. tamari</i>
LMC6027.01	1,000	1,000	2,000	0,003	<i>A. tamari</i>
LMC6010.01	1,000	0,500	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6011.01	1,000	> 16,000	2,000	8,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6013.01	2,000	1,000	4,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6014.01	16,000	1,000	2,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6015.01	8,000	1,000	4,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6016.01	16,000	1,000	2,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>

Resultados

LMC6017.02	2,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6017.03	4,000	1,000	8,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6018.01	16,000	2,000	2,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6019.01	2,000	4,000	2,000	1,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6020.01	1,000	16,000	1,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6023.02	1,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6025.01	16,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6001.01	2,000	> 16,000	4,000	0,500	<i>A. brasiliensis</i>
LMC6003.01	0,500	1,000	2,000	0,500	<i>A. neoniger</i>
LMC6017.01	1,000	1,000	2,000	0,500	<i>A. terreus</i>

Fonte: Autoria própria

Figura 5: Concentração fungicida mínima dos isolados clínicos agrupados em seção.

Tabela 13: Concentração fungicida mínima dos isolados clínicos agrupados nas respectivas seções

Seção <i>Flavi</i>				
Antifúngico (µg/mL)	MG	Intervalo	CFM 50	CFM 90
AMB	2,090	1,000 – 4,000	2,000	4,000
ITR	0,810	0,500– 1,000	1,000	1,000
VOR	2,000	0,500 – 4,000	2,000	4,000
POS	0,320	0,003 – 1,000	0,500	1,000
Seção <i>Fumigati</i>				
Antifúngico (µg/mL)	MG	Intervalo	CFM 50	CFM 90
AMB	3,595	01,000 – 16,000	2,000	16,000
ITR	1,704	0,500 – >16,000	1,000	16,000
VOR	2,350	1,000 – 8,000	2,000	4,000
POS	0,807	0,500– 8,000	0,500	1,000
Seção <i>Nigri</i>				
Antifúngico (µg/mL)	MG	Intervalo	CFM 50	CFM 90
AMB	1,000	0,500– 2,000	0,500	2,000
ITR	4,000	1,000– 16,000	1,000	16,000
VOR	2,830	2,000 – 4,000	2,000	4,000
POS	0,500	0,500	0,500	0,500
Seção <i>Terrei</i>				
Antifúngico (µg/mL)	CFM	Intervalo	CFM 50	CFM 90
AMB	1,000	.	.	.
ITR	1,000	.	.	.
VOR	2,000	.	.	.
POS	0,500	.	.	.

MG, média geométrica; CFM, concentração fungicida mínima; AMB, anfotericina B; ITR, itraconazol, VOR, voriconazol; POS, posaconazol.

Fonte: Autoria própria

Dentre todos os isolados clínicos analisados quanto à susceptibilidade aos antifúngicos, destacaram-se 5 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus* (LMC6014.01, LMC6015.01, LMC6016.01, LMC6018.01 e LMC6025.01.), em que anfotericina B apresentou para estes isolados clínicos altos valores de CFM, sendo 16, 8, 16, 16 e 16 µg/mL, respectivamente, em comparação com os demais isolados clínicos deste trabalho. O isolado clínico LMC6011.01 que pertence à *Aspergillus* seção

Fumigati, *A. fumigatus*, foi o isolado clínico que apresentou maiores valores de CFM comparado com os demais isolados clínicos deste trabalho, tendo como resultado CFM >16,000 µg/mL para itraconazol e 8,000 µg/mL para posaconazol. Outro isolado clínico de destaque de *Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus* foi o LMC6017.03, que apresentou CFM de 8,000 µg/mL para voriconazol. Um isolado clínico *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. brasiliensis* (LMC6001.01) apresentou CFM >16,000 µg/mL para itraconazol, além deste, o isolado clínico LMC6011.01 (*Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus*) apresentou idêntica CFM para itraconazol (Tabela 12 e Apêndice VII).

Analisando a ação dos antifúngicos para cada seção, foi observadas ações tanto fungistáticas quanto fungicidas, exceto para seção *Terrei* (*A. terreus*) a qual todos os antifúngicos utilizados neste trabalho demonstraram ação fungicida. Na seção *Flavi*, isolados pertencentes à *A. parasiticus* demonstraram ação fungistática somente para anfotericina B, a qual foi constatada em somente 2 de um total de 9 isolados clínicos, os quais apresentaram 1 diluição de diferença entre a CIM e a CFM; *A. flavus*, evidenciou ação fungistática para itraconazol e posaconazol, sendo 1 de um total de 5 isolados clínicos e ambos antifúngicos com 1 diluição de diferença também; *A. tamarii*, demonstrou ação fungistática para 1 de 2 isolados clínicos frente ao posaconazol, sendo a diferença de mais de 1 diluição entre a CIM e a CFM. Na seção *Fumigati* (*A. fumigatus*), teve ação fungicida somente o voriconazol. Para finalizar, em observação a seção *Nigri*, foi demonstrada ação fungistática somente para anfotericina B no isolado clínico identificado como *A. neoniger*.

4.4. Biofilme

4.4.1. Biomassa do biofilme dos isolados clínicos

Os isolados clínicos deste trabalho foram observados quanto à capacidade de formar biofilme em superfície de polipropileno. Desta forma, a biomassa do biofilme foi avaliada pelo método colorimétrico com cristal violeta nos tempos de 3, 18 e 42 horas de incubação. Todas as absorbâncias obtidas para cada isolado clínico estão tabulada no apêndice VI.

Os conídios dos isolados clínicos foram incubados por 3 horas e as médias das absorbâncias foram entre 0,007 e 0,055, sendo que a menor média foi do isolado clínico pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, e a maior média foi de isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*. Em 18 horas de incubação, as médias das absorbâncias variaram de 0,019 a 0,558, sendo que a menor média foi novamente do isolado clínico pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, e a maior média foi de isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus*. Já em 42 horas de incubação, as médias das absorbâncias ficaram entre 0,209 e 1,040, sendo que a menor média da absorbância foi para o isolado clínico pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, e a maior média obtida para os isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri* (Gráfico 6).

Gráfico 6: Biomassa do biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. agrupados em seção

* $p < 0,05$

Fonte: Autoria própria

Em *Aspergillus* seção *Flavi*, em 3 horas de incubação, os isolados clínicos *A. parasiticus* foram os que apresentaram maior absorbância (média de 0,082). Em 18 e 42 horas de incubação tiveram destaque os isolados clínicos

Resultados

A. tamarii, com as médias das absorbâncias de 0,691 e 0,908, respectivamente (Gráfico 7).

Gráfico 7: Biomassa do biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Flavi*

Fonte: Autoria própria.

Em *Aspergillus* seção *Nigri*, o isolado clínico *A. brasiliensis* teve destaque em 3 horas de incubação, onde apresentou a média da absorbância de 0,020. Já em 18 e 42 horas de incubação o isolado clínico *A. neoniger* teve destaque por apresentar a média de 0,240 e 1,390, respectivamente (Gráfico 8).

Gráfico 8: Biomassa do biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Nigri*

Fonte: Autoria própria.

4.4.2. Matriz do biofilme dos isolados clínicos

Os isolados clínicos deste trabalho foram observados quanto a capacidade de formar biofilme em superfície de polipropileno. Desta forma, a matriz do biofilme foi avaliada pelo método colorimétrico com safranina nos tempos de 3, 18 e 42 horas de incubação. Todas as absorbâncias obtidas para cada isolado clínico separadamente está tabulada no apêndice VI.

Os conídios dos isolados clínicos foram incubados por 3 horas e as médias das absorbâncias foram entre 0,000 e 0,011, sendo que a menor média foi dos isolados clínicos pertencentes a duas seções, sendo elas *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus* e *Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus*, e a maior média foi de isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*. Em 18 horas de incubação, as médias das absorbâncias variaram de 0,009 a 0,266, sendo que a menor média foi do isolado clínico pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, e a maior média foi de isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri*. Observando os resultados obtidos em 42 horas, é possível notar que as médias das absorbâncias ficaram entre 0,078 e 0,411,

sendo que a menor média da absorbância foi para o isolado clínico pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, e a maior média para os isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus* (Gráfico 9).

Gráfico 9: Matriz do biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. agrupados em seção

* $p < 0,05$

Fonte: Autoria própria.

Em *Aspergillus* seção *Flavi*, na análise de 3 horas, os isolados clínicos pertencentes à *A. parasiticus* foram os que apresentaram maior absorbância (média de 0,014). Em 18 horas, tiveram destaque os isolados clínicos de *A. flavus* (média de 0,196). Em observação das absorbâncias obtidas em 42 horas, os isolados clínicos de *A. tamarii* apresentaram as mais altas (média de 0,270) (Gráfico 10).

Gráfico 10: Matriz do biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Flavi*

Fonte: Autoria própria.

Aspergillus seção *Nigri*, isolado clínico *A. brasiliensis* apresentou as maiores médias de absorbância em 3, 18 e 42 horas de incubação em comparação com o isolado clínico *A. neoniger*, sendo as médias 0,002 e 0,005 em 3 horas, 0,226 e 0,307 em 18 horas e 0,241 e 0,468 em 42 horas para *A. neoniger* e *A. brasiliensis*, respectivamente (Gráfico 11).

Gráfico 11: Matriz do biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Nigri*

Fonte: Autoria própria.

4.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima em biofilme

A susceptibilidade do biofilme dos isolados clínicos foi testada com os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol onde foi observada a menor concentração capaz de inibir 100% o crescimento do biofilme fúngico (Tabela 14, Apêndice VII e Figura 6).

A MG foi calculada para cada seção, onde os 16 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi* apresentaram MGs de 10,375, 10,375, 20,749 e 2,709 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Analisando separadamente cada espécie dentro desta seção, foi observado que os isolados clínicos *A. parasiticus* apresentaram MGs de 13,716, 9,332, 21,773 e 3,668 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Já *A. flavus* apresentou as MGs de 9,190, 16,000, 27,858 e 2,639 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *A. tamarii*, as MGs foram de 4,000, 5,657, 8,000 e 0,250 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 13 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, espécie *A. fumigatus*, as

MGs foram de 4,450, 5,508, 2,611 e 1,532 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 2 isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri* foram obtidas as MGs de 4,000, 32,000, 32,000 e 32,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Analisando separadamente cada espécie desta seção, foram obtidas, para o isolado clínico *A. neoniger*, as CIMs 2,000, 32,000, 32,000 e 32,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Já *A. brasiliensis* apresentou as CIMs de 8,000, 32,000, 32,000 e 32,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, as CIMs foram de 2,000, 2,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para os 32 isolados clínicos das quatro seções de *Aspergillus* spp., a avaliação da MG apresentou os valores de 6,583, 8,1752, 8,537 e 2,378 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente.

Além da MG, foi calculada por seção a CIM 50 e CIM 90, ou seja, a concentração mínima capaz de inibir 50% e 90%, respectivamente, da população dos isolados pertencentes a cada seção. Para *Aspergillus* seção *Flavi*, os valores da CIM 50 foram 8,000, 32,000, 32,000 e 2,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. A CIM 90 apresentada para a *Aspergillus* seção *Flavi* foi de 16,000, 32,000, 32,000, 32,000 e 32,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Fumigati*, os valores observados para a CIM 50 foi de 2,000, 4,000, 2,000 e 0,500 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente; e, para CIM 90 de 32,000, 32,000, 32,000 e 8,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente. *Aspergillus* seção *Nigri* apresentou para CIM 50 os valores de 2,000, 32,000, 32,000 e 32,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente; e, para CIM 90 de 8,000, 32,000, 32,000 e 32,000 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol, respectivamente.

Resultados

Aspergillus seção *Terrei* apresenta um isolado clínico, inviabilizando a determinação dos valores de CIM50 e CIM90 (Tabela 15).

Tabela 14: Valores das CIMs dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol para o biofilme dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Isolados clínicos	AMB (µg/mL)	ITR (µg/mL)	VOR (µg/mL)	POS (µg/mL)	Espécie
LMC6007.01	4,000	0,500	8,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6008.01	16,000	0,500	8,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6009.01	16,000	32,000	32,000	4,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6010.02	16,000	32,000	16,000	4,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6012.01	16,000	> 32,000	32,000	2,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6021.01	8,000	2,000	32,000	32,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6023.03	16,000	>32,000	32,000	>32,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6028.01	32,000	32,000	32,000	1,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6029.01	16,000	>32,000	32,000	> 32,000	<i>A. parasiticus</i>
LMC6022.01	8,000	32,000	32,000	2,000	<i>A. flavus</i>
LMC6024.01	16,000	32,000	32,000	>32,000	<i>A. flavus</i>
LMC6026.01	8,000	32,000	32,000	0,250	<i>A. flavus</i>
LMC6030.01	8,000	32,000	32,000	16,000	<i>A. flavus</i>
LMC6031.01	8,000	1,000	16,000	0,500	<i>A. flavus</i>
LMC6023.01	8,000	32,000	32,000	0,500	<i>A. tamari</i>
LMC6027.01	2,000	1,000	2,000	0,125	<i>A. tamari</i>
LMC6010.01	2,000	2,000	0,500	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6011.01	2,000	> 32,000	2,000	8,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6013.01	2,000	2,000	0,500	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6014.01	2,000	4,000	0,500	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6015.01	2,000	2,000	4,000	2,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6016.01	2,000	1,000	32,000	2,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6017.02	>32,000	32,000	32,000	4,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6017.03	>32,000	2,000	2,000	8,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6018.01	16,000	>32,000	32,000	>32,000	<i>A. fumigatus</i>
LMC6019.01	16,000	2,000	1,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6020.01	2,000	>32,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6023.02	4,000	8,000	1,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>
LMC6025.01	2,000	4,000	2,000	0,500	<i>A. fumigatus</i>

Resultados

LMC6001.01	8,000	>32,000	32,000	>32,000	<i>A. brasiliensis</i>
LMC6003.01	2,000	>32,000	32,000	>32,000	<i>A. neoniger</i>
LMC6017.01	2,000	2,000	2,000	0,500	<i>A. terreus</i>

AMB, anfotericina B; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol.

Fonte: Autoria própria.

Figura 6. Concentração inibitória mínima dos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol para o biofilme dos isolados clínicos agrupados em seção. * $p < 0,05$

Tabela 15: Susceptibilidade aos antifúngicos para o biofilme dos isolados clínicos agrupados em seções

Seção Flavi					
Antifúngico (µg/mL)	MG	Intervalo	CIM 50	CIM 90	
AMB	10,375	2,000 – 32,000	8,000	16,000	
ITR	10,375	0,500– > 32,000	32,000	32,000	
VOR	20,749	2,000 – 32,000	32,000	32,000	
POS	2,709	0,125– > 32,000	2,000	32,000	

Resultados

Seção *Fumigati*

Antifúngico (µg/mL)	MG	Intervalo	CIM 50	CIM 90
AMB	4,450	2,000 – > 32,000	2,000	32,000
ITR	5,508	1,000 – >32,000	4,000	32,000
VOR	2,611	0,500 – 32,000	2,000	32,000
POS	1,532	0,500– 8,000	0,500	8,000

Seção *Nigri*

Antifúngico (µg/mL)	MG	Intervalo	CIM 50	CIM 90
AMB	4,000	2,000– 8,000	2,000	8,000
ITR	32,000	>32,000	32,000	32,000
VOR	32,000	32,000	32,000	32,000
POS	32,000	32,000	32,000	32,000

Seção *Terrei*

Antifúngico (µg/mL)	CFM	Intervalo	CIM 50	CIM 90
AMB	2,000	.	.	.
ITR	2,000	.	.	.
VOR	2,000	.	.	.
POS	0,500	.	.	.

AMB, anfotericina B; ITR, itraconazo; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; MG, média geométrica; CIM, concentração inibitória mínima.

Fonte: Autoria própria.

4.6. Teste de virulência em *Galleria mellonella*

4.6.1. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*

A virulência dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foi avaliada pela infecção artificial de larvas de sexto instar de *G. mellonella*. Como controles do experimento foram utilizados PBS1X e as linhagens ATCC®204304™ (*A. flavus*) e ATCC®46645™ (*A. fumigatus*).

A análise geral dos isolados clínicos mostrou que os isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi* causaram a morte de todas as larvas infectadas (100%) em, aproximadamente, 24 horas pós-infecção, independentemente da espécie envolvida. Este mesmo padrão de virulência foi observado nas larvas infectadas com ATCC®204304™ (Figura 7).

Figura 7: Sobrevivência das larvas de *G. mellonella* pós-infecções artificiais com isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*. $p > 0,05$. *Linha referente ao controle com PBS. **Linhas sobrepostas dos isolados clínicos e linhagem ATCC.

Para *Aspergillus* seção *Fumigati*, *A. fumigatus*, 100% das larvas infectada com o isolado clínico LMC6018.01 estavam mortas no terceiro dia pós-infecção. De maneira semelhante, os isolados clínicos LMC6019.01, LMC6014.01, LMC6013.01, LMC6020.01 e LMC6010.01 causaram 100% de morte das larvas no 5º, 6º, 8º, 8º e 9º dia pós-infecção, respectivamente. Os isolados clínicos LMC6011.01, LMC6015.01, LMC6016.01, LMC6017.02, LMC6023.02 e LMC6025.01 causaram a morte de 90, 90, 90, 90, 40, 90% das larvas, respectivamente, em 14 dias pós-infecção. A linhagem controle ATCC® 46645™ causou 100 % de morte das larvas no 12º dia pós-infecção (Figura 8).

Figura 8: Sobrevivência das larvas de *G. mellonella* pós-infecções artificiais com isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*. * $p < 0,05$. **Linha referente ao controle com PBS.

Os isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri*, *A. neoniger* e *A. brasiliensis*, apresentaram diferentes perfis de virulência para as larvas de *G. mellonella*. O isolado clínico LMC6003.01 (*A. neoniger*) causou a morte a partir do 3º dia pós infecção, chegando a 100% de morte no 10º dia, enquanto que para o isolado clínico LMC6001.01 (*A. brasiliensis*), as mortes iniciaram no sétimo dia pós-infecção e 100% das larvas estavam mortas no 14º dia pós-infecção (Figura 9).

Figura 9: Sobrevivência das larvas de *G. mellonella* pós-infecções artificiais com isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri*. *Linha referente ao controle com PBS.

O isolado clínico LMC6017.01 pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei*, *A. terreus*, iniciou a morte das larvas no segundo dia pós-infecção e, após 11 dias, 100% das larvas infectadas estavam mortas (Figura 10).

Figura 10: Sobrevivência das larvas de *G. mellonella* pós-infecções artificiais com isolado clínico pertencente à *Aspergillus* seção *Terrei*.

*Linha referente ao controle com PBS.

4.6.2. Hemócitos de *G. mellonella*

4.6.2.1. Contagem direta de hemócitos (CDH)

Com a finalidade de avaliar o perfil de resposta imunológica das larvas à infecção pelos isolados clínicos de *Aspergillus* spp., foi realizado a contagem total de hemócitos (CTH). Para isso, 3 larvas de *G. Mellonella* foram infectadas artificialmente com os 32 isolados clínicos, a linhagem controle ATCC®204304™ e controle negativo PBS. A partir desta infecção, foi realizada a CTH nos tempos 0, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos pós-infecção.

A CTH das larvas de *G. mellonella* controle (PBS) foi próximo a zero (0) em todos os tempos analisados. De forma semelhante também foi observado para as larvas infectadas com isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Fumigati*, *Aspergillus* seção *Terrei* e para a ATCC®204304™. Já as larvas infectadas com os isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri*, apresentaram alta CTH, sendo visualizado um pico na contagem de 120 minutos após a infecção (Gráfico 12).

Gráfico 12: Contagem total de hemócitos de larvas de *G. mellonella* pós-infecções com isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

Fonte: Autoria própria.

4.6.2.2. Contagem diferencial dos hemócitos (CDH)

A contagem diferencial dos hemócitos (CDH) foi baseada nos resultados obtidos na CTH onde os isolados clínicos *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri* induziram picos de CTH em 120 minutos pós-infecção. Assim a contagem diferencial foi realizada no tempo que antecedeu o pico, durante o pico e após o pico, sendo 60, 120 e 240 minutos pós-infecção, respectivamente. Os hemócitos foram classificados de acordo com características morfológicas em 5 tipos celulares distintos, sendo eles prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, oenocitóides e esferulócitos.

No tempo que antecedeu a infecção (T0) foram observados os seguintes hemócitos circulantes, plasmatócitos (49%), granulócito (47%) e esferulócito (4%). Em nenhuma contagem diferencial realizada foi observada a presença dos prohemócitos. Após 60 minutos da infecção, *Aspergillus* seção *Nigri* assemelha-se muito ao PBS, utilizado como controle do experimento. Já as larvas analisadas após a infecção com isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi* demonstraram diferenças significativas nas contagens obtidas dos tipos celulares de plasmatócitos e granulócitos. Observando as

contagens diferenciais durante o pico, 120 minutos após a infecção, *Aspergillus* seção *Nigri* assemelha-se novamente ao PBS e também repete-se a diferença encontrada em *Aspergillus* seção *Flavi* referente a contagem dos plasmatócitos e granulócitos. Nas contagens obtidas após o pico, 240 minutos após a infecção, é encontrada diferença significativa em *Aspergillus* seção *Flavi* referente a contagem somente dos plasmatócitos (Figura 11).

Figura 11: Contagem diferencial de hemócitos de larvas de *G. mellonella* pós-infecções com isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri*. * $p < 0,05$.

Resultados _____

5. Discussão

A aspergilose é uma infecção fúngica oportunista causada por fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* spp. Esse gênero compreende um grupo diversificado de espécies baseadas em suas características morfológicas, fisiológicas e filogenéticas e que podem afetar diretamente a saúde humana. Suas manifestações clínicas variam desde onicomicose, micoses superficiais, asma, alergia até aspergilose pulmonar invasiva (SAMSON *et al.*, 2014).

Com o aumento de espécies resistentes aos antifúngicos utilizados para o tratamento de micoses na clínica, este trabalho teve por finalidade verificar a epidemiologia e o perfil de susceptibilidade das diversas espécies do gênero *Aspergillus*, analisando isolados clínicos de amostras biológicas de diferentes sítios anatômicos isoladas de 27 pacientes do HC da FMRP – USP entre os anos de 2001 a 2017. Foi analisado um total de 32 isolados clínicos oriundos em sua maioria de escarro, seguido de secreção de ouvido, mucosa nasal, lavado bronco-alveolar, líquido cefalorraquidiano, biópsia nasal, biópsia transbrônquica, biópsia ganglionar e bola fúngica do seio esfenoidal.

A identificação molecular foi realizada a partir da amplificação da região ITS do rDNA e do gene constitutivo que codifica a calmodulina. O sequenciamento dessas regiões demonstrou ser uma boa alternativa para a identificação molecular de *Aspergillus* spp., uma vez que mostrou, neste trabalho, elevada identidade e score com as amostras depositadas no banco de dados de sequência de nucleotídeos do *GenBank*, inclusive permitindo diferenciar a maioria das espécies. A análise do sequenciamento distribuiu os 32 isolados clínicos em quatro seções do gênero *Aspergillus*, sendo *Flavi*, *Fumigati*, *Nigri* e *Terrei*. Exatamente metade (50%) dos isolados clínicos agruparam-se em *Aspergillus* seção *Flavi* e, o restante, 40,6%, 6,3% e 3,1% nas seções *Fumigati*, *Nigri* e *Terrei*, respectivamente. Entre os isolados clínicos identificados estão *A. tamaraii* (n=2), *A. fumigatus* (n=13), *A. terreus* (n=1), *A. neoniger* (n=1), *A. brasiliensis* (n=1), *A. parasiticus* (n=9) e *A. flavus* (n=5). Em geral, as espécies pertencentes às seções *Flavi*, *Fumigati* e *Terrei* são causadoras de aspergilose invasiva, enquanto as pertencentes à *Nigri* são

raramente encontradas causando invasão (SAMSON, 1994). Os isolados clínicos identificados neste trabalho foram isolados de material biológico de diferentes sítios anatômicos, sendo que *Aspergillus* seção *Flavi* foram na sua maioria isolados de escarro. Entretanto, nesta mesma seção também foram encontrados isolados clínicos oriundos de material biológico de outros sítios anatômicos como secreção de ouvido e biópsia de gânglios. Entre as espécies desta seção, *A. parasiticus* representa 56,25% dos isolados que em sua maioria é oriunda de escarro (66,67%); *A. flavus* representa 31,25% dos isolados onde 40% são oriundos de coletas de secreção de ouvido e *A. tamarii* representa 12,5% (n=2) dos isolados que são oriundos de escarro e de biópsia ganglionar. *Aspergillus* seção *Fumigati* (*A. fumigatus*) são oriundos na sua maioria de escarro (69,23%), sendo este também o sítio de origem do isolado identificado na seção *Terrei* (*A. terreus*) (n=1). Já os dois isolados clínicos pertencentes à seção *Nigri* são de escarro (*A. brasiliensis*) e de secreção de ouvido (*A. neoniger*). Assim, observa-se que os isolados clínicos deste trabalho foram em sua maioria isolados de escarro, o qual é sugestivo de aspergilose pulmonar invasiva. Portanto, os resultados encontrados são semelhantes aos descritos na literatura para outras regiões geográficas, onde as seções *Flavi*, *Fumigati* e *Terrei* são os principais causadores de aspergilose pulmonar invasiva.

O hospedeiro mamífero apresenta um ambiente adverso para o fungo, que por sua vez precisa ser capaz de se adaptar rapidamente com o objetivo de sobreviver e proliferar (DAVIS, 2009). A característica de termotolerância vem sendo relacionada com a sobrevivência do microrganismo e, consequentemente, com o potencial de virulência, sendo então característica comum entre os patógenos bem sucedidos (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006; DAVIS, 2009; SALES-CAMPOS *et al.*, 2013). Além da característica de termotolerância, a adesão e a invasão provocadas pelas hifas no tecido do hospedeiro são fatores adicionais envolvidos na patogenicidade fúngica (GOW *et al.*, 2002; DAVIS, 2009). A invasão provocada pelo prolongamento das hifas ocorre quando o sistema imunológico do hospedeiro está prejudicado em sua capacidade de impedir ou controlar o crescimento das mesmas. Estas então

conseguem invadir e destruir os tecidos com o intuito de obter nutrientes e sobreviver no ambiente hospedeiro. Como consequência, dependendo da condição da imunossupressão do hospedeiro, pode acarretar em uma infecção disseminada (DAGENAIS e KELLER, 2009). Já a termotolerância permite o desenvolvimento e a invasão do tecido pelo fungo na temperatura do hospedeiro, aumentando a probabilidade do estabelecimento da infecção. Ainda, é dito por McCormick *et al.* (2010) que, para *A. fumigatus*, os genes que determinam a termotolerância parecem ser relevantes para a virulência, permanecendo ambíguo se essas características são distintas para essa dada espécie quando comparadas com as demais do gênero. Neste trabalho, os isolados clínicos pertencentes às seções *Flavi* e *Nigri* não foram termotolerantes em alta temperatura (45°C), por outro lado demonstraram diâmetros de colônias maiores que os demais isolados clínicos no primeiro dia de desenvolvimento na temperatura de 37°C. Em contrapartida, todos os isolados clínicos pertencentes às seções *Fumigati* e *Terrei* foram termotolerantes a 45°C, sendo que os da seção *Fumigati* demonstraram diâmetros de colônias maiores no segundo, terceiro e quarto dias de incubação, enquanto que, apesar do *Terrei* ter apresentado termotolerância, seu diâmetro de colônia apresentou-se menor que a dos demais isolados clínicos.

É visto na literatura a prevalência de *A. fumigatus* como agente causador de aspergilose, uma vez que apresenta conídios pequenos o que facilita sua chegada aos alvéolos pulmonares (PASQUALOTTO, 2009). Os isolados clínicos deste trabalho de *A. fumigatus* apresentaram os menores diâmetros de conídios juntamente com o isolado clínico de *A. terreus*, médias de 2,6 e 2,3 µm, respectivamente. Os isolados clínicos pertencentes às seções *Flavi* e *Nigri*, apresentaram os maiores diâmetros de conídio, sendo as médias de 4,6 e 4,0 µm, respectivamente.

O teste de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* é um ótimo método para avaliar a sensibilidade e ou resistência de microrganismos aos antifúngicos. Além disso, é um importante suporte para o clínico na decisão do tratamento adequado para cada tipo de infecção. A resistência aos antifúngicos

da classe dos azóis é um problema emergente tanto para *A. fumigatus* quanto para outras espécies de *Aspergillus* e está relacionada com uma maior probabilidade de falha no tratamento (DENNING e PERLIN, 2011; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2014). Além disso, é crescente o número de identificações de espécies crípticas, isto é, das espécies com identidade morfológica e fisiológica que agora são classificadas nas diferentes seções do gênero *Aspergillus*. Esta identificação está conectando as espécies crípticas com a resistência antifúngica e diferenças de patogenicidade (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2012, 2013; HOWARD, 2014; NEDEL e PASQUALOTTO, 2014). O antifúngico anfotericina B, pertencente à classe dos poliênicos, apresenta alta eficácia contra *A. fumigatus*. O voriconazol demonstra ação *in vitro* contra espécies do gênero *Aspergillus*, sendo essa ação mais efetiva quando comparada com a ação do itraconazol, sendo que ambos os antifúngicos são pertencentes à classe dos azóis. Tem sido realizada a utilização de voriconazol no tratamento clínico de aspergilose, sendo evidenciada superioridade deste azóis quando comparado com a anfotericina B (MARTINEZ, 2006). Na análise da susceptibilidade foi observado que para a maioria dos isolados clínicos, independente da espécie, não apresentaram altos valores de CIM dos antifúngicos. Três isolados clínicos apresentaram sensibilidade diminuída (altas CIMs) para azóis, sendo estes isolados de escarro. Entre os isolados com sensibilidade diminuída estão dois *A. fumigatus* onde um apresentou alto valor de CIM para itraconazol e posaconazol e outro para voriconazol. O isolado pertencente à seção *Nigri* (*A. neoniger*) demonstrou um alto valor de CIM para itraconazol.

Ainda analisando a susceptibilidade aos antifúngicos, foi observado também, que estes isolados clínicos não apresentaram altos valores de CFM para os antifúngicos. Entretanto, assim como para a CIM, alguns isolados clínicos pertencentes às seções *Fumigati* e *Nigri* apresentaram altos valores de CFM. De um total de 8 isolados clínicos, 7 são pertencentes à seção *Fumigati*, sendo que 1 isolado clínico apresentou altos valores de CIM para itraconazol e posaconazol; 4 isolados clínicos somente para anfotericina B, 1 para itraconazol e outro para voriconazol. O outro isolado clínico é pertencente à

seção *Nigri* (*A. neoniger*) e apresentou alto valor de CFM para itraconazol, somente. É dito na literatura que o antifúngico voriconazol apresenta ação fungicida para fungos do gênero *Aspergillus* (CLANCY e NGUYEN, 1998), porém, ainda é dito, que não há um consenso quanto a importância de se determinar a CFM, sendo que foi observado por Nguyen (1998) que fungos do gênero *Candida* em casos de candidemia a determinação da CFM foi importante para o sucesso do tratamento.

O biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos altamente estruturada onde estes estão associados entre eles mesmos e embebidos em uma matriz extracelular (RAMAGE *et al.*, 2012). Os biofilmes podem atuar como reservatórios para infecções persistentes em pacientes (BEUVAIS e LATGÉ, 2015). Ainda, mais da metade das infecções humanas é associada aos biofilmes, uma vez que se relaciona ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos e ao uso de biomaterias na medicina (DONLAN, 2002; LOPEZ-RIBOT, 2005; RAMAGE *et al.*, 2005; BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006). Na análise da capacidade de formação de biomassa e matriz de biofilme após 3 horas de desenvolvimento, teve destaque os isolados clínicos da seção *Flavi*, principalmente *A. parasiticus*. Entretanto, o volume de biomassa e matriz permaneceram semelhantes em 18 e 42 horas de incubação. Ainda na análise da biomassa, após 18 horas é notada uma maior biomassa para os isolados clínicos da seção *Fumigati* (*A. fumigatus*) e matriz para a seção *Nigri*. Em 42 horas, o volume de biomassa e matriz é semelhante tanto para a seção *Fumigati* (*A. fumigatus*) quanto para a seção *Nigri*, tendo a seção *Nigri* (*A. neoniger*) maior destaque para a produção de biomassa e a seção *Fumigati* para a produção de matriz.

Sabe-se que *in vitro*, *A. fumigatus* apresenta a capacidade de formação de biofilme que demonstra ser resistente a ação dos antifúngicos (KAUR e SINGH, 2014). Mowat *et al.* (2008) demonstra uma diminuição em decorrência do tempo na eficácia de alguns antifúngicos e sugere que a matriz pode desempenhar um papel de impedir a ação do antifúngico. Como foram discutidos anteriormente, anfotericina B, voriconazol, itraconazol e posaconazol demonstraram boa atividade antifúngica *in vitro* aos conídios (condição

planctônica) dos isolados clínicos. Entretanto, considerando a possível maior resistência do fungo devido à formação de biofilme, foi verificada a susceptibilidade *in vitro* do biofilme de cada isolado clínico. Em geral, o biofilme dos isolados clínicos foram sensíveis a anfotericina B, seguido dos azóis, excetuando posaconazol que isoladamente apresentou as menores CIMs, isto é, foi altamente eficaz na ação *in vitro* contra todos os isolados clínicos. Ao analisar cada seção, *Aspergillus* seção *Flavi*, apresentou o biofilme de todos os isolados clínicos com baixos valores das CIMs ao posaconazol seguido da anfotericina B. Já para a seção *Fumigati*, as CIMs para anfotericina B, itraconazol e voriconazol são bem próximas e não apresentam-se tão altas; já a CIM para posaconazol foi a menor, sendo este então o mais eficaz. Além disso, os biofilmes de alguns isolados clínicos demonstraram uma sensibilidade menor em relação a sua forma planctônica frente ao antifúngico voriconazol. Para seção *Nigri*, o antifúngico mais eficaz para o biofilme dos isolados clínicos foi a anfotericina B, sendo que os azóis apresentaram altas CIMs. Para o biofilme do isolado clínico da seção *Terrei*, *A. terreus*, o antifúngico mais eficaz foi o posaconazol, mas nenhum antifúngico apresentou altos valores de CIMs, sendo que os valores permaneceram próximos aos valores obtidos em sua forma planctônica. Para *A. fumigatus* em biofilme a resistência a antifúngico já é bem descrita (MOWAT *et al*, 2007) e essa resistência parece ser dependente da fase em que encontra-se a formação do biofilme, sendo que biofilmes recém-formados demonstram ser mais sensíveis aos antifúngicos (MOWAT *et al.*, 2008). Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho vão de encontro com o que é observado na literatura, onde a anfotericina B mostra-se mais eficiente, em todas as fases de formação de biofilme de *Aspergillus* spp., seguida do voriconazol (KAUR e SINGH, 2014).

Após analisar fatores que são considerados de virulência para os patógenos, ou seja, que facilitam a instalação no hospedeiro, foi realizado o teste de virulência utilizando larvas de *G. mellonella*. Os isolados clínicos da seção *Flavi* demonstraram alta virulência em relação a demais seções. Esse resultado obtido também foi encontrado por Leger *et al.* (2000), onde foi observado que *A. fumigatus* foi menos agressivo que *A. flavus* em infecções

artificiais de larvas de *G. mellonella*. A contagem total dos hemócitos das larvas de *G. mellonella* teve um aumento após 120 minutos pós-infecção artificial tanto para a seção *Flavi* quanto a *Nigri*. Entretanto, mesmo com o aumento da resposta imune do inseto, a contagem diferencial dos hemócitos não se alterou. Dessa forma, podemos sugerir que o microrganismo foi capaz de evadir do sistema imune das larvas infectadas, sendo isto visualizado pela diminuição dos hemócitos após o pico na CTH; incapacidade de ocorrer uma resposta imune apropriada em decorrência da diminuição dos hemócitos circulantes relaciona-se diretamente a alta taxa de mortalidade das larvas (PEREIRA *et al.*, 2015).

Neste trabalho, 32 isolados clínicos do gênero *Aspergillus* foram estudados. Entre eles, os isolados clínicos da seção *Flavi* não apresentaram altos valores das CIMs, não foram termotolerantes e apresentaram conídios com diâmetros maiores, por outro lado, demonstraram ser bons formadores de biofilme e mais virulentos em *G. mellonella*. Já na seção *Fumigati*, onde todos os isolados clínicos foram identificados como *A. fumigatus*, foi notória a alta capacidade de formação de biofilme, e altos valores das CIMs dos antifúngicos, principalmente itraconazol e voriconazol, sendo ambos os antifúngicos da classe dos azóis. Na seção *Nigri*, o isolado clínico *A. brasiliensis* apresentou alto valor de CIM do itraconazol e também grande capacidade de formação de biofilme, mas quanto a esta última característica, o outro isolado identificado nesta seção, *A. neoniger*, demonstrou mais alta capacidade. O único isolado clínico da seção *Terrei*, *A. terreus*, apresentou o menor diâmetro de conídio, todos os antifúngicos testados apresentaram ação fungicida e não demonstrou uma alta capacidade de formação de biofilme, mas demonstrou ser termotolerante frente a alta temperatura. A maioria dos isolados clínicos avaliados neste estudo não demonstraram sensibilidade diminuída aos antifúngicos aqui testados e não demonstraram uma alta capacidade de formação de biomassa e matriz de biofilme, além de ser observada virulência variável para larvas de *G. mellonella*.

6. Conclusões

Algumas conclusões foram obtidas ao final deste trabalho, sendo elas:

- Por intermédio da abordagem polifásica, com a utilização da identificação molecular, os isolados clínicos foram distribuídos em 4 seções e 7 espécies;
- O isolado clínico *A. terreus* apresentou o menor diâmetro de conídio e *A. fumigatus* foram os que apresentaram os maiores diâmetros de colônia;
- *A. terreus* e *A. fumigatus* demonstraram termotolerância;
- Anfotericina B, itraconazol, voriconazol e posaconazol apresentaram baixos valores de CIMs para os isolados clínicos;
- Voriconazol apresentou ação fungicida para todos os isolados clínicos;
- O isolado clínico pertencente à seção *Terrei* (*A. terrei*) apresentou baixo volume de biomassa e de matriz de biofilme;
- O biofilme dos isolados clínicos apresentaram maiores CIMs dos antifúngicos, em comparação com as células planctônicas, sendo os mais eficazes a anfotericina B e o posaconazol;
- Todos os isolados clínicos da seção *Flavi*, independente da espécie, são mais virulentos à larvas de *G. mellonella* que as demais espécies, levando a morte de todas as larvas 24 horas pós-infecção;
- Isolados clínicos das seções *Flavi* e *Nigri* estimulam a resposta imune celular de *G. mellonella* após 120 minutos de infecção.

7. Referências

Alastruey-Izquierdo, A.; Mellado, E.; Cuenca-Estrella, M. **Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice.** Ann N Y Acad Sci 1273: 18–24, 2012.

Alastruey-Izquierdo, A. *et al.* **Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study).** Antimicrob Agents Chemother 57: 3380–3387, 2013.

Alastruey-Izquierdo, A.; Alcazar-Fuoli, L.; Cuenca-Estrella, M. **Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*.** Mycopathologia 178, 427–433, 2014.

Alcazar-Fuoli, L. *et al.* ***Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification.** Antimicrob. Agents Chemother. 52, 1244–1251, 2008.

Alkahyyat, F. *et al.* **The WOPR domain protein *osaA* orchestrates development in *Aspergillus nidulans*.** PLoS, 2015.

Amorim, D. S. *et al.* **Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais: *Aspergillus* infections: general aspects.** Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p.111-118, abr 2004.

Austwick, P. K C.; Longbottom, J. L. **Medically important *Aspergillus* species, in “Manual of Clinical Microbiology”, 3rd. ed., Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1980.**

Baddley, J. W. *et al.* **Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a University Hospital.** Journal of Clinical Microbiology. P5525-5529, 2003.

Balajee, S. A.; Marr, K. A. **Phenotypic and genotypic identification of human-pathogenic *Aspergillus***. Future Microbiol. 1:435–445, 2006.

Balajee, S. A. *et al.* **Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network**. J Clin Microbiol. 2009;47:3138–3141.

Beauvais A.; Latgé J-P. ***Aspergillus* biofilm *in vitro* and *in vivo***. Microbiol Spectrum 3(4): MB-0017, 2015. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0017-2015.

Bergin, D. *et al.* **Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils**. Infection and Immunity. P. 4161 – 4170. 2005.

Blain, J. A.; Anderson, J. G.; Todd, J. R.; Divers, M. **Cultivation of filamentous fungi in the disk fermenter**. Biotechnol Lett 1: 269–274, 1979.

Blankenship, J. R.; Mitchell, A. P. **How to build a biofilm: a fungal perspective**. Curr Opin Microbiol 9: 588-594, 2006.

Brennan, M. *et al.* **Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae**. FEMS Immunol Med Mic. 34, 153-157, 2002.

Clancy, C. J.; Nguyen, M. H. ***In vitro* efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species**. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17:573-575, 1998.

Chen, Y. *et al.* **Epidemiology and Molecular Characterizations of Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* from China**. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. p.01-23, 18 jul. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01005-16>.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of molds: approved standard-third edition M38-A2**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

Dagenais, T. R.; Keller, N. P. **Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergilosis**. Clin Microbiol Rev. 22 (3): 447-65, 2009.

Davis, D. A. **How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence**. Current Opinion in Microbiology, v. 12, p. 365-370, 2009.

De Hoog, G. S. *et al.* **Atlas of clinical fungi 2 nd edn**. Virgili, Reus, Spain 2000.

Deak, E.; Balajee, S. A. **Molecular methods for identification of *Aspergillus* species**. In: Aspergilosis: from diagnosis to prevention. Pasqualotto, A. C. Ed. Springer, NL, p75-83, 2010.

Denning, D. W. *et al.* **Chronic Cavitary and Fibrosing Pulmonary and Pleural Aspergilosis: Case Series, Proposed Nomenclature Change, and Review**. Clinical Infections Diseases 37(Suppl 3): S265-80, 2003.

Denning, D. W.; Perlin, D. S. **Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace**. Future Microbiol; 11: 1229-1232, 2011.

Denning, D. *et al.* **Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs**. Clin Transl Allergy 4: 14, 2014.

Desbois, A.P.; Coote, P.J. **Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an *in vivo* model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents**. J Antimicrob Chemoth. 66, 1785-1790, 2011.

Donlan, R. M. **Biofilms: microbial life on surfaces**. Emerg infect Dis 8: 881-890, 2002.

Dunphy, G. B. *et al.* **Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae).** Can J Microbiol. 49, 514-524, 2003.

Escribano, P. *et al.* **Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain?** Antimicrob. Agents Chemother. 57, 2815–2820. doi: 10.1128/AAC.02487-12. 2013.

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.**Journal of Clinical Microbiology.Vol 46 n5 p. 1793-1803, 2008.

Esteban, A. *et al.* **Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species.** Food Addit Contam. 23 (6): 616-22, 2006.

Fakih, M. G.; Barden, G. E.; Oakes, C. A; Berenson, C. S.. **First reported case of *Aspergillus granulosis* infection in a cardiac transplant patient.***Journal of Clinical Microbiology* 33: 471–473, 1995.

Frisvad, J. C.; Larsen, T. O. **Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*.** Front. Microbiol. 6:1485, 2015.

Fuchs, B.B. *et al.* **Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis.**Virulence. 1, 475-482, 2010.

Garcia-Martos, P. *et al.* ***In vitro* activity of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 20 species of *Aspergillus* using the Sensititre microdilution method.**Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 23: 15–18 [in Spanish], 2005.

Geiser, D. M. *et al.* **The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*.** Stud Mycol. 59: 1-10, 2007.

Gene, J. *et al.* **Cutaneous infection caused by *Aspergillus ustus*, an emerging opportunistic fungus in immunosuppressed patients.**Journal of Clinical Microbiology 39: 1134–1136, 2001.

GILBERT, L. I. **Insect Molecular Biology and Biochemystry.** 1a edição. Elsevier B.V. 2012.

Godet, M.; Munaut, F. **Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*.**FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 304, n. 2, p. 157-168, Feb. 2010.

Gomez-Lopez, A. *et al.* **An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: The role of azole resistance.** Med Mycol; 52: 311-319, 2014.

Goodman; Gilman.**The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 2011, 12ª edição.

Gow, N. A.; Brown, A. J.; Odds, F. C. **Fungal morphogenesis and host invasion.***Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 366-71.

Hara, K. S. *et al.* **Disseminated *Aspergillus terreus* infection in immunocompromised hosts.** Mayo Clin. Proc. 64:770–775, 1989.

Hedayati, M. T. *et al.* ***Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer.**Microbiology, New York, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, June 2007.

Referências

Hillyer, J. F.; Strand, M. R. **Mosquito hemocyte-mediated immune responses.** Curr Opin Insect Sci 3:14–2. 2014.

Hillyer, J. **Insect immunology and hematopoiesis.** Dev Compl Immunol 58:102–118. 2016.

Hong, S. B. *et al.* **Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species.** Mycologia. 97 (6): 1316-29, 2005.

Houbraken, J. *et al.* **Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*.** Studies in Mycology 59:107-128, 2007.

Howard, S. J. **Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species.** Mycopathologia; 178: 435–439, 2014.

Hubka, V. *et al.* **Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov.** Mycologia, 2014

IARC (1993a). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** Vol. 56, *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins*, Lyon, IARC Press, pp. 245–395.

Iatta, R. *et al.* **Species distribution and *in vitro* azole susceptibility of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from clinical and environmental settings.** J Clin Microbiol 54:2365–2372, 2016.doi:10.1128/JCM.01075-16.

Iwama, R.; Ashida, M. **Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.** Insect Biochem 1986;16:547–55.

Iwen, P. C. *et al.* **Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature.** Clin. Infect. Dis. 26:1092–1097, 1998.

Jang, S. S.; Dorr, T. E.; Biberstein, E. L.; Wong, A. ***Aspergillus deflexus* infection in four dogs.** Journal of Medical and Veterinary Mycology **24**: 95–104, 1986.

Junghans, H.; Metzlauff, M. **Construction of *Beta procumbens*-specific DNA probes and their application for the screening of *B. vulgaris* x *B. procumbens* (2n=19) addition lines.** Theor appl Genet. 79: 177-181, 1990.

Kahler, J. S.; Leach, M. W.; Jang, S.; Wong, A. **Disseminated aspergillosis attributable to *Aspergillus deflexus* in a springer spaniel.** Journal of the American Veterinary Medical Association **197**: 871–874, 1990.

Kana, J. R. *et al.* **Microbiota and toxigenicity profile of *Aspergillus flavus* recovered from food and poultry feed mixtures in Cameroon.** Journal of Animal and Poultry Sciences. P. 98-107, 2013.

Kaur, S.; Singh, S. **Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*.** Med Mycol 52: 2–9, 2013.

Kaya, A. D.; Kiraz, N. **In vitro susceptibilities of *Aspergillus* spp. causing otomycosis to amphotericin B, voriconazole and itraconazole.** Mycoses. 50 (6): 447-50, 2007.

Khoury, A. E. *et al.* **Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin-contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of aflR-aflJ intergenic spacer.** Journal of Food Science, v. 76, n. 4, p. M247-M253, 2011.

Kingsolver, M. B.; Huang, Z.; Hardy, R. W. **Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors and connections.** Jornal of Molecular Biology. v.425, p.4921-4936. Dezembro, 2013.

Kumeda, Y.; Asao, T. **Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 67, n. 9, p. 4084-4090, Sept. 2001.

Lacaz, C. S. *et al.* **Tratado de Micologia médica.** Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. illus. ISBN 85-7378-123-8.

Lamoth, F. ***Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice.** Front. Microbiol. 7:683, 2016.

Larsen, T. O.; Svendsen, A.; Smedsgaard, J. **Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*.** Applied and Environmental Microbiology. 67:3630-3635, 2001.

Lass-Florl, C. *et al.* ***Aspergillus terreus* infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants.** Journal of Hospital Infection. 46, 31-35, 2000.

Lavine, M. D.; Strand, M. R. **Insect hemocytes and their role in immunity.** Insect Biochem Mol Biol 32:1295–1309. 2002.

Leger, R. J. ST.; Screen, S. E; Shams-Pirzadeh, B. **Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*.** Applied and Environmental Microbiology. 66: 320-324, 2000.

Lopez-Ribott, J. L. ***Candida albicans* biofilms: more than filamentation.** Curr Biol 15: R453-R455, 2005.

Loussert, C. *et al.* ***In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus***. Cellular Microbiology, v.12, n.3, p. 405 – 410, 2010.

Loyola, A. B. A. T. **Avaliação da suscetibilidade de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. a antifúngicos por microdiluição em caldo e sistema de monitorização de crescimento de hifas (biocell-tracer®)**/Ana Beatriz Alkmim Teixeira Loyola. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Malani, A. N.; Kauffman, C. A. **Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy**. Drugs 67: 1803–1812, 2007.

Marques-Calvo, M. S. **In vitro colonization of hydrophilic contact lenses by *Aspergillus niger***. J Ind Microbiol Biotechnol 29: 6–9, 2002.

Martinez, R. **Atualização no uso de agentes antifúngicos***. J Bras Pneumol. 32(5):449-60, 2006.

McCormick, A.; Loeffler, J.; Ebel, F. ***Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen**. Cellular Microbiology. 12 (11): 1535 – 1543, 2010.

Mowat, E. *et al.* **Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus***. Journal of Medical Microbiology, 56, 1205-1212. 2007.

Mowat, E., *et al.* **Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms**. J. Antimicrob. Chemother. **62**:1281–1284. 2008.

Mowat, E. *et al.* **The characteristics os *Aspergillus fumigatus* micetoma development: is this a biofilm?** Medical mycology, v.120, n.6, 2009.

Mylonakis, E. ***Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host.** Mycopathologia. 165, 1- 3, 2008.

Nedel, W. L.; Pasqualotto, A. C. **Treatment of infections by cryptic *Aspergillus* species.** Mycopathologia 178: 441–445, 2014.

Nguyen, M. H. *et al.* **Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia.** J. Infect. Dis. 177:425-430, 1998.

Nordin, N.; Luchese, R. H. **Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal.** Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998.

Nosanchuk, J. D.; Casadevall, A. **Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds.** Antimicrobial agents chemotherapy, v. 50, n. 11, p. 3519-3528, 2006.

Pappas, P. G. *et al.* **Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology therapy, and influences on mortality in hospitalized adults and pediatric patients.** Clin Infect Dis. 37: 634 – 43, 2003.

Pappas, P. G. *et al.* **Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America.** Clin Infect Dis. 48(5):503-35, 2009.

Pasqualotto, A. C.; Denning, D. W. **Post-operative aspergillosis.** Clin Microbiol Infect. 12 (11): 1060-76, 2006.

Pasqualotto, A. C. **Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*.** Medical Mycology. 47: S261-S270, 2009.

Pavie, J. *et al.* **Breakthrough disseminated *Aspergillus ustus* infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole or caspofungin prophylaxis.**Journal of Clinical Microbiology 43: 4902–4904, 2005.

Pereira, M. F. *et al.* ***Galleria mellonella* is na effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection.** Microbiology. 161: 387-400. 2015.

Pierce, C. G. *et al.* **A simple and reproducible 96 – well plate – based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing.** Nature protocols. V.3, n. 9, p. 1494 – 1500, 2010.

Piontelli, E. **Agentes communes en las aspergilosis humanas: conceptos primarios en La diferenciación de sus complejos de especies.** Bol Micol. 29 (2): 63-100, 2014.

Pitt, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.** Academic Press Inc, London, 1979.

Ramage, G. *et al.* ***Candida* biofilms: an update.***Eukaryot Cell* 4: 633-638, 2005.

Ramage, G. *et al.* ***Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance.** FEMS Microbiol Lett 324: 89-97, 2011.

Renwick, *et al.* **Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination.** Mycopathologia. Ed. 161: 377-384, 2006.

Robinson, W. F.; Connole, M. D.; King, T. J.; Pitt, J. I.; Moss, S. M. **Systemic mycosis due to *Aspergillus deflexus* in a dog.** *Australian Veterinary Journal* **78**: 600–602, 2000.

Sales, M. P. U. **Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. Brasília, v. 35, n. 12, p.1238-1244, ago. 2009.

Sales-Campos, H. *et al.* **The Immune Interplay between the Host and the Pathogen in *Aspergillus fumigatus* Lung Infection.** *Biomed Research International*. v. 2013, p.1-14, 2013.

Samson, R. A. 1994. **Current systematics of the genus *Aspergillus***, p. 261–276. In K. A. Powell, A. Renwick, and J. F. Peberdy (ed.), *The genus Aspergillus. From taxonomy and genetics to industrial application*. Plenum Press, New York, N.Y

Samson, R. A. *et al.* **Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*.** *Stud. Mycol.* 59, 147–203, 2007.

Samson, R. A. *et al.* **Food and indoor fungi.** CBSKNAW Biodiversity Center, Utrecht, 2010.

Samson, R. A. *et al.* **Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*.** *Studies In Mycology*. v. 78, p.141-173, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.

Schuster, E. *et al.* **On the safety of *Aspergillus niger* – a review.** *Appl Microbiol Biotechnol*. V59, P.426-435, 2002.

Seidler, M. J. *et al.* ***Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells.** Antimicrobial agents and chemotherapy. P. 4130-4136, 2008.

Seyedmousavi, S.; Mouton, J.W.; Melchers, W.J.; Bruggemann, R.J.; Verweij, P.E. **The role of azoles in the management of azole-resistant aspergillosis: from the bench to the bedside.** Drug Resist Update 17:37–50, 2014.

Shivaprakash, M. R. *et al.* **Allergic fungal rhinosinusitis caused by *Neosartorya hiratsukae* from India.** Med. Mycol. 47 317–320. 10.1080/13693780802562977. 2009.

Silva, D. M. **Identificação de espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero.** 2009, 76 p.:il.

Silva, R. F. **Chapter 8 – Fungal infections in immunocompromised patients*.** J Bras Pneumol 36 (1): 142-147, 2010.

Symoens, F. *et al.* **Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis.** Med. Mycol. 48(Suppl.1), S10-S16. Doi:10.3109/13693786.2010.501345. 2010.

Thomaz, L. *et al.* ***Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*.** Virulence. 4, 139-146, 2013.

Tritz, D. M.; Woods, G. L. **Fatal disseminated infection with *Aspergillus terreus* in immunocompromised hosts.** Clin. Infect. Dis. 16:118– 122, 1993.

Verweij, P. E. *et al.* **Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: case report and review.** *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1606–1609, 1999.

Verweij, P. E. *et al.* **Azole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*: beneficial or biased?.** *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 8, p.2079-2082, 21 jul. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw259>.

Vogel, H. *et al.* **A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*.** *BMC genomics*. 12, 308, 2011.

Yaguchi, T. *et al.* **Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan.** *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48, 37 46, 2007.

Yamashita, M.; Iwabuchi, K. ***Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures.** *J Insect Physiol* 2001;47:325–31.

Wago, H. **Phagocytic recognition in *Bombyx mori*.** In: Gupta AP, editor. *Immunology of insects and other arthropods*. Boca Raton: CRC Press; 1991.

White, T. J. *et al.* **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Innis MA, Gelfand DH, Shinsky TJ, White TJ, eds). Academic Press Inc, New York: 315–322, 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE I- Meios de cultura

I. ÁGAR BATATA DEXTROSE (PDA) (Acumedia, Brasil)

Infusão de batata 20% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Ágar 1,5% (p/v)

Completar o volume com água destilada e autoclavar a 120°C por 20 minutos.

II. MEIO DE CULTURA RPMI 1640

RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA) 1,04% (p/v)

(com glutamina e vermelho de fenol e sem bicarbonato)

MOPS (Sigma Aldrich, EUA) 0,165 M

Dissolver o pó em 90% do volume final de água. Acrescentar MOPS.

Ajustar para pH 7. Completar o volume com água e esterilizar por filtração com filtro 0,22 µm - Milipore®.

III. YEAST GLUCOSE (YG, YAG)

Extrato de levedura 5 g

Glicose 20 g

Elementos traços 1 mL

Água destilada q.s.p. 1 L

Para o YAG acrescentar 20 g de ágar. Autoclavar a 120°C por 20 minutos.

IV. CZAPEK STOCK SOLUTION (Pitt, 1979)

NaNO₃ 30 g

KCl 5 g

MgSO₄.7H₂O 5 g

FeSO₄.7H₂O 0,1 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

Armazenar entre 4 e 10°C.

V. CZAPEK YEAST AUTOLYSATE AGAR (CYA, Pitt, 1979)

Czapek concentrado	10 mL
Sucrose	30 g
Extrato de levedura (Difco)	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Ágar	20 g
Água destilada q.s.p.	1 L
Autoclavar a 120°C por 20 minutos.	

VI. ÁGAR EXTRATO DE MALTE (MEA, Samson *et al.*, 2010)

Extrato de malte (Oxoid CM0059)	50 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Água destilada q.s.p.	1 L
Autoclavar a 120°C por 20 minutos.	

APÊNDICE II- Soluções de uso geral**I. SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS 1000X**

ZnSO ₄ .7H ₂ O	75 mM
H ₃ BO ₃	180 mM
MnCl ₂ .4H ₂ O	25 mM
FeSO ₄ .7H ₂ O	18 mM
CoCl ₂ .5H ₂ O	6 mM
Cu(SO ₄).5H ₂ O	6 mM
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1 mM
EDTA	140 mM

Adicionar os sólidos na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada. Dissolver cada um completamente antes de adicionar o próximo. Aquecer a solução até 100°C. Resfriar para 60°C e ajustar o pH entre 6,5 e 6,8 com NaOH. Resfriar até atingir a temperatura ambiente e completar para o volume final.

II. TAMPÃO SALINA-FOSFATO 10X (PBS)

NaCl	350 mM
KCl	180 mM
Na ₂ HPO ₄	25 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM

Dissolver em água destilada, acertar o pH 7,4 e completar para o volume final.

APÊNDICE III- Soluções para ensaio com DNA**I- SOLUÇÕES TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA**

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
NaCl (JT Baker, EUA)	250 mM
EDTA (Sigma Aldrich, EUA)	25 mM
SDS (Promega, EUA)	0,5% (p/v)
Dissolver em água destilada.	

II- TAE 50X pH 8

Tris Base	242 g
CH ₃ COOH (ácido acético glacial) (JT Baker, EUA)	57,1 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	100 mL
Água destilada q.s.p.	1 L
Dissolver em água, acertar para o pH 8.0 e acertar o volume final.	

III- TAMPÃO DE AMOSTRA PARA ELETROFORESE DE DNA

Azul de bromofenol (Sigma Aldrich, EUA)	0,25% (p/v)
Xileno cianol FF (Sigma Aldrich, EUA)	0,25% (p/v)
Glicerol (Promega, EUA)	30% (v/v)
Dissolver em água destilada e acertar o volume final.	

IV- GEL DE AGAROSE PARA ELETROFORESE DE DNA

Agarose	1% (p/v)
TAE 1X	q.s.p.

Solubilizar a agarose em tampão TAE em forno microondas, após a completa solubilização aguardar para que esfrie, aproximadamente 50°C, adicionar SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), homogeneizar, distribuir em suporte previamente preparado e aguardar a polimerização para posterior aplicação das amostras.

APÊNDICE IV- Soluções para ensaio com *Galleria mellonella*

I- SOLUÇÃO FISIOLÓGICA DE INSETO (IPS)

EDTA	10 mM
Citrato de sódio	30 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
Tris-HCl	100 mM

Ajustar o pH 6,9 e autoclavar 120°C por 20 minutos.

APÊNDICE V- Isolados clínicos estudados neste trabalho

I. Isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*

LMC	Espécie	Sítio anatômico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6007.01	<i>A. parasiticus</i>	LCR	4,42	N	2	4	0,5	0,5	1	1	1	1	0,21	0,162
LMC6008.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,17	N	2	2	0,5	0,5	4	4	0,5	0,5	0,363	0,122
LMC6009.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,63	N	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,727	0,21
LMC6010.02	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,33	N	2	4	1	1	2	2	0,5	0,5	0,357	0,065
LMC6012.01	<i>A. parasiticus</i>	Biópsia nasal	4,62	N	2	2	0,5	0,5	2	2	1	1	0,856	0,186
LMC6021.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,98	N	2	4	1	1	2	2	0,5	0,5	0,969	0,149
LMC6023.03	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,65	N	4	4	1	1	2	2	0,5	0,5	0,502	0,132
LMC6028.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,58	N	4	4	0,5	0,5	2	2	1	1	0,308	0,105
LMC6029.01	<i>A. parasiticus</i>	Mucosa nasal	5,04	N	4	4	1	1	2	2	0,125	0,125	0,793	0,189
LMC6022.01	<i>A. flavus</i>	LBA	3,74	N	1	1	1	1	4	4	0,5	0,5	0,624	0,135
LMC6024.01	<i>A. flavus</i>	Secreção de ouvido	3,76	N	1	1	1	1	4	4	0,125	0,25	0,74	0,214
LMC6026.01	<i>A. flavus</i>	Secreção de ouvido	4,48	N	1	1	1	1	2	2	0,125	0,125	1,007	0,26
LMC6030.01	<i>A. flavus</i>	Mucosa nasal	3,81	N	2	2	0,5	1	2	2	0,5	0,5	1,127	0,369
LMC6031.01	<i>A. flavus</i>	Bola fúngica do seio esfenoidal	4,01	N	2	2	1	1	4	4	0,125	0,125	0,739	0,208
LMC6023.01	<i>A. tamari</i>	Escarro	5,09	N	0,5	1	1	1	1	1	0,006	0,125	0,676	0,239
LMC6027.01	<i>A. tamari</i>	Biópsia ganglionar	5,52	N	0,5	1	1	1	2	2	< 0,003	0,003	1,141	0,302

I.I LMC6007.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.II. LMC6008.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.III. LMC6009.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.IV. LMC6012.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.V. LMC6021.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.VI. LMC6028.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.VII. LMC6029.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.VIII. LMC6023.03

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.IX. LMC6010.02

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.X. LMC6022.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.XI. LMC6024.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.XII. LMC6026.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.XIII. LMC6030.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.XIV. LMC6031.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.XV. LMC6023.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

I.XVI. LMC6027.01

Apêndices

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II. Isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*

LMC	Espécie	Sítio anatômico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6010.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,5	S	0,5	1	0,5	0,5	2	2	0,5	0,5	0,568	0,232
LMC6011.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,5	S	1	1	> 16,000	> 16,000	2	2	8	8	0,641	0,265
		Biópsia		S	1	2	1	1	4	4	0,5	0,5	0,987	0,5
LMC6013.01	<i>A. fumigatus</i>	transbrônquica	2,7											
LMC6014.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,7	S	1	16	0,5	1	2	2	0,5	1	0,741	0,381
LMC6015.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	1	8	1	1	4	4	1	1	0,528	0,295
LMC6016.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	1	16	0,5	1	2	2	1	1	0,96	0,497
LMC6017.02	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,7	S	2	2	1	1	2	2	0,5	0,5	1,031	0,347
LMC6017.03	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	2	4	1	1	8	8	0,5	0,5	1,117	0,409
LMC6018.01	<i>A. fumigatus</i>	LBA	2,6	S	1	16	2	2	2	2	1	1	0,841	0,306
LMC6019.01	<i>A. fumigatus</i>	Mucosa nasal	2,5	S	1	2	0,5	4	2	2	0,5	1	1,292	0,59
LMC6020.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	1	1	0,5	16	1	1	0,5	0,5	1,535	0,563
LMC6023.02	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,5	S	0,5	1	1	1	2	2	0,5	0,5	0,613	0,233
LMC6025.01	<i>A. fumigatus</i>	LBA	2,7	S	1	16	1	1	2	2	0,5	0,5	2,217	0,721

II.I. LMC6010.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.II. LMC6011.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.III. LMC6013.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.IV. LMC6014.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.V. LMC6015.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.VI. LMC6016.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.VII. LMC6018.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.VIII. LMC6019.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.IX. LMC6020.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.X. LMC6025.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.XI. LMC6023.02

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.XII. LMC6017.02

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

II.XIII. LMC6017.03

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

III- Isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri*

LMC	Espécie	Sítio anatómico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6001.01	<i>A. brasiliensis</i>	Escarro	4,74	N	2	2	> 16,000	> 16,000	4	4	0,5	0,5	0,693	0,468
LMC6003.01	<i>A. niger</i>	Secreção de ouvido	3,23	N	0,25	0,5	1	1	2	2	0,5	0,5	1,386	0,241

III.I. LMC6003.01

Apêndices

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

III.II. LMC6001.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

IV- Isolados clínicos pertencentes à *Aspergillus* seção *Terrei*

LMC	Espécie	Sítio anatómico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6017.01	<i>A. terreus</i>	Escarro	2,32	S	1	1	1		2	2	0,5	0,5	0,209	0,078

IV.I. LMC6017.01

A, B, C e D, características macromorfológicas de crescimento (frente e verso) em MEA a 25°C, CYA 25°C, CYA 37°C e CYA 45°C, respectivamente; E e F, características micromorfológicas dos conidióforos corados com lactofenol azul de algodão e ácido láctico 70%, respectivamente; G, conídio.

APÊNDICE VI- BIOMASSA E MATRIZ DE BIOFILME DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Aspergillus* spp.

Isolados clínicos	3 horas		18 horas		42 horas	
	Biomassa (Abs em 570 nm)	Matriz (Abs em 492 nm)	Biomassa (Abs em 570 nm)	Matriz (Abs em 492 nm)	Biomassa (Abs em 570 nm)	Matriz (Abs em 492 nm)
LMC6007.01	0,260	0,000	0,358	0,154	0,210	0,162
LMC6008.01	0,282	0,008	0,292	0,134	0,363	0,122
LMC6009.01	0,040	0,000	0,457	0,129	0,727	0,210
LMC6010.02	0,034	0,094	0,366	0,118	0,357	0,065
LMC6012.01	0,015	0,004	0,662	0,206	0,856	0,186
LMC6021.01	0,006	0,000	0,607	0,245	0,969	0,149
LMC6023.03	0,012	0,007	0,486	0,149	0,502	0,132
LMC6028.01	0,014	0,007	0,185	0,094	0,308	0,105
LMC6029.01	0,021	0,008	1,222	0,191	0,793	0,189
LMC6024.01	0,011	0,005	0,760	0,221	0,624	0,135
LMC6022.01	0,027	0,014	0,540	0,242	0,740	0,214
LMC6026.01	0,010	0,002	0,529	0,150	1,007	0,260
LMC6030.01	0,012	0,003	0,461	0,201	1,127	0,369
LMC6031.01	0,012	0,006	0,340	0,166	0,739	0,208
LMC6023.01	0,040	0,000	0,433	0,152	0,676	0,239
LMC6027.01	0,029	0,009	0,950	0,240	1,141	0,302
LMC6010.01	0,012	0,000	0,511	0,172	0,568	0,232
LMC6011.01	0,011	0,000	0,155	0,183	0,641	0,265
LMC6013.01	0,009	0,000	0,866	0,131	0,987	0,500
LMC6014.01	0,007	0,000	0,810	0,197	0,741	0,381
LMC6015.01	0,011	0,000	0,261	0,089	0,528	0,295
LMC6016.01	0,011	0,000	0,615	0,282	0,960	0,497
LMC6017.02	0,003	0,000	0,985	0,144	1,031	0,347
LMC6017.03	0,006	0,000	1,115	0,181	1,117	0,409
LMC6018.01	0,013	0,000	0,410	0,281	0,841	0,306
LMC6019.01	0,012	0,000	0,244	0,207	1,292	0,590
LMC6020.01	0,010	0,000	0,283	0,223	1,535	0,563
LMC6025.01	0,014	0,000	0,601	0,169	2,217	0,721
LMC6023.02	0,012	0,000	0,402	0,105	0,613	0,233
LMC6001.01	0,021	0,005	0,122	0,307	0,693	0,468
LMC6003.01	0,014	0,002	0,242	0,226	1,386	0,241
LMC6017.01	0,008	0,000	0,019	0,010	0,209	0,078

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE VII – Tabela Geral Dos Resultados Deste Trabalho.

LMC	Espécie	Sítio anatômico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6007.01	<i>A. parasiticus</i>	LCR	4,42	N	2	4	0,5	0,5	1	1	1	1	0,21	0,162
LMC6008.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,17	N	2	2	0,5	0,5	4	4	0,5	0,5	0,363	0,122
LMC6009.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,63	N	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,727	0,21
LMC6010.02	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,33	N	2	4	1	1	2	2	0,5	0,5	0,357	0,065
LMC6012.01	<i>A. parasiticus</i>	Biópsia nasal	4,62	N	2	2	0,5	0,5	2	2	1	1	0,856	0,186
LMC6021.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,98	N	2	4	1	1	2	2	0,5	0,5	0,969	0,149
LMC6023.03	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,65	N	4	4	1	1	2	2	0,5	0,5	0,502	0,132
LMC6028.01	<i>A. parasiticus</i>	Escarro	4,58	N	4	4	0,5	0,5	2	2	1	1	0,308	0,105
LMC6029.01	<i>A. parasiticus</i>	Mucosa nasal	5,04	N	4	4	1	1	2	2	0,125	0,125	0,793	0,189
LMC6022.01	<i>A. flavus</i>	LBA	3,74	N	1	1	1	1	4	4	0,5	0,5	0,624	0,135
LMC6024.01	<i>A. flavus</i>	Secreção de ouvido	3,76	N	1	1	1	1	4	4	0,125	0,25	0,74	0,214
LMC6026.01	<i>A. flavus</i>	Secreção de ouvido	4,48	N	1	1	1	1	2	2	0,125	0,125	1,007	0,26
LMC6030.01	<i>A. flavus</i>	Mucosa nasal	3,81	N	2	2	0,5	1	2	2	0,5	0,5	1,127	0,369
LMC6031.01	<i>A. flavus</i>	Bola fúngica do seio estenoidal	4,01	N	2	2	1	1	4	4	0,125	0,125	0,739	0,208
LMC6023.01	<i>A. tamari</i>	Escarro	5,09	N	0,5	1	1	1	1	1	0,006	0,125	0,676	0,239
LMC6027.01	<i>A. tamari</i>	Biópsia ganglionar	5,52	N	0,5	1	1	1	2	2	< 0,003	0,003	1,141	0,302

LMC	Espécie	Sítio anatômico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6010.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,5	S	0,5	1	0,5	0,5	2	2	0,5	0,5	0,568	0,232
LMC6011.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,5	S	1	1	> 16,000	> 16,000	2	2	8	8	0,641	0,265
		Biópsia		S	1	2	1	1	4	4	0,5	0,5	0,987	0,5
LMC6013.01	<i>A. fumigatus</i>	transbrônquica	2,7											
LMC6014.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,7	S	1	16	0,5	1	2	2	0,5	1	0,741	0,381
LMC6015.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	1	8	1	1	4	4	1	1	0,528	0,295
LMC6016.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	1	16	0,5	1	2	2	1	1	0,96	0,497
LMC6017.02	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,7	S	2	2	1	1	2	2	0,5	0,5	1,031	0,347
LMC6017.03	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	2	4	1	1	8	8	0,5	0,5	1,117	0,409
LMC6018.01	<i>A. fumigatus</i>	LBA	2,6	S	1	16	2	2	2	2	1	1	0,841	0,306
LMC6019.01	<i>A. fumigatus</i>	Mucosa nasal	2,5	S	1	2	0,5	4	2	2	0,5	1	1,292	0,59
LMC6020.01	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,6	S	1	1	0,5	16	1	1	0,5	0,5	1,535	0,563
LMC6023.02	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	2,5	S	0,5	1	1	1	2	2	0,5	0,5	0,613	0,233
LMC6025.01	<i>A. fumigatus</i>	LBA	2,7	S	1	16	1	1	2	2	0,5	0,5	2,217	0,721

LMC	Espécie	Sítio anatômico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6001.01	<i>A. brasiliensis</i>	Escarro	4,74	N	2	2	> 16,000	> 16,000	4	4	0,5	0,5	0,693	0,468
LMC6003.01	<i>A. neoniger</i>	Secreção de ouvido	3,23	N	0,25	0,5	1	1	2	2	0,5	0,5	1,386	0,241

LMC	Espécie	Sítio anatômico	Conídio (µm)	45°C	AMB		ITR		VOR		POS		Biofilme (42 horas)	
					CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	Biomassa	Matriz
LMC6017.01	<i>A. terreus</i>	Escarro	2,32	S	1	1	1		2	2	0,5	0,5	0,209	0,078

LMC, código do isolado clínico; LCR, líquido cefalorraquidiano; LBA, lavado broncoalveolar; N, ausência de colônia; S, presença de colônia; CIM, concentração inibitória mínima (ug/ml); CFM, concentração fungicida mínima(ug/ml); AMB, anfotericina B; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; Biomassa, absorbância em 570 nm; Matriz, absorbância em 492 nm.

Fonte: Autoria própria.