



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE  
RIBEIRÃO PRETO**



**Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero  
*Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos**

Lívia Maria Maciel da Fonseca

Ribeirão Preto  
2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos**

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 Mestra em Ciências Bioagentes e Biotecnologia aplicados à Farmácia

Orientada: Lívia Maria Maciel da Fonseca

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 11/05/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto – SP**

**2022**

FONSECA,  
L.M.M.

**Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de  
diferentes sítios anatômicos**

MESTRADO  
FCFRPUSP  
2022

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.

Fonseca, Livia Maria Maciel

Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos. Ribeirão Preto, 2022  
93p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências e Biotecnologia - Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à farmácia.

Orientador(a): von Zeska Kress, Marcia Regina.

1. *Aspergillus*. 2. Identificação molecular. 3. *Cyp51A*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Maria Maciel da Fonseca

Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos.

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 Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina von Zeska Kress

Aprovado em:

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho aos meus pais Vera Lucia Maciel da Fonseca e Magno Francisco da Fonseca, que não pouparam esforços para que eu atingisse meus objetivos. Às minhas irmãs Larissa e Letícia e ao meu irmão Mateus, que sempre estiveram ao meu lado sendo meu suporte; não alcançaria nada sem vocês.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Regina von Zeska Kress pela orientação, suporte, ensinamentos e paciência ao longo dos meus anos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Roberto Martinez pela doação das amostras utilizadas nessa pesquisa.

Às técnicas Ludmilla e Solange por todo o auxílio e suporte durante a realização desse trabalho.

À coordenação e toda a equipe do programa de Biociências e Biotecnologia da FCFRP.

Às agências CNPq e FAPESP pelo financiamento da minha bolsa de mestrado e fomento à pesquisa.

Aos meus professores, que pavimentaram a estrada para que eu chegasse até aqui.

À minha família de Ribeirão Preto: Glaucia, Djulio, Paloma, Lia e Bats pelo apoio, companheirismo e cumplicidade. Vocês tornaram meus dias mais leves.

Aos meus queridos amigos que mesmo de longe foram suporte: obrigada por serem ombro.

À minha família pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Código de Financiamento 2017/25300-8”

“Talvez seja por isso que lemos e por que nos momentos de escuridão voltamos aos livros: para encontrar palavras para o que já sabemos.”

Alberto Manguel



## RESUMO

FONSECA, L.M.M. **Estudos moleculares de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos.** 2022. 93f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

*Aspergillus* é um gênero de fungos filamentosos de distribuição universal que abriga espécies que são capazes de gerar diversos tipos de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Diversas espécies de *Aspergillus* vêm apresentando resistência aos antifúngicos clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções. Neste projeto foram estudados 51 isolados clínicos do gênero *Aspergillus* oriundos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo quanto a sua morfologia, identificação molecular, susceptibilidade aos antifúngicos, resistência aos azóis, fatores de virulência e virulência no modelo alternativo *Galleria mellonella*. Na análise morfológica foram estudadas a macromorfologia da colônia gigante e a micromorfologia da estrutura de reprodução assexuada dos fungos. A identificação molecular de *Aspergillus* seções *Fumigati* e *Flavi* e respectivas espécies foi realizada pelo sequenciamento da região *internal transcribed spacer* (ITS) do DNA ribossômico (rDNA) e dos genes codificadores da  $\beta$ -tubulina (*benA*) e calmodulina (*caM*). A susceptibilidade dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. ao Itraconazol (ITR), Posaconazol (POS), Voriconazol (VOR) e Anfotericina B (AMB) foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O gene *cyp51A* e respectiva região promotora foram sequenciados para estudo de mecanismo de resistência aos azóis. Os fatores de virulência foram estudados quanto ao tamanho do conídio, termotolerância e biofilme (biomassa e matriz). Entre os 51 isolados clínicos deste estudo, 80% (n=41/51) e 20% (n=10/51) foram identificados como *A. fumigatus sensu stricto* e *A. flavus*, respectivamente. Entre eles, 68,6% (n=35/51) apresentaram a AMB com valores da concentração inibitória mínima (CIM) igual ou superior ao *epidemiological cutoff value* (ECV) e 41,5% (n=21/51) apresentaram a CIM dos azóis maior que o ECV, isto é, perfil não selvagem a estes antifúngicos. Foram identificadas 9 diferentes mutações de nucleotídeos no gene *cyp51A*, sendo que 3 são mutações silenciosas e 6 são mutações com baixa relação a resistência aos azóis. Quanto aos fatores de virulência, os isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* apresentam pequenos conídios e foram termotolerantes, enquanto os isolados clínicos *A. flavus* apresentam conídios com maior dimensão e não foram termotolerantes, o que justifica a maior porcentagem de isolados clínicos *A. fumigatus* entre os isolados clínicos deste estudo. Quanto à formação de biofilme, ambas espécies tiveram desde baixa à alta formação, sendo que *A. flavus* foi a espécie que apresentou isolados clínicos com maior formação de biofilme. Quando avaliada a virulência em *G. mellonella*, foi observado que *A. flavus* apresentam maior virulência quando comparados com os isolados clínicos de *A. fumigatus*. Associando esses dados, pode-se sugerir que a maior virulência está associada com a maior capacidade de formação de biofilme.

Palavras-chave: *Aspergillus*, identificação molecular, biofilme, resistência aos azóis, *cyp51A*, *Galleria mellonella*.

## ABSTRACT

FONSECA, L.M.M. **Molecular studies of clinical isolates of the *Aspergillus* genus from different anatomical sites.** 2022. 93f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

*Aspergillus* is a genus of filamentous fungi of universal distribution that harbors species that can generate different infections, mainly in immunocompromised individuals. Several species of *Aspergillus* have shown resistance to antifungals that are clinically available for the treatment of infection conditions. In this project, 51 clinical isolates of the genus *Aspergillus* from patients at the Clinical Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – University of São Paulo) were studied regarding their morphology, molecular identification, susceptibility to antifungal agents, azole resistance, virulence factors, and virulence in the alternative model *Galleria mellonella*. The macromorphology of the giant colony and the micromorphology of the asexual reproduction structure of the fungi were studied. Molecular identification of *Aspergillus* sections *Fumigati* and *Flavi* and species was performed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA) and the genes encoding  $\beta$ -tubulin (*benA*) and calmodulin (*caM*). The susceptibility of clinical isolates of *Aspergillus* spp. to itraconazole (ITR), posaconazole (POS), voriconazole (VOR), and amphotericin B (AMB) was evaluated by the broth microdilution method based on the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The *cyp51A* gene and its promoter region were sequenced to study the mechanism of resistance to azoles. Analyzed virulence factors were conidia size, thermotolerance, and biofilm (biomass and matrix). Among the 51 clinical isolates in this study, 80% (n=41/51) and 20% (n=10/51) were identified as *A. fumigatus sensu stricto* and *A. flavus*, respectively. Among them, 68.6% (n=35/51) presented AMB minimal inhibitory concentration (MIC) values equal to or greater than the ECV, and 41.5% (n=21/51) showed the azoles MIC greater than the ECV, i.e., non-wild type profile to these antifungals. Nine different nucleotide mutations were identified in the *cyp51A* gene, 3 of which are silent mutations and 6 are mutations with a low relation to azole resistance. *A. fumigatus sensu stricto* clinical isolates had small conidia and were thermotolerant. In contrast, *A. flavus* clinical isolates had larger conidia and were not thermotolerant, which justifies the higher percentage of *A. fumigatus* among the clinical isolates in this study. Both species had low to high biofilm formation. However, *A. flavus* clinical isolates presented more significant biofilm formation. Additionally, *A. flavus* clinical isolates showed higher virulence when compared to *A. fumigatus sensu stricto* clinical isolates. Linking these data, we can suggest that higher virulence seems to be associated with higher biofilm formation.

Keywords: *Aspergillus*, molecular identification, azole resistance, biofilm formation, *cyp51A*, *Galleria mellonella*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Esquema da micromorfologia das estruturas reprodutivas assexuais (conidióforo) do gênero *Aspergillus*. Fonte: Autoria própria com o auxílio do programa BioRender.

**Figura 2:** Classificação do gênero *Aspergillus* de acordo com seu subgênero e seção das espécies atualmente válidas. Fonte: Gautier et al., 2016 com modificações.

**Figura 3** - Diâmetro (em centímetros) das colônias dos isolados clínicos do gênero *Aspergillus*. Os conídios foram inoculados em meio de cultura YAG e incubados a 35°C por 4 dias. **A, B** e **C**: isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati*; **D**: isolados clínicos *Aspergillus* seção *Flavi*. Fonte: autoria própria.

**Figura 4** - Conidióforos (vesícula, metula, fiálides e cadeias de conídios) dos isolados clínicos do gênero *Aspergillus* em meio de cultura YAG a 35°C por 24 horas. Microscopia de campo claro com Lactofenol azul de algodão. Objetiva de 40×. Barra de escalas: 50 µm. Fonte: autoria própria.

**Figura 5** – Alinhamento da região promotora do gene *cyp51A* dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto*.

**Figura 6** – Correlação de Pearson entre os valores de absorvância da biomassa e matriz do biofilme dos isolados clínicos. Fonte: autoria própria.

**Figura 7** – Sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolados clínicos *A. flavus* e *A. fumigatus sensu stricto*. Fonte: Autoria própria.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Primers utilizados na amplificação por PCR e sequenciamento do gene *Cyp51A* de *A. fumigatus*.

**Tabela 2** - Isolados Clínicos de *Aspergillus* spp. oriundos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP no período de 2017 a 2019.

**Tabela 3** - Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) dos conídios dos isolados clínicos. DP, desvio padrão.

**Tabela 4** – Identificação molecular dos isolados clínicos do gênero *Aspergillus* pelo sequenciamento da região ITS do rDNA.

**Tabela 5** – Identificação molecular dos isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati* e seção *Flavi* pelo sequenciamento dos genes que codificam a  $\beta$ -tubulina (*benA*) e calmodulina (*caM*).

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto* e *A. flavus* aos antifúngicos e mutações no gene *cyp51A* nos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto*.

**Tabela 7**– Susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados clínicos agrupados nas seções *Fumigati* e *Flavi*.

**Tabela 8** – Substituição de nucleotídeos encontradas no gene *cyp51A* dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto*.

**Tabela 9** - Valores da Matriz e Biomassa do Biofilme dos isolados clínicos.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-FC: Flucitosina ou 5-fluorocitosina
- 5-FU: 5-fluorouracil
- ABC: transportadores *ATP-Binding Cassete*
- ABPA: Aspergilose broncopulmonar alérgica
- AMB: Anfotericina B
- API: Aspergilose pulmonar invasiva
- benA*: gene codificador da  $\beta$ -tubulina
- BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
- C: Citosina
- caM*: gene codificador da Calmodulina
- CEP: Comitê de ética em pesquisa
- CIM: Concentração Inibitória Mínima
- CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- dNTP: Desoxirribonucleotídeo fosfatado
- DP: Desvio padrão
- ECV: Ponto de Corte Epidemiológico (*epidemiological cutoff value*)
- gDNA: DNA genômico
- ICBN: Código Internacional de Nomenclatura Botânica
- ITR: Itraconazol
- ITS: Espaçador transcrito interno (*internal transcribed spacer*)
- MSF: Superfamília de facilitadores principais (*major facilitator superfamily*)
- MG: Média geométrica
- MOPS: Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico
- MEA: Ágar extrato de malte
- PBS: Tampão fosfato salino (*phosphate-buffered saline*)
- PCR: Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- POS: Posaconazol
- rDNA: DNA ribossomal
- RNA: Ácido ribonucleico
- RPB2: RNA polimerase II segunda maior subunidade
- RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

T: Timina

TR: Repetições em tandem (*tandem repeats*)

VOR: Voriconazol

YAG: Ágar dextrose extrato de levedura

YG: Dextrose extrato de levedura

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. GÊNERO ASPERGILLUS.....	1
1.2. A ASPERGILOSE, O TRATAMENTO ANTIFÚNGICO E A RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS.....	4
1.2.1. Mecanismo de resistência aos azóis mediado pelo promotor e gene <i>cyp51A</i> .....	8
1.2.2. Resistência aos azóis não mediada por <i>cyp51A</i> .....	9
1.3. BIOFILME MICROBIANO.....	10
1.4. O MODELO ANIMAL ALTERNATIVO <i>GALLERIA MELLONELLA</i> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1. OBJETIVO GERAL:.....	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	11
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1. OS ISOLADOS CLÍNICOS DESTES ESTUDO, OBTENÇÃO DOS CONÍDIOS E COMITÊ DE ÉTICA.....	12
3.2. ESTUDO MORFOLÓGICO E FISIOLÓGICO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	12
3.2.1. Análise Morfológica: Macro e Micromorfologia.....	12
3.2.1.1. Colônia gigante.....	12
3.2.1.2. Microcultivo.....	12
3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	13
3.3.1. Extração do DNA genômico.....	13
3.3.2. Qualificação e Quantificação do DNA.....	14
3.3.3. Amplificação por PCR da região ITS do rDNA, e dos genes que codificam a $\beta$ -tubulina e calmodulina e sequenciamento.....	14
3.4. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	15
3.5. ESTUDO DO GENE <i>CYP51A</i> E REGIÃO PROMOTORA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>A. FUMIGATUS SENSU STRICTO</i> .....	16
3.6. CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE VIRULÊNCIA <i>IN VITRO</i> E VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS CLÍNICOS EM MODELO ANIMAL ALTERNATIVO ( <i>G. MELLONELLA</i> ).....	16
3.6.1. Análise Fisiológica e Termotolerância.....	16
3.6.2. Biofilme.....	17
3.6.2.1. Quantificação da Biomassa do biofilme.....	17
3.6.2.2. Quantificação da Matriz do Biofilme.....	17
3.6.3. Caracterização da virulência utilizando o modelo animal alternativo <i>Galleria mellonella</i> .....	18
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	19
4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR – ITS, B-TUBULINA E CALMODULINA.....	29
4.3. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	35
4.4. ESTUDO DO GENE <i>CYP51A</i> E REGIÃO PROMOTORA DOS ISOLADOS CLÍNICOS <i>A. FUMIGATUS SENSU STRICTO</i> .....	38
4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DA VIRULÊNCIA EM <i>GALLERIA MELLONELLA</i> .....	41
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>

6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	53
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
8.	<b>ANEXOS</b> .....	1
8.1.	<b>ANEXO 1</b> – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS 51 ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>ASPERGILLUS</i> SPP. DESTE ESTUDO. 1	
8.2.	<b>ANEXO 2</b> – TABELA DOS RESULTADOS GERAIS DOS 51 ISOLADOS CLÍNICOS DO GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i> . 3	
8.3.	<b>ANEXO 3</b> - CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROMORFOLÓGICAS DOS 51 ISOLADOS CLÍNICOS DO GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i> . MEA, MEIO DE CULTURA EXTRATO DE MALTE; YAG, MEIO DE CULTURA EXTRATO DE LEVEDURA DEXTROSE. FONTE: AUTORIA PRÓPRIA .....	9



## 1. INTRODUÇÃO

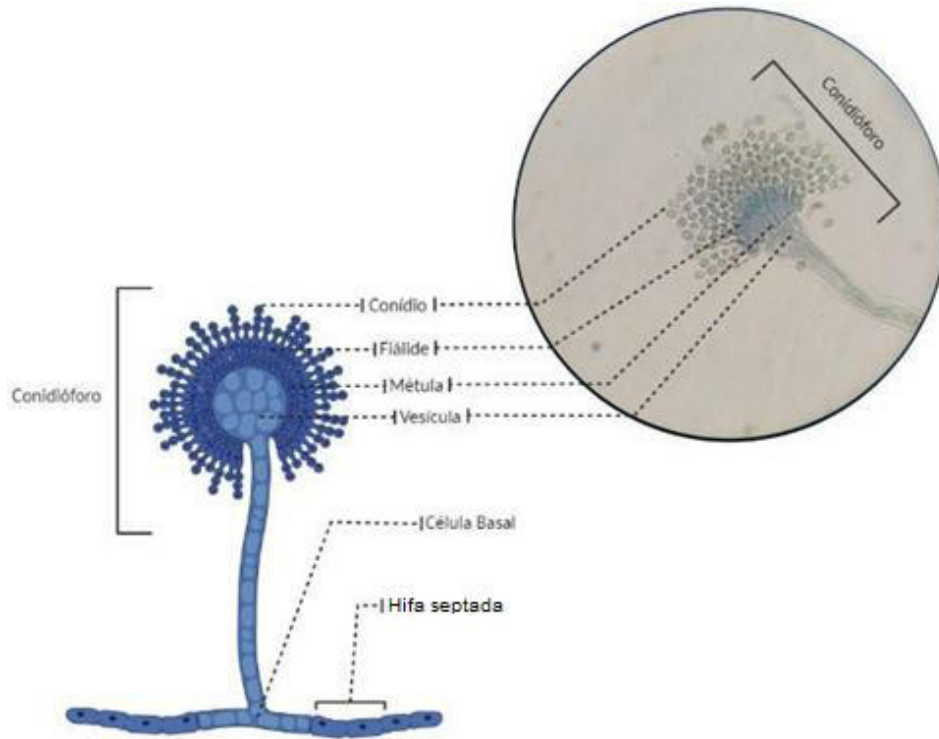
### 1.1. GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é classificado no reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e Família *Trichocomaceae*. Os fungos do filo *Ascomycota* possuem a característica de produzir seus esporos (ascósporos) em estruturas sexuais específicas, denominadas asco (MONEY, 2015) e a ordem *Eurotiales* apresenta fungos conhecidos como mofos verdes e azuis (HOUBRAKEN et al., 2020). As características macro e micromorfológicas dos fungos do gênero *Aspergillus* são de grande importância para a identificação das espécies. Algumas características morfológicas da colônia incluem taxas de crescimento, cor, textura, conidiação, produção de esclerócitos (massa compacta de micélio endurecido contendo reservas alimentares), cores da colônia, pigmentos solúveis no meio de cultura e os ascomas, que para este gênero são do tipo cleistotécio (corpo frutificante fechado e esférico que contém os ascos e ascósporos). Na maioria das espécies desse gênero ocorre a reprodução assexuada e sexual, e tanto as características macromorfológicas da colônia quanto às características microscópicas das estruturas reprodutivas são relevantes na identificação clássica do gênero e espécie. Essas características incluem, na reprodução assexuada, as características da estrutura de frutificação, como a cor, e dimensão do conídio, a forma da cabeça (vesícula) dos conidióforos, a presença ou ausência de métulas entre a vesícula e as fiálides (ou seja, se são unisseriadas ou bisseriadas) (figura 1) e a textura da colônia. Na reprodução sexual se observa o tamanho e morfologia dos ascos e ascósporos encontrados dentro dos cleistotécios (TSANG et al., 2018).

Inicialmente, a classificação dos fungos era baseada nos aspectos morfológicos, principalmente a morfologia das estruturas reprodutivas assexuada (conidióforos, esporóforos, hifas, entre outros) (figura 1) e assexuada (cleistotécio). Contudo, considerando que isolados clínicos de *Aspergillus* spp. podem manifestar algumas atípicas como conidiação mais lenta e formação aberrante do conidióforo, além de sobreposição de algumas características morfológicas por parte da seção *Fumigati*, este é um critério limitado de classificação taxonômica (BALAJEE et al., 2006). Dessa forma, a eficácia da caracterização do gênero pela abordagem polifásica, onde há a combinação de diversos dados e informações, sendo elas fenotípicas, moleculares (incluindo genômica, proteômica e metabólitos secundários),

genéticas e filogenéticas, para assim, atingir uma taxonomia de consenso, vêm sendo demonstrada (SAMSON, 2009).

**Figura 1** – Esquema da micromorfologia das estruturas reprodutivas assexuais (conidióforo) do gênero *Aspergillus*. Fonte: Autoria própria com o auxílio do programa BioRender.

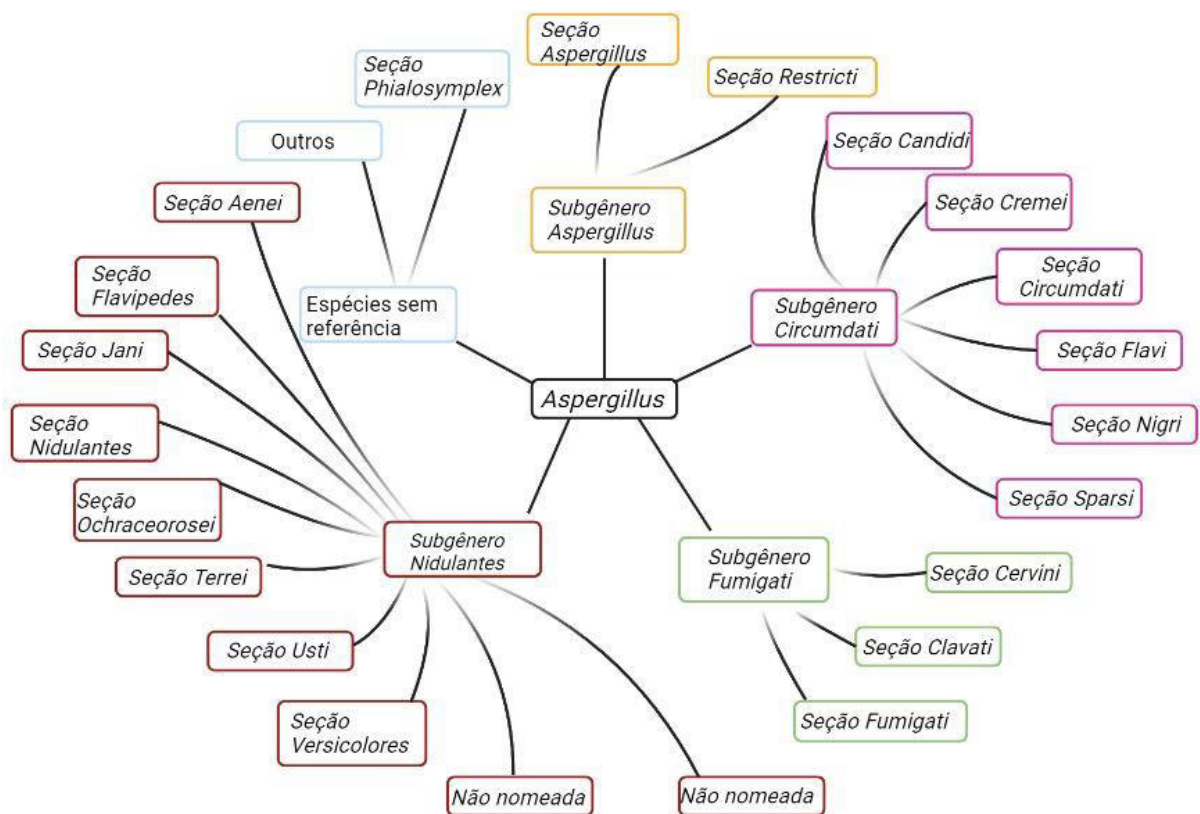


A região do DNA ribossomal (rDNA) normalmente utilizada para a identificação dos fungos é a região do espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer - ITS*). Contudo, nem sempre essa região possui variações o suficiente para distinguir as espécies. Dessa forma, um segundo marcador é necessário para identificar com maior precisão uma espécie. Esse marcador, assim como o ITS, deve fazer uso de *primers* universais, ser de fácil amplificação e, ao contrário do ITS, capaz de distinguir as espécies. Baseado nesses requisitos, os genes utilizados na identificação das espécies de *Aspergillus* são os que codificam a calmodulina (*caM*),  $\beta$ -tubulina (*benA*) e RNA polimerase II segunda maior subunidade (*RPB2*). Entretanto, existe a frequente dificuldade de amplificação do *RPB2* e a amplificação de muitos parálogos quando utilizado o *benA* (SAMSON et al., 2014).

O gênero *Aspergillus* era inicialmente dividido em subgêneros e grupos. Entretanto, para acompanhar as normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN), o

gênero *Aspergillus* atualmente é dividido em subgênero e seções, sendo que, até 2019, 451 espécies já haviam sido descritas (BALAJEE et al., 2006; STEENWYK et al., 2019). Com o avanço das técnicas moleculares e a abordagem da identificação polifásica, cada vez mais espécies de *Aspergillus* têm sido estudadas e caracterizadas. Assim, os subgêneros e seções são: subgênero *Circumdati*, seções *Candidi*, *Cremei*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* e *Sparsi*; subgênero *Aspergillus*, seções *Aspergillus* e *Restricti*; subgênero *Fumigati*, seções *Cervini*, *Clavati* e *Fumigati*; subgênero *Nidulantes*, seções *Aenei*, *Flavipedes*, *Jani*, *Nidulantes*, *Ochraceorosei*, *Terrei*, *Usti*, *Versicolores* e duas seções ainda não nomeadas onde se encontram as espécies *A. bisporus*, *A. ivorensis* e *A. raperi*. Além disso, há as espécies não referenciadas e a seção *Phialosymplex* que ainda não foi inserida em um subgênero (GAUTIER et al., 2016) (figura 2).

**Figura 2:** Classificação do gênero *Aspergillus* de acordo com seu subgênero e seção das espécies atualmente válidas. Fonte: Gautier et al., 2016 com modificações.



As seções *Circumdati*, *Clavati*, *Cremei*, *Nigri*, *Restricti*, *Usti* e *Versicolores* possuem espécies predominantemente isoladas do ambiente, enquanto as espécies comumente isoladas de amostras clínicas se encontram, em sua maioria, dentro das seções *Fumigati*, *Flavi* e *Terrei*

(GAUTIER et al., 2016). Dentro das diversas espécies da seção *Fumigati*, *A. fumigatus* se destaca como a causa mais comum de aspergilose invasiva nas pesquisas epidemiológicas. Entretanto, estudos recentes apontam que espécies identificadas fenotipicamente como *A. fumigatus* podem ser geneticamente distintas, levando a identificação e descrição de novas espécies (BALAJEE et al., 2006). Assim, além de *A. fumigatus sensu stricto*, as novas espécies que são associadas às infecções fúngicas são *A. novofumigatus*, *A. hiratsukae*, *A. viridinutans*, *A. lentulus* e *A. udagawae*, tendo os dois últimos apresentado (*in vitro*) baixa sensibilidade aos antifúngicos utilizados no tratamento da aspergilose invasiva (BALAJEE et al., 2006; ALCAZAR-FUOLI et al., 2008; ESCRIBANO et al., 2013). Dentro das diversas espécies da seção *Flavi*, há duas espécies de relevância clínica: *A. parasiticus* e *A. flavus*, sendo o último, ao lado de *A. fumigatus* a segunda maior causa de aspergilose invasiva e não-invasiva em seres humanos. Além disso, as seis espécies que possuem importância econômica são, além de *A. flavus* e *A. parasiticus*, também *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamarii*. Os fungos da seção *Flavi* produzem uma gama de aflatoxinas e agentes cancerígenos naturais (GODET, MUNAUT, 2010; DENNING et al., 2003; HEDAYATI et al., 2007). Dentro da seção *Terrei*, existem espécies de relevância clínica devido a sua resistência intrínseca aos antifúngicos comerciais, em destaque a *A. terreus*, que possui baixa sensibilidade *in vivo* e *in vitro* à Anfotericina B, além disso, alguns estudos vêm apresentando um perfil de linhagem não selvagem de amostras clínicas de *A. terreus* para os azóis (ZORAN et al., 2018; GAUTIER et al., 2016).

Embora a maioria das espécies dentro de *Aspergillus* seção *Nigri* sejam isolados ambientais, há algumas espécies dentro da seção, *A. niger* e *A. tubingensis*, que são frequentemente encontrados, junto com *A. flavus*, entre os isolados clínicos de otomicose (otite externa fúngica) e de amostras de nasofaringe (MOUSSALLE et al., 1999).

## 1.2. A ASPERGILOSE, O TRATAMENTO ANTIFÚNGICO E A RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

A aspergilose (infecção por *Aspergillus*) é uma doença multiforme, onde as manifestações clínicas podem se apresentar da forma alérgica, crônica ou invasiva, as quais são determinadas pela resposta imune do hospedeiro (SALES, 2009; TSANG et al., 2018). Assim, embora seja comum a exposição e inalação de conídios de *Aspergillus* spp., existe uma pequena parcela da população que desenvolve um quadro de aspergilose, sendo eles os

imunossuprimidos ou imunocomprometidos. A doença envolve diversas apresentações clínicas, incluindo aspergiloma (ou bola fúngica) no pulmão e nos seios nasais e paranasais, exacerbação da asma e asma grave com sensibilização fúngica, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), otomicose, onicomiose, ceratite, endoftalmite, infecções cutâneas e de feridas, infecções osteoarticulares, aspergilose pulmonar crônica, sinusite crônica invasiva e granulomatosa, bronquite e traqueobronquite invasiva e aspergilose pulmonar invasiva (API) (GAUTIER et al., 2016).

A linha de defesa principal contra conídios inalados de *Aspergillus* spp. são os macrófagos, além disso, receptores de reconhecimento de patógenos trabalham identificando componentes específicos da parede fúngica e produzem citocinas que atuam estimulando o recrutamento de neutrófilos, que são o principal mecanismo de defesa contra hifas. Dessa forma, pode-se concluir que a aspergilose invasiva normalmente acomete pacientes imunossuprimidos ou com alguma deficiência imune, como pacientes em quadro de neutropenia, recém transplantados ou em tratamento prolongado de altas doses de corticosteroides (KOUSHA et al., 2011).

A API é caracterizada por uma infecção similar à pneumonia bacteriana, de rápida progressão, onde o patógeno invade o parênquima pulmonar e tende a penetrar os vasos sanguíneos e disseminar pelo hospedeiro (MILLER, 1996). A ABPA é a forma alérgica da doença onde o paciente apresenta hipersensibilidade aos antígenos de *Aspergillus* spp., principalmente de *A. fumigatus*. A patogenia da ABPA não é totalmente conhecida, embora a maioria dos casos ocorram entre pacientes com doenças pulmonares como asma ou fibrose cística. O diagnóstico é dado através de testes sorológicos e radiológicos, sendo os sinais da doença o espessamento da parede brônquica. O tratamento é feito com a administração oral de corticosteroides, que atuam reduzindo a hipersensibilidade à resposta inflamatória provocada pelo patógeno. Alguns estudos têm sido realizados utilizando itraconazol e voriconazol no tratamento de ABPA e vêm apresentando resultados promissores. Contudo, o itraconazol em alguns casos pode atuar potencializando os corticosteroides, o que pode levar a uma anomalia do hormônio adrenocorticotrófico e insuficiência adrenal. Além da ABPA outras doenças que podem ser causadas por reações alérgicas a *Aspergillus* são pneumonia de hipersensibilidade e granulomatose broncocêntrica (KOUSHA et al., 2011; MILLER, 1996; JUDSON, 2004; SKOV et al., 2002).

Existem poucas classes de antifúngicos utilizadas no tratamento das infecções fúngicas, entre elas estão os azóis, polienos, derivados pirimidínicos e equinocandinas. Os antifúngicos da classe dos azóis agem inibindo a enzima 14 $\alpha$ -esterol desmetilase, membro da família do citocromo P450 codificado pelo gene *cyp51A*, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol – componente da membrana celular fúngica. Assim, os azóis agem interferindo na biossíntese de ergosterol na membrana fúngica, alterando dessa maneira a estrutura e funções da membrana e, por consequência, inibindo o desenvolvimento do fungo. A ligação do átomo de nitrogênio do anel triazólico de cinco membros ao átomo de ferro do grupo heme presente no sítio ativo da proteína CYP51A inibe a etapa de desmetilação, resultando no bloqueio da síntese de ergosterol. Esta classe é representada pelos triazóis itraconazol (ITR), voriconazol (VOR) e posaconazol (POS). Espécies do gênero *Aspergillus* possuem duas isoenzimas CYP51A e CYP51B e, embora a codificação desses genes não seja essencial para o crescimento celular, a inativação concomitante de ambos pode ser letal ao microrganismo. O uso indiscriminado na agricultura de antifúngicos da classe dos azóis, combinado com a atividade fungistática em baixa dose e o uso excessivo e prolongado de azóis aumentaram a porcentagem de cepas de fungos resistentes (HARGROVE *et al.*, 2015; ZAKARIA *et al.*, 2020).

A classe dos polienos é representada pela Anfotericina B (AMB), que é um agente antimicótico de amplo espectro utilizado em infecções sistêmicas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Pesquisas apontam que a AMB é uma droga que age na membrana formando estruturas semelhantes a canais (poros) que atravessam a bicamada lipídica. É cónito que essa droga se liga ao ergosterol na parede celular da membrana e, acredita-se que durante o processo de auto oxidação da AMB, seus efeitos antifúngicos resultam em dano oxidativo. Contudo, a utilização da AMB deve ser limitada devido à sua nefrotoxicidade, que pode resultar em insuficiência renal (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; SOKOL-ANDERSON *et al.*, 1986; POSCH *et al.*, 2018).

A Flucitosina ou 5-fluorocitosina (5-FC) é um análogo fluorado da citosina que é usado como agente antifúngico para o tratamento de infecções graves, é uma droga da classe dos derivados pirimidínicos e, muitas vezes, é administrada em conjunto com a AMB, pois sua ação conjunta potencializa os efeitos da AMB, resultando numa diminuição da dosagem e redução dos efeitos colaterais. A 5-FC atua diretamente sobre os organismos fúngicos, por inibição competitiva de absorção de purina e pirimidina e indiretamente pelo metabolismo intracelular.

Após a absorção pela citosina permease, a 5-FC sofre um processo de desaminação e é convertida em 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU pode passar por dois processos distintos dentro da célula fúngica: ele pode ser convertido em trifosfato de 5-fluorouridina, composto que será incorporado ao RNA fúngico e agirá inibindo a síntese proteica; ou pode ser metabolizado e convertido em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato, composto que age inibindo a fonte primária de timidina na biossíntese do DNA. Esse antifúngico é amplamente utilizado no tratamento de micoses sistêmicas, uma vez que não há grande taxa de conversão de flucitosina em 5-fluorouracil, permitindo uma alta absorção da droga pelo organismo e distribuição por todo o corpo (SANDE & MANDELL, 1987; SIDRIM & MOREIRA, 1999; HOULŇ, SPÍZEK & HAVLÍČEK, 2020).

Os antifúngicos da classe das equinocandinas atuam inibindo a síntese de  $\beta$ -1,3-Glucana, resultando num desequilíbrio osmótico que leva a morte do organismo. As drogas dessa classe agem em uma gama de fungos e leveduras e possuem baixa incidência de efeitos colaterais. Estão dentro dessa classe a Caspofungina, a Anidufungina e a Micafungina, sendo a primeira amplamente utilizada no tratamento da API (DERESINSKI & STEVENS, 2003; DIEKEMA et al., 2003).

A maioria dos medicamentos para o tratamento das infecções fúngicas são fungistáticos, ou seja, agem inibindo o crescimento do fungo. Dessa forma, o tratamento das infecções fúngicas é demorado e demonstra menor eficácia em indivíduos imunocomprometidos (PATTERSON & STREK, 2016). O tratamento das infecções por *Aspergillus* spp. varia de acordo o tipo de infecção causada pelo microrganismo, por exemplo, nos casos de ABPA o tratamento é realizado pela associação de corticosteróide e ITR. Já nos casos de API o tratamento de primeira escolha é o VOR. Em casos da contraindicação do VOR, a administração da AMB lipossomal é recomendada. Acredita-se que a formulação lipídica da AMB lipossomal é mais efetiva e menos tóxica do que a AMB convencional (PATTERSON et al., 2016).

Os antifúngicos comerciais apresentam o mecanismo de ação com único sítio alvo (*e.g.* 14 $\alpha$ -esterol desmetilase, ergosterol,  $\beta$ -1,3-Glucana sintase). Portanto, existe a maior probabilidade de desenvolvimento de linhagens fúngicas resistentes ao tratamento, como mostrado por diversos estudos em que espécies fúngicas estão desenvolvendo resistência a esses grupos de antifúngicos (MELLADO et al., 2001; MELLADO et al., 2005; SNELDERS et al., 2010; MELLADO et al., 2007; CHOWDHARY et al., 2011). Considerando *Aspergillus* spp.,

observou-se casos de resistência principalmente contra antifúngicos do grupo dos azóis e algumas equinocandinas (SATISH et al., 2019). A resistência aos antifúngicos pode ser definida de duas maneiras, microbiológica e clínica. A resistência microbiológica ocorre quando a concentração do antimicrobiano usado contra o patógeno é maior do que o utilizado contra uma linhagem selvagem. Já a resistência clínica é definida quando a concentração do antifúngico a ser utilizado para inibir/matar o fungo é maior do que a considerada segura ao paciente (PFALLER, 2012).

### **1.2.1. Mecanismo de resistência aos azóis mediado pelo promotor e gene *cyp51A***

A resistência aos antifúngicos azólicos está associada às inserções de sequência de repetição em tandem (*Tandem Repeats*, TR) na região promotora do gene *cyp51A* e às mutações neste próprio gene. As alterações na região promotora do gene *cyp51A* relacionadas à resistência do fungo aos antifúngicos são mediadas pelas TR os quais são 34 pb, 46 pb e 53 pb *upstream* (a montante) do gene *cyp51A* (DUDAKOVA et al., 2017). Em estudos de vigilância epidemiológica, a TR34 é especialmente responsável por até 70% das alterações associadas à resistência (ZHANG et al., 2020). As mutações presentes no gene *cyp51A* – alvo do mecanismo de ação dos azóis e codificador da enzima 14 $\alpha$ -esterol desmetilase - estão associadas à resistência a estes antifúngicos e presentes em diversos isolados clínicos, incluindo em espécies do gênero *Aspergillus*. Dependendo do tipo de mutação e sua localização na sequência genética, a cepa resultante pode exibir uma variedade de fenótipos de resistência, abrangendo um espectro de suscetibilidades aos azóis, incluindo a resistência a um único ou a diversos antifúngicos desta classe ao mesmo tempo (NYWENING et al., 2020). As mutações pontuais no gene *cyp51A* são geralmente relatadas em isolados clínicos de pacientes que recebem terapia azólica de longo prazo (geralmente mais de 4 meses), particularmente no caso de aspergilose crônica. Contudo, essas mutações vêm sendo observadas com mais frequência nos últimos tempos. Algumas mutações, como substituições de aminoácidos únicos na glicina 54 (G54V, G54E, G54R, G54W) e 138 (G138C) da proteína CYP51A causam uma resistência cruzada ao ITR e POS. Outras mutações, como G448S, reduzem a atividade do CYP51A e induzem a resistência ao VOR. A substituição na metionina (M) 220 (M220I, M220V, M220T, M220K) está relacionada a vários padrões de suscetibilidade reduzida aos azóis. As mutações pontuais, como A284T, F219C, F219I, G434C, G432S, H285Y, P216L e Y431C, também foram encontradas esporadicamente (DUDAKOVA et al., 2017; SPIESS et al., 2014; BUEID et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011).



O alelo de resistência mais frequentemente observado em *A. fumigatus* consiste em uma TR de 34 pb (TR34) na região promotora combinada com a substituição L98H da CYP51A (TR34/L98H). Esta combinação foi detectada várias vezes e associada a um aumento de até 8 vezes na expressão do gene. Da mesma forma, a mutação TR46/Y121F/T289A é um mecanismo de resistência emergente com alto nível de resistência ao VOR e CIMs (Concentração Inibitória Mínima) elevados para todos os outros azóis. Além disso, uma sequência de repetição em tandem de 53 pb também foi detectada na região promotora do *cyp51A* sem qualquer substituição de aminoácidos no gene. Essa mutação confere um perfil de resistência do fungo ao ITR e VOR e baixa suscetibilidade ao POS (HARGROVE *et al.*, 2015; DIAZ-GUERRA *et al.*, 2003; DUDAKOVA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020).

### **1.2.2. Resistência aos azóis não mediada por *cyp51A***

É importante apontar que nem todos os isolados que demonstram baixa/nenhuma sensibilidade aos antifúngicos azólicos terão alteração na região promotora e mutações no gene *cyp51A*. Os mecanismos de resistência comumente reconhecidos incluem ocorrências genéticas e epigenéticas, como alterações nos componentes do fator de transcrição, alteração da via biossintética de esterol, superexpressão de bombas de efluxo de drogas específicas ou outros meios pelos quais o acúmulo intracelular dos azóis é reduzido nas células fúngicas. Alterações genéticas que não estão dentro das sequências ou regiões promotoras do *cyp51A* foram encontradas e associadas de forma convincente à resistência aos antifúngicos e nas falhas de tratamento em pacientes (NYWENING *et al.*, 2020).

Um repressor transcripcional do *cyp51A*, o fator de transcrição de ligação CCAAT fúngico (*CCAAT binding complex*, CBC) conhecido como HapE quando alterado com uma única mutação confere o fenótipo de resistência a diversos antifúngicos azólicos ao mesmo tempo (CAMPS *et al.*, 2012a; GSALLER *et al.*, 2016b). Outro mecanismo de resistência aos azóis é a superexpressão de bombas de efluxo associadas à extrusão de moléculas antimicrobianas, incluindo os azóis. Os transportadores *ATP-Binding Cassete* (ABC) e as classes da superfamília facilitadora principal (*major facilitator superfamily* – MFS) são considerados os dois principais tipos de bombas de efluxo com relevância clínica em diversos fungos patogênicos. O gene de codificação da bomba de efluxo de *A. fumigatus*, *cdr1B*, também conhecido como *abcB*, *abcC* ou *abcG1*, codifica um transportador ABC e está associado à resistência ao ITR (NYWENING *et al.*, 2020). A instabilidade genética pode resultar em

alterações de ploidia, rearranjo cromossômico e mutações no código genético. Mutações ou ruptura de genes que codificam elementos de danos ao DNA e vias de pontos de checagem do ciclo celular afetam a estabilidade genômica e a suscetibilidade aos azóis. Por exemplo, a deleção dos genes que codificam as quinases AtmA e AtrA, que estão envolvidos na resposta ao dano ao DNA e ativação de vias de reparo de DNA e pontos de checagem do ciclo celular, aumentam a adaptabilidade ao estresse causado pelos azóis a níveis mais altos do que uma linhagem do mesmo fungo do tipo selvagem (DOS REIS et al., 2018).

### 1.3. BIOFILME MICROBIANO

Os biofilmes microbianos são populações de células associadas e incorporadas a uma matriz extracelular produzida pelo próprio microrganismo. Existem diversos gêneros de fungos causadores de infecções em que a patogenicidade está relacionada à produção de biofilme. Entre eles estão: *Candida*, *Coccidioides*, *Aspergillus*, *Malassezia*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* (RAMAGE et al., 2012; FANNING; MITCHELL, 2012).

Entre as vantagens da formação de biofilme estão a resistência a choques mecânicos e estresse químico, proteção contra o ambiente e aumento da resistência aos antimicrobianos. Na literatura há evidências que comprovam que os fungos do gênero *Aspergillus* possuem alta capacidade de formação de biofilme, o que resulta em um maior índice de infecções e maior resistência aos antifúngicos (ZHANG et al., 2021; RAMAGE et al., 2012). De acordo com Kaur e Singh (2014), estudos feitos em pacientes infectados por *Aspergillus* sp. reportam que o índice de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (principalmente pacientes com câncer e que apresentam neutropenia) é alto devido à alta capacidade de produção de biofilme e a consequente resistência aos antimicrobianos.

O processo de formação de biofilme é gradativo, sendo que biofilmes jovens são mais suscetíveis aos antifúngicos que os biofilmes maduros. Estudos recentes mostram que esse fenômeno se dá pelo fato de que a atividade de efluxo do antifúngico aumenta de acordo com a maturação do biofilme. Sendo assim, a formação do biofilme está diretamente relacionada à resistência microbiana (RAMAGE et. al., 2012).

### 1.4. O MODELO ANIMAL ALTERNATIVO *Galleria mellonella*

Devido ao custo elevado e à dificuldade de manutenção nos últimos tempos, vêm-se observando a necessidade de redução da utilização de modelos vertebrados para testes *in vivo* de toxicidade e virulência. Dessa forma, modelos alternativos como *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* e *Manduca sexta* vem sendo utilizados em diversas pesquisas de virulência e toxicidade para microrganismos e agentes antimicrobianos (KAVANAGH; FALLON, 2010). Diversas pesquisas vêm demonstrando que insetos podem ser utilizados para avaliar a patogenicidade microbiana e fornecer resultados comparáveis aos obtidos com mamíferos, uma vez que a resposta imune inata de vertebrados permanece semelhante à resposta imune encontrada em insetos (LAVINE; STRAND, 2002; KAVANAGH; REEVES, 2004; WITWER *et al.*, 1999; RENWICK *et al.*, 2007; BRENNAN *et al.*, 2002). As larvas da cera de abelha *Galleria mellonella* têm sido usadas para avaliar a virulência de uma variedade de patógenos bacterianos e fúngicos. A correlação com o perfil de virulência desses microrganismos em *G. mellonella* foi observado em camundongos (FUCHS; MYLONAKIS, 2006). Concomitante à fácil manutenção, a utilização de *G. mellonella* como modelo *in vivo* traz benefícios pois oferece a possibilidade de ser mantido em diversas temperaturas, variando de 25 °C a 37 °C, possibilitando o estudo de características do patógeno relacionadas à temperatura. Além disso, o modelo *G. mellonella* permite uma fácil inoculação das células fúngicas, o que é vantajoso uma vez que a inoculação por injeção permite um maior controle da concentração de células fúngicas inoculadas, possibilitando resultados mais precisos e satisfatórios (FUCHS; MYLONAKIS, 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL:

- Estudar os aspectos morfológicos, identificação molecular, susceptibilidade aos antifúngicos, resistência aos azoles, fatores de virulência *in vitro* e virulência em modelo animal alternativo de uma amostragem retrospectiva por conveniência do período de 2017 a 2019 de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de diferentes sítios anatômicos de pacientes oriundos do HCFMRP–USP, da cidade de Ribeirão Preto e macrorregião.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a macromorfologia e a micromorfologia dos isolados clínicos;
- Identificar os isolados clínicos por métodos moleculares;

- Avaliar a susceptibilidade dos isolados clínicos aos antifúngicos comerciais;
- Identificar mutações no gene *cyp51A* dos isolados clínicos e alterações na respectiva região promotora;
- Avaliar os fatores de virulência (termotolerância e biofilme) e virulência em *G. mellonella* dos isolados clínicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. OS ISOLADOS CLÍNICOS DESTE ESTUDO, OBTENÇÃO DOS CONÍDIOS E COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) 5403 - USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto na 200ª reunião ordinária realizada em 14/08/2020 conforme Parecer Consubstanciado nº 4.214.202.

Neste projeto foram estudados 51 isolados clínicos do gênero *Aspergillus* oriundos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo da cidade de Ribeirão Preto, SP e macrorregião. As linhagens-controle deste estudo foram *Aspergillus flavus* ATCC 204304 e *Aspergillus fumigatus* ATCC 46645.

Os conídios dos isolados clínicos e linhagens controle foram cultivados em meio de cultura ágar dextrose extrato de levedura (YAG) a 37°C por 2 dias. Após, foram suspensos com água bidestilada autoclavada e auxílio de pipeta Pasteur esterilizada. A suspensão foi filtrada em Miracloth com poros de 22 a 25 µm (Merck EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) autoclavado e os conídios contados com auxílio de hemocitômetro. A concentração da suspensão de conídio foi ajustada de acordo com a necessidade de cada experimento com água bidestilada autoclavada.

#### 3.2. ESTUDO MORFOLÓGICO E FISIOLÓGICO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

##### 3.2.1. Análise Morfológica: Macro e Micromorfologia

###### 3.2.1.1. Colônia gigante

O volume de 5 µl de uma concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL de *Aspergillus* spp. foi inoculado no centro de uma placa de Petri contendo meio de cultura YAG e incubadas a 37°C. O diâmetro da colônia foi medido com uma régua milimétrica a cada 24 horas até o período de 96 horas (4 dias) de incubação.

###### 3.2.1.2. Microcultivo

A análise micromorfológica das estruturas de reprodução assexual do fungo filamentosos foi realizada pela semeadura de  $5 \times 10^6$  conídios de cada isolado clínico em blocos (aprox.  $1 \times 1 \times 0,6$  cm) de YAG que foram cobertos com uma lamínula autoclavada e, em seguida, incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas em câmara úmida, sendo feito em duplicata. As lamínulas foram transferidas para uma lâmina com uma gota de lactofenol azul de algodão (SAMSON *et al.*, 2014). O material foi observado em microscopia de campo claro (N120, Coleman) em aumento de  $400\times$  e capturado com a câmera HDCE-X5 com o auxílio do software ScopImage 9.0. Foram analisadas as características das estruturas da reprodução assexual (hifas, conidióforos, haste, vesícula, fiálide e conídios).

Para a análise dos conídios, o volume de  $5 \mu\text{l}$  de uma concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL foi inoculado em uma lâmina e coberto com uma lamínula. O material foi observado em microscopia de campo claro (N120, Coleman) em aumento de  $1000\times$  e capturado com a câmera HDCE-X5 com o auxílio do software ScopImage 9.0. As medições do diâmetro dos conídios foram realizadas com o auxílio do software ImageJ, foram realizadas 20 medições por isolado, posteriormente as médias e desvios padrões de cada isolado foram geradas.

### 3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

#### 3.3.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico (gDNA) das linhagens utilizadas neste estudo foi realizada de acordo com modificações do método descrito por Junghans e Metzloff (1990). A concentração de  $2 \times 10^7$  conídios de *Aspergillus* spp. foi inoculada em 30 mL de meio de cultura líquido dextrose extrato de levedura (YG) e incubada a  $37^\circ\text{C}$  a 180 rpm (Shaker Ecotron – Infors HT - Switzerland) *overnight* para a produção do micélio, que foi coletado por filtração a vácuo, em funil de porcelana, congelado em nitrogênio líquido e triturado com auxílio de almofariz e pistilo esterilizados. Para cada 40 mg de micélio triturado foi acrescentado 500  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (Tris – HCl pH 8,5 200 mM, cloreto de sódio 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%). Em seguida, foi adicionado volume igual de fenol (Sigma Aldrich) e clorofórmio (JT Baker) 1:1 (v/v) e a mistura foi homogeneizada por cerca de 10 minutos em agitador de tubos (Vortex Mixer – Labnet Internacional) para precipitar as proteínas e quebrar as membranas e paredes celulares. Para sedimentar as proteínas precipitadas e resíduos celulares, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a  $12000\times g$  (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 12000×g por 5 minutos, e a fase aquosa superior foi transferida novamente para um novo microtubo de 1,5 mL onde foi acrescentado 0,54 volumes de isopropanol (JT Barker, EUA) e foi levemente agitado para a precipitação do DNA. Após centrifugação a 12000×g por 1 minuto, o sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 12000×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.

### **3.3.2. Qualificação e Quantificação do DNA**

A concentração e a pureza do DNA genômico foram avaliadas por espectrofotômetro (Implen - Alemanha) no comprimento de onda de 260 e 280 nm. A qualidade foi observada em eletroforese de gel de agarose a 1%. A concentração de cada amostra foi ajustada para 500 ng/μL.

### **3.3.3. Amplificação por PCR da região ITS do rDNA, e dos genes que codificam a β-tubulina e calmodulina e sequenciamento**

Os isolados clínicos do gênero *Aspergillus* foram identificados pela amplificação por PCR e sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal com os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990). Além disso, os genes codificadores da β-tubulina (*benA*) com os primers benA1 (5'-AATAGGTGCCGCTTTCTGG-3') e benA2 (5'-AGTTGTCTGGGACGGAAGAG-3') e da calmodulina (*caM*) com os primers cmd5 (5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3') e cmd6 (5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3') (SAMSON *et al.*, 2014). A PCR foi realizada com a enzima GoTaq polimerase (Promega). Os fragmentos de DNA 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 pelo método de Sanger no aparelho ABI3100 Fluorescence Automated Sequencer (Applied Biosystems) utilizando os

mesmos primers. Cada sequência gerada foi analisada no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd) e comparada com sequências depositadas no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

### 3.4. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

A susceptibilidade dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Os antifúngicos testados foram diluídos em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 pH 7,0 tamponado com MOPS (Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico) 2× concentrado nas concentrações de 0,125 a 64 µL/mL e foram pipetados 100 µL de cada concentração em placas para cultura de células de 96 poços de fundo chato. Posteriormente, foram pipetados 100 µL de conídios na concentração de  $5 \times 10^5$  conídios/mL em cada poço. As concentrações finais foram de  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL e nas diluições 0,0625 a 32 µL/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e foi realizada a leitura visual dos poços. Os antifúngicos testados foram os pertencentes à classe dos poliênicos (Anfotericina B) e azóis (Voriconazol, Posaconazol e Itraconazol). A linhagem controle *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) foi utilizada para validação do experimento de susceptibilidade. Os resultados foram expressos e analisados quanto a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o crescimento do fungo. As CIMs dos antifúngicos foram avaliadas quanto ao Ponto de Corte Epidemiológico (*Epidemiological Cutoff Value* - ECV). Para *A. fumigatus sensu stricto* e *A. flavus*, os valores de ECV da Anfotericina B (AMB) são 2 e 4 µg/mL, Itraconazol (ITR) 1 e 1 µg/mL, Voriconazol (VOR) o ECV é 1 e 2 µg/mL respectivamente. Para Posaconazol (POS) o ECV para *A. flavus* é de 0,5 µg/mL (protocolo M59 - CLSI, 2018) e para *A. fumigatus sensu stricto* é de 0,25 µg/mL (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2018). Os ECVs capturam  $\geq 97,5\%$  da população modelada estatisticamente. Os isolados clínicos com  $CIM \leq ECV$  foram considerados como do tipo selvagem, enquanto os isolados com  $CIM > ECV$  como do tipo não selvagem, isto é, possível linhagem resistente ao antifúngico (CLSI, 2018). Os resultados foram considerados válidos somente quando a linhagem controle *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) apresentou valores de CIM de acordo com o que é padronizado pelo protocolo M38A e M38A2 – CLSI (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 CIM’s encontradas utilizando a

extração da raiz “n” desses números, sendo sua fórmula matemática expressa pela equação: “ $MG = \sqrt{(n1 \times n2 \times n3)}$ ”, onde “n” representa os valores das CIM’s encontradas.

Além da MG, foi calculada por seção do gênero *Aspergillus* 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 população. Foram realizadas 2 réplicas biológicas e em duplicata.

### 3.5. ESTUDO DO GENE *cyp51A* E REGIÃO PROMOTORA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *A. fumigatus sensu stricto*

A região promotora e o gene *cyp51A* dos isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* foram investigados. Para isso, foi realizada a amplificação por PCR do gene *cyp51A* utilizando a enzima TransStart FastPfu DNA Polymerase (TransGen Biotech – Beijing, China) na concentração de 0,05 U/ $\mu$ L; os reagentes dNTP’s (0,2 mM); e os primers PA-7 (0,2  $\mu$ M) e P450-A2 (0,2  $\mu$ M) (tabela 1). Posteriormente, os produtos da amplificação purificados foram enviados para sequenciamento utilizando os primers da reação de PCR e adicionalmente com os primers PA-5, Cyp51 AR2 e Cyp51 AR3 (tabela 1). As sequências foram tratadas pelo programa Chromas Pro <sup>®</sup> (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e analisadas pelo método de alinhamentos múltiplos utilizando o MegaX<sup>®</sup> (KUMAR et al., 2018). As sequencias foram comparadas com a sequência de uma cepa selvagem de *A. fumigatus* (GenBank nº de acesso [AF338659.1](#)) (MELLADO *et al.*, 2001) para a identificação de mutações.

**Tabela 1** – Primers utilizados na amplificação por PCR e sequenciamento do gene *Cyp51A* de *A. fumigatus sensu stricto*.

<i>Primer</i>	<i>Sentido</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>	<i>Referência</i>
PA-7	Forward	TCA TAT GTT GCT CAG CGG	Mellado et al., 2001
P450-A2	Reverse	CTG TCT CAC TTG GAT GTG	Diaz Guerra et al., 2003
PA-5	Reverse	TCT CTG CAC GCA AAG AAG AAC	Mellado et al., 2001
CYP51 AR2	Reverse	AGT GAA TAG AGG AGT GAA TCC	Prigitano et al., 2014
CYP51 AR3	Reverse	CCA TTG CCG CAG AGA TGT C	Prigitano et al., 2014

### 3.6. CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE VIRULÊNCIA *in vitro* E VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS CLÍNICOS EM MODELO ANIMAL ALTERNATIVO *G. mellonella*

O fator de virulência de cada isolado clínico foi analisado quanto a termotolerância e biofilme. A virulência foi avaliada utilizando o modelo animal alternativo *Galleria mellonella*.

#### 3.6.1. Análise Fisiológica e Termotolerância



A concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL em um volume de 2  $\mu$ L dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foi inoculada em 3 pontos de uma placa de Petri com os meios de cultura YAG e ágar extrato de malte (MEA) e incubadas no escuro nas temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C por 48 horas (SAMSON et al., 2014). As colônias foram registradas em imagens fotográficas e foram consideradas linhagens termotolerantes aquelas que foram capazes de desenvolver colônia em 45°C.

### 3.6.2. Biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado com modificações nos protocolos descritos por Li *et al.* (2012) e Seidler *et al.* (2008). Em uma placa de 96 poços de fundo chato foi adicionado 200  $\mu$ L de meio de cultura RPMI 1640 pH 7,0 contendo a concentração de  $0,5 \times 10^6$  conídios dos isolados clínicos e incubados a 37°C por 48 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado três vezes com 200  $\mu$ L de tampão PBS 1X autoclavado para remoção das células não aderidas à parede de cada poço. Os conídios germinados aderidos foram fixados com 150  $\mu$ L de metanol 100% durante 15 minutos, seguido de sua remoção. Em seguida, seguiu-se o protocolo para a quantificação de biomassa e matriz de biofilme.

#### 3.6.2.1. Quantificação da Biomassa do biofilme

A quantificação da biomassa do biofilme foi realizada de acordo com Li *et al.* (2012), com modificações. Brevemente, foi adicionado em cada poço 100  $\mu$ L de 0,5% do corante Cristal Violeta (Sigma) e incubado por 20 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. As células aderidas na parede de cada poço foram descoradas incubando cada poço da placa com 200  $\mu$ L de ácido acético 33% por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi transferido de cada poço 100  $\mu$ L do sobrenadante para uma nova placa de 96 poços e a absorbância de cada poço foi lida no comprimento de onda de 570 nm em leitor de placas (680XR – BioRad). Foram realizadas 2 réplicas biológicas e em duplicata.

#### 3.6.2.2. Quantificação da Matriz do Biofilme

A quantificação da matriz do biofilme foi realizada de acordo com Seidler *et al.* (2008), com modificações. Brevemente, foi adicionado em cada poço 100  $\mu$ L do corante Safranina 1% (Sigma) e incubado 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. As células aderidas na parede de cada poço foram descoradas incubando cada poço da placa com 200  $\mu$ L de ácido

acético 33% por 10 minutos à temperatura ambiente. Foi transferido de cada poço 100 µL do sobrenadante para uma nova placa de 96 poços e a absorbância de cada poço foi lida no comprimento de onda de 492 nm em leitor de placas (680XR – BioRad). Foram realizadas 2 réplicas biológicas e em duplicata.

Os resultados de absorbância obtidos foram utilizados para confecção de um gráfico de correlação (matriz × biomassa), utilizando o método de Pearson, no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia USA). Os dados foram analisados considerando o intervalo de confiança de 95%.

### **3.6.3. Caracterização da virulência utilizando o modelo animal alternativo**

#### ***Galleria mellonella***

Para caracterizar o perfil de virulência dos isolados clínicos, foi adotado o protocolo segundo Renwick (2006) onde foram utilizadas larvas da espécie *Galleria mellonella*. As larvas foram mantidas a 28°C no escuro, em recipiente de vidro (30 cm altura – 20 cm largura) com capacidade de 2 L. As larvas tiveram acesso à ração até alcançarem o sexto ínstar de desenvolvimento, cujo peso está entre 200 mg e 250 mg. Após atingir o ínstar de desenvolvimento desejado, as larvas foram privadas da alimentação e separadas em grupos de 10 unidades em placa de Petri de vidro para cada isolado testado e o controle PBS. Os isolados testados foram selecionados a partir dos resultados obtidos pelo teste de formação de biofilme, onde foram selecionados isolados com alta, média e baixa produção de biofilme (Figura 6). A infecção artificial em larvas de *G. mellonella* foi realizada utilizando microseringa de Hamilton de 10 µL (modelo 7000.5KH). Em cada larva foi inoculado, no centro da ventosa da última pró-pata direita, 5 µL de uma suspensão de conídios nas concentrações de  $1 \times 10^6$  conídios/mL para *A. fumigatus* e  $1 \times 10^5$  conídios/mL para *A. flavus*, sendo o mesmo realizado no controle (apenas PBS1X). Também foi utilizado como controle negativo um grupo de larvas *naïve* (sem inóculo). Após a infecção, as larvas foram incubadas a 37°C, privadas de ração e sem iluminação direta. Durante todo o período experimental, a cada 24 horas as larvas foram retiradas da pré-pupa a fim de retardar sua metamorfose e para realizar o levantamento da quantidade de mortes no período. O experimento foi realizado com três réplicas biológicas e o resultado mais significativo foi expresso em gráfico. A confecção dos gráficos e análises estatísticas por meio do método Log-rank (Mantel-Cox) foram realizadas no software GraphPad Prisma®.

### **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. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Este projeto foi um estudo por amostragem retrospectiva por conveniência de 51 isolados clínicos oriundos de 26 pacientes (17 homens e 9 mulheres) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo no período de 2017 a 2019. Os isolados clínicos foram identificados pelo método clássico como espécies do gênero *Aspergillus* (Tabela 2 e Anexo 2).

**Tabela 2** - Isolados Clínicos de *Aspergillus* spp. oriundos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP no período de 2017 a 2019.

Paciente	Gênero do Paciente	Isolado Clínico	Data da Coleta	Sítio/Amostra de Isolamento
1	Masculino	LMC8001.01	20/07/2018	Escarro
		LMC8001.03	14/09/2018	Escarro
		LMC8001.04	14/09/2018	Escarro
		LMC8001.05	14/09/2018	Escarro
		LMC8001.06	14/09/2018	Escarro
		LMC8001.07	14/09/2018	Escarro
		LMC8001.10	14/08/2018	Escarro
		LMC8001.11	30/11/2018	Escarro
		LMC8001.12	30/11/2018	Escarro
		LMC9025.01	30/05/2019	Escarro

<b>Paciente</b>	<b>Gênero do Paciente</b>	<b>Isolado Clínico</b>	<b>Data da Coleta</b>	<b>Sítio/Amostra de Isolamento</b>
2	Masculino	LMC8003.01	18/05/2018	Escarro
		LMC8003.02	18/05/2018	Escarro
		LMC8003.03	18/05/2018	Escarro
		LMC8003.04	18/05/2018	Escarro
		LMC8003.05	18/05/2018	Escarro
		LMC8003.06	21/05/2018	Escarro
		LMC8003.07	21/05/2018	Escarro
		LMC8003.08	21/05/2018	Escarro
		LMC9026.01	21/05/2018	Escarro
		LMC8003.11	31/08/2018	Escarro
		LMC8003.12	31/08/2018	Escarro
		LMC8003.13	14/09/2018	Escarro
		LMC8003.14	26/10/2018	Escarro
		LMC8003.15	26/10/2018	Escarro
		3	Masculino	LMC9001.01
4	Feminino	LMC9002.01	05/06/2017	Mucosa oral
5	Masculino	LMC9003.01	06/11/2017	LBA
6	Masculino	LMC9004.01	20/11/2017	Mucosa nasal
7	Masculino	LMC9005.01	13/12/2017	Mucosa nasal
8	Masculino	LMC9006.01	15/12/2017	Abscesso nasal
9	Masculino	LMC9007.01	11/01/2018	Escarro
		LMC9007.02	11/01/2018	Escarro
10	Feminino	LMC9008.01	14/06/2018	Seio esfenoidal
11	Masculino	LMC9009.01	28/06/2018	Escarro
12	Feminino	LMC9010.01	28/06/2018	Fragmento mucosa nasal
13	Feminino	LMC9011.01	17/07/2018	Mucosa oral
		LMC9011.02	17/07/2018	Esôfago
14	Masculino	LMC9012.01	03/10/2018	Ouvido direito
15	Masculino	LMC9013.01	30/10/2018	Seio esfenoidal

Paciente	Gênero do Paciente	Isolado Clínico	Data da Coleta	Sítio/Amostra de Isolamento
16	Feminino	LMC9014.01	16/11/2018	Escarro
17	Masculino	LMC9015.01	12/11/2018	Escarro
18	Masculino	LMC9016.01	17/12/2018	Secreção traqueal
19	Feminino	LMC9017.01	20/12/2018	Ferida cirúrgica
20	Masculino	LMC9018.01	12/12/2018	LBA
21	Feminino	LMC9019.01	08/01/2019	Secreção traqueal
22	Masculino	LMC9020.01	11/01/2019	Seio esfenoidal
23	Feminino	LMC9021.01	05/02/2019	Escarro
		LMC9021.02	15/02/2019	Escarro
24	Feminino	LMC9022.01	11/02/2019	Escarro
25	Masculino	LMC9023.01	19/02/2019	Escarro
26	Masculino	LMC9024.01	06/05/2019	Escarro

Id, identificação; Fonte: Autoria própria

De cada isolado clínico foi visualizada a macromorfologia, onde foram observadas as características gerais de cada colônia em meio de cultura YAG, como o aspecto veludoso ou pulverulento, podendo ter as cores marrom e verde, sendo o verde variado nos tons verde oliva, verde escuro e verde acinzentado (HOUBRAKEN et al., 2020) (Anexo 3). O diâmetro das colônias de cada isolado no quarto dia de desenvolvimento à 35°C mediram 6,9 cm  $\pm$  0,75 para *Aspergillus* seção *Fumigati* e 5,35 cm  $\pm$  0,56 (Figura 3A, B e C) para *Aspergillus* seção *Flavi* (Figura 3D).

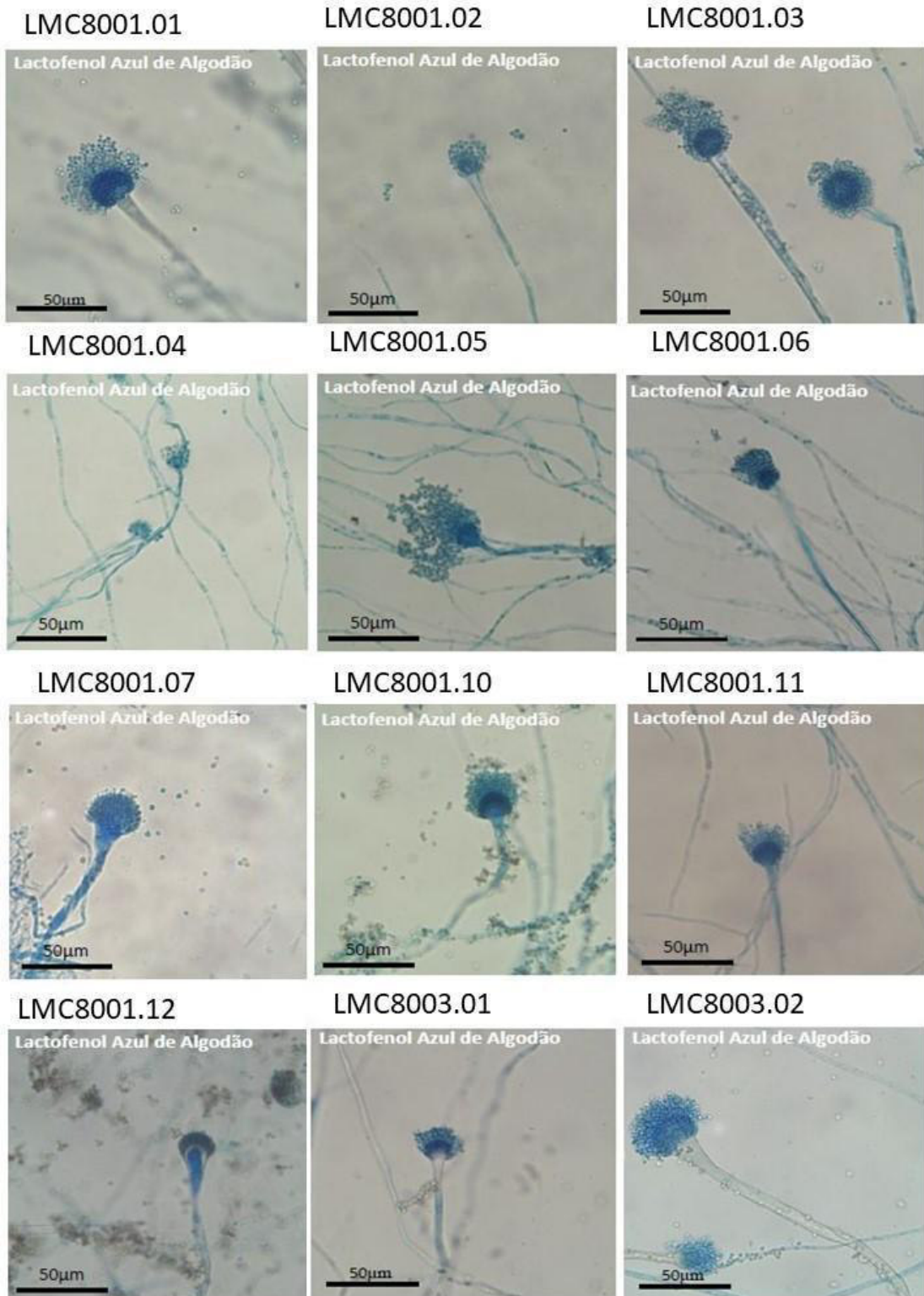
Todos os isolados clínicos apresentaram conidióforos com vesícula, fiálide e cadeia de conídios, micromorfologia característica do gênero *Aspergillus* (figura 4 e Anexo 3). Os conídios apresentam tamanhos que variam entre 2,24 a 6,49  $\mu$ m (Tabela 3), sendo os isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati* e seção *Flavi* com 2,8  $\mu$ m  $\pm$  0,4 e 4,4  $\mu$ m  $\pm$  0,9, respectivamente (Anexo 2).

**Figura 3** - Diâmetro (em centímetros) das colônias dos isolados clínicos do gênero *Aspergillus*. Os conídios foram inoculados em meio de cultura YAG e incubados a 35°C por 4 dias. **A, B e C**: isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati*; **D**: isolados clínicos *Aspergillus* seção *Flavi*. Fonte: autoria própria.

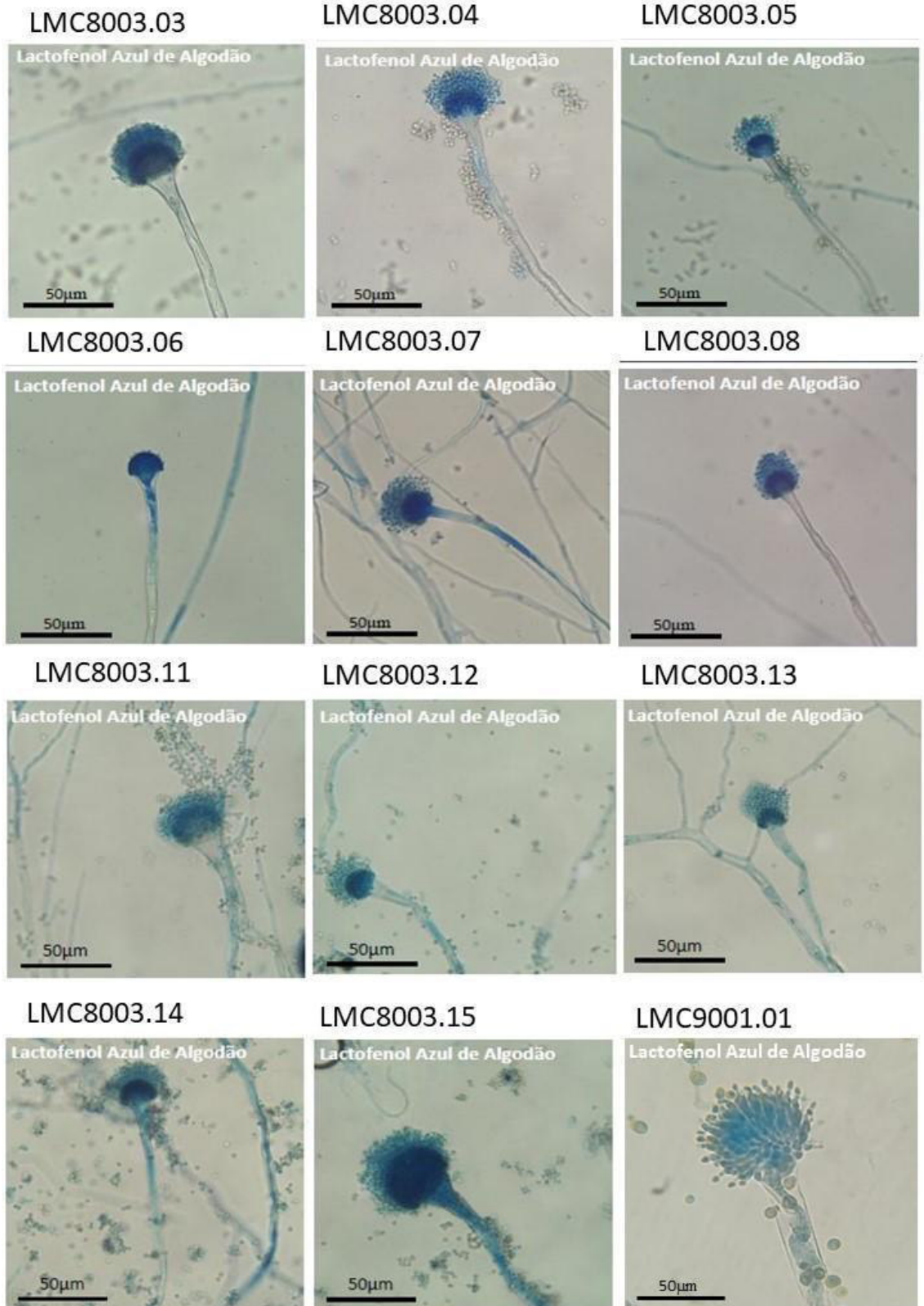


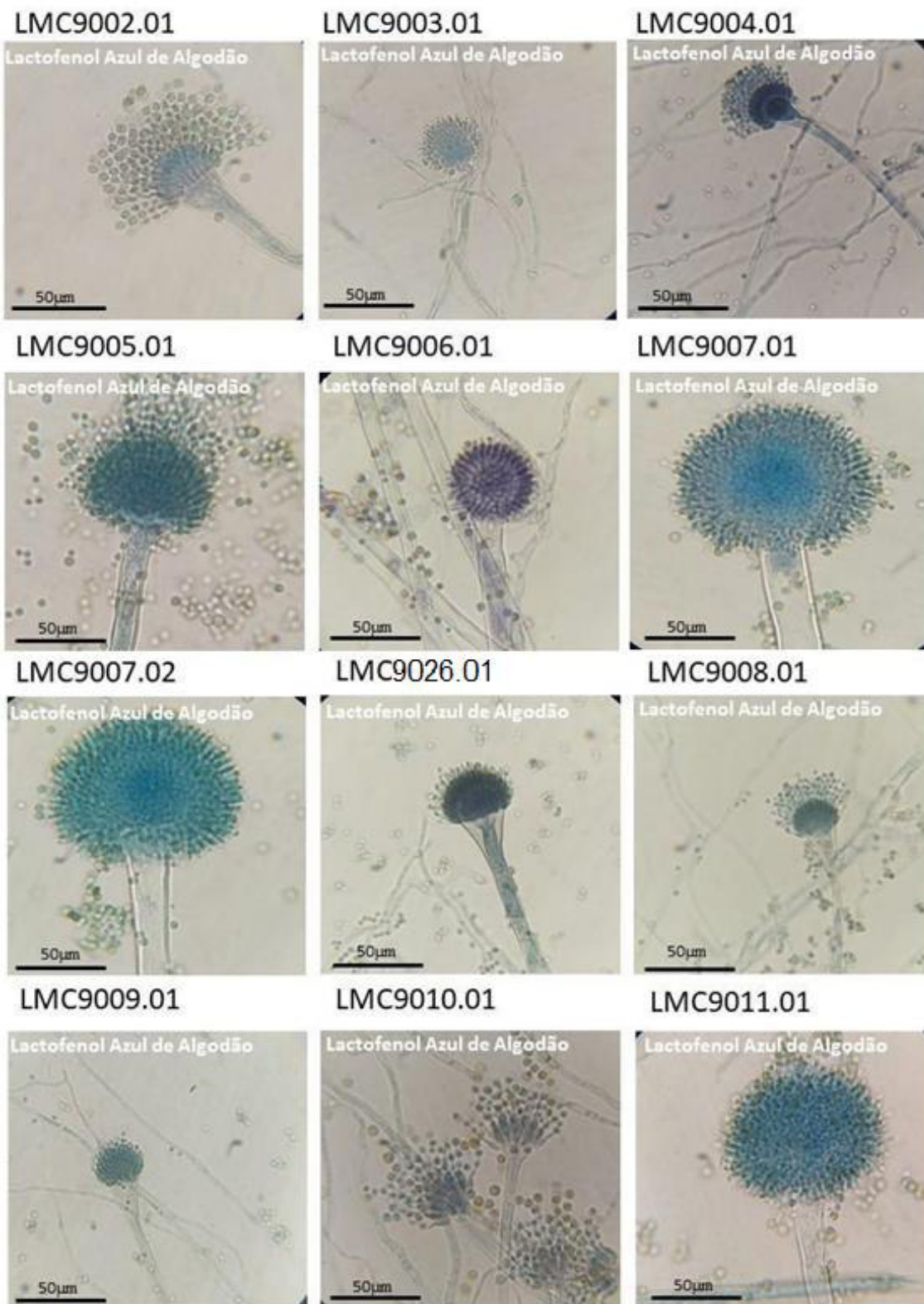


**Figura 4** - Conidióforos (vesícula, metula, fiáldes e cadeias de conídios) dos isolados clínicos do gênero *Aspergillus* em meio de cultura YAG a 35°C por 24 horas. Microscopia de campo claro com Lactofenol azul de algodão. Objetiva de 40 X. Barra de escalas: 50 µm. Fonte: autoria própria.









LMC9011.02



LMC9012.01



LMC9013.01



LMC9014.01



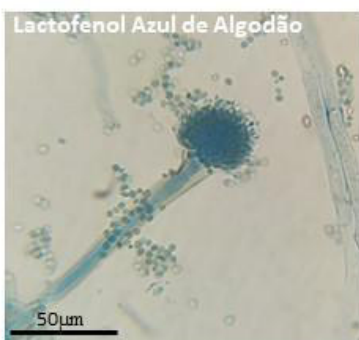
LMC9015.01



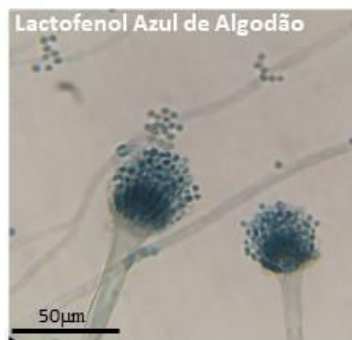
LMC9016.01



LMC9017.01



LMC9018.01



LMC9019.01



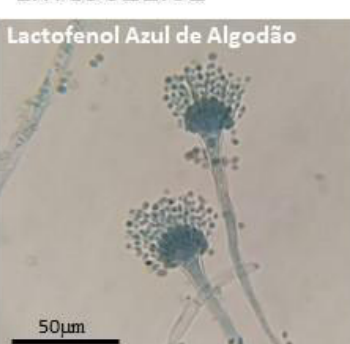
LMC9020.01

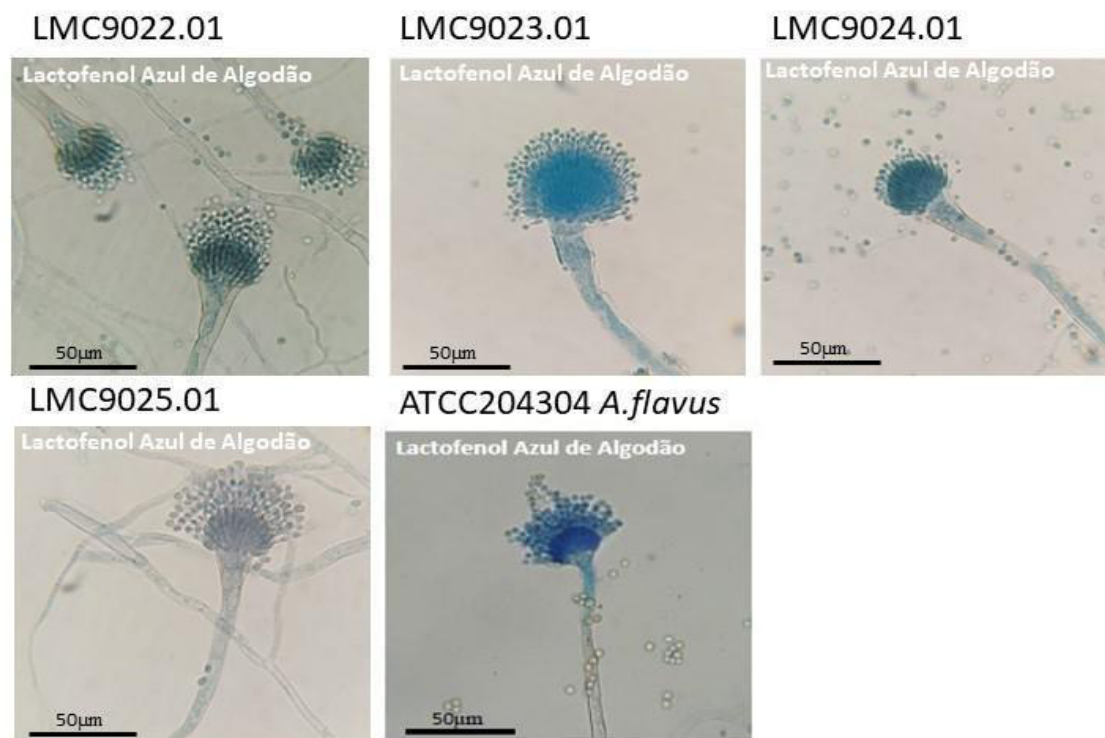


LMC9021.01



LMC9021.02





**Tabela 3** - Diâmetro (µm) dos conídios dos isolados clínicos. DP, desvio padrão.

Isolado Clínico	Diâmetro (µm)	DP	Isolado Clínico	Diâmetro (µm)	DP
LMC8001.01	2,74	± 0,36	LMC9005.01	3,65	± 0,34
LMC8001.03	3,81	± 0,39	LMC9006.01	3,67	± 0,26
LMC8001.04	3,13	± 0,40	LMC9007.01	3,85	± 0,31
LMC8001.05	3,68	± 0,27	LMC9007.02	3,85	± 0,36
LMC8001.06	3,21	± 0,35	LMC9008.01	2,44	± 0,24
LMC8001.07	3,16	± 0,39	LMC9009.01	3,01	± 0,31
LMC8001.10	3,59	± 0,32	LMC9010.01	4,46	± 0,32
LMC8001.11	2,70	± 0,66	LMC9011.01	4,35	± 0,32
LMC8001.12	3,48	± 0,35	LMC9011.02	3,92	± 0,20
LMC8003.01	2,76	± 0,19	LMC9012.01	4,15	± 0,24
LMC8003.02	2,24	± 0,25	LMC9013.01	3,54	± 0,36
LMC8003.03	2,43	± 0,26	LMC9014.01	3,23	± 0,24
LMC8003.04	2,44	± 0,25	LMC9015.01	2,81	± 0,22

Isolado Clínico	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	DP	Isolado Clínico	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	DP
LMC8003.05	2,50	$\pm 0,21$	LMC9016.01	2,97	$\pm 0,30$
LMC8003.06	3,21	$\pm 0,33$	LMC9017.01	2,95	$\pm 0,20$
LMC8003.07	2,57	$\pm 0,21$	LMC9018.01	2,39	$\pm 0,22$
LMC8003.08	2,44	$\pm 0,24$	LMC9019.01	2,39	$\pm 0,16$
LMC8003.11	2,44	$\pm 0,25$	LMC9020.01	2,52	$\pm 0,18$
LMC8003.12	2,55	$\pm 0,23$	LMC9021.01	2,34	$\pm 0,21$
LMC8003.13	2,52	$\pm 0,24$	LMC9021.02	2,82	$\pm 0,18$
LMC8003.14	2,62	$\pm 0,29$	LMC9022.01	2,74	$\pm 0,32$
LMC8003.15	2,49	$\pm 0,27$	LMC9023.01	2,69	$\pm 0,21$
LMC9001.01	5,81	$\pm 0,40$	LMC9024.01	2,29	$\pm 0,27$
LMC9002.01	6,49	$\pm 0,46$	LMC9025.01	2,79	$\pm 0,24$
LMC9003.01	3,22	$\pm 0,30$	ATCC204304 <i>A. flavus</i>	3,96	$\pm 0,41$
LMC9004.01	3,09	$\pm 0,21$	ATCC46645 <i>A. fumigatus</i>	2,44	$\pm 0,36$
LMC9026.01	3,48	$\pm 0,33$			

DP, desvio padrão. Fonte: autoria própria.

#### 4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR – ITS, $\beta$ -TUBULINA E CALMODULINA

A identificação molecular pelo sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal mostrou que 41 isolados clínicos são *Aspergillus* seção *Fumigati* e 10 são *Aspergillus* seção *Flavi* (Tabela 4 e Anexo 1). Foi também realizada a identificação molecular através do sequenciamento dos genes que codificam a  $\beta$ -tubulina para os isolados clínicos de *Aspergillus* seção *Fumigati* e *Flavi*; e a calmodulina para os isolados de *Aspergillus* seção *Fumigati*. Como resultado para os isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati*, foi verificado que todos apresentaram identidade acima de 99,5% com a sequência referência EF669791.1 (*benA*) de *A. fumigatus sensu stricto* (SAMSON et al., 2014). Para a calmodulina todos os isolados apresentaram identidade acima de 99,2% com a sequência de referência EF669860.1 (*caM*) de *A. fumigatus sensu stricto* (SAMSON et al., 2014). Para os isolados clínicos *Aspergillus* seção *Flavi* todos apresentaram mais de 99% de identidade com a sequência de referência EF661485.1 (*BenA*) de *A. flavus* (SAMSON et al., 2014) (Tabela 5 e Anexo 1). Assim, neste estudo foram identificados 41 isolados clínicos da espécie *A. fumigatus sensu stricto* e 10 *A. flavus* das respectivas seções *Fumigati* e *Flavi*, respectivamente.

**Tabela 4** – Identificação molecular dos isolados clínicos do gênero *Aspergillus* pelo sequenciamento da região ITS do rDNA.

<b>Isolado clínico</b>	<b>Identificação Seção</b>	<b>Referência GenBank</b>	<b>Identid. (%)</b>	<b>E-value</b>	<b>Max. Score</b>
LMC8001.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	976
LMC8001.03	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	994
LMC8001.04	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1027
LMC8001.05	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1000
LMC8001.06	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	933
LMC8001.07	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	994
LMC8001.10	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	990
LMC8001.11	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1003
LMC8001.12	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	992
LMC9025.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	1005
LMC8003.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007
LMC8003.02	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007
LMC8003.03	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007
LMC8003.04	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007
LMC8003.05	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007
LMC8003.06	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007
LMC8003.07	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007
LMC8003.08	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	861
LMC9026.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1014
LMC8003.11	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	861
LMC8003.12	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	994
LMC8003.13	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	992
LMC8003.14	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	990
LMC8003.15	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	987
LMC9001.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1033
LMC9002.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1026
LMC9003.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1018

Isolado clínico	Identificação Seção	Referência GenBank	Identid. (%)	E-value	Max. Score
LMC9004.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1018
LMC9005.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1024
LMC9006.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	99.1	0.0	970
LMC9007.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1003
LMC9007.02	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1007
LMC9008.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1011
LMC9009.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99,8	0.0	987
LMC9010.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	98,1	0.0	950
LMC9011.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	99,8	0.0	1000
LMC9011.02	<i>Flavi</i>	AF027863.1	99,8	0.0	1007
LMC9012.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1005
LMC9013.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1000
LMC9014.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.8	0.0	1011
LMC9015.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.8	0.0	1009
LMC9016.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1013
LMC9017.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	998
LMC9018.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	1000
LMC9019.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	1000
LMC9020.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1018
LMC9021.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	972
LMC9021.02	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1014
LMC9022.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	1005
LMC9023.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	1005
LMC9024.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1013

Identid., identidade; Fonte: Autoria própria.

**Tabela 5** – Identificação molecular dos isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati* e seção *Flavi* pelo sequenciamento dos genes que codificam a  $\beta$ -tubulina (*benA*) e calmodulina (*caM*).

Isolado Clínico	<i>benA</i>					<i>caM</i>				
	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E- value	Max. Score	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E- value	Max. Score
LMC8001.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,81	0.0	946
LMC8001.03	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC8001.04	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC8001.05	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC8001.06	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC8001.07	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC8001.10	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC8001.11	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC8001.12	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,61	0.0	941
LMC9025.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,8	0.0	953
LMC8003.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	902	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	896
LMC8003.02	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.03	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.04	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.05	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.06	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	902	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,59	0.0	885
LMC8003.07	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.08	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	902	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891



Isolado Clínico	<i>benA</i>					<i>caM</i>				
	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E- value	Max. Score	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E- value	Max. Score
LMC9026.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	841	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	968
LMC8003.11	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.12	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.13	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.14	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC8003.15	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,79	0.0	891
LMC9001.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.1	0.0	845	-	-	-	-	-
LMC9002.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.4	0.0	900	-	-	-	-	-
LMC9003.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	977
LMC9004.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	872	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,8	0.0	974
LMC9005.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9006.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9007.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.8	0.0	911	-	-	-	-	-
LMC9007.02	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9008.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	872	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,4	0.0	959
LMC9009.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,1	0.0	870
LMC9010.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9011.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	881	-	-	-	-	-

Isolado Clínico	<i>benA</i>					<i>caM</i>				
	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E- value	Max. Score	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E- value	Max. Score
LMC9011.02	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.8	0.0	911	-	-	-	-	-
LMC9012.01	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.1	0.0	845	-	-	-	-	-
LMC9013.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,6	0.0	968
LMC9014.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	880	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,6	0.0	924
LMC9015.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	966
LMC9016.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	887	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	830
LMC9017.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	872	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,2	0.0	902
LMC9018.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	966
LMC9019.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	911	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,8	0.0	980
LMC9020.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	944	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,8	0.0	900
LMC9021.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	883	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,6	0.0	1029
LMC9021.02	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.5	0.0	857	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,4	0.0	1046
LMC9022.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	907	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	822
LMC9023.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	905	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99,8	0.0	963
LMC9024.01	EF669791.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	99.8	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	100	0.0	974

Identid., identidade; s.s., *sensu stricto* -, não determinado. Fonte: Autoria própria.

### 4.3. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os isolados clínicos foram avaliados quanto à susceptibilidade aos antifúngicos Anfotericina B (AMB), Itraconazol (ITR), Voriconazol (VOR) e Posaconazol (POS). Os dados foram interpretados quanto à concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração que inibe o crescimento do fungo. Os resultados foram divididos por seção onde os 41 isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* pertencentes à *Aspergillus* seção *Fumigati*, apresentaram a média geométrica (MG) de 2; 0,5724; 0,5534 e 0,3220 µg/mL para AMB, ITR, VOR e POS, respectivamente; e os 10 isolados clínicos *A. flavus* pertencentes à *Aspergillus* seção *Flavi*, apresentaram a MG de 1,8661; 0,2679; 0,3078 e 0,4353 µg/mL para AMB, ITR, VOR e POS, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Fumigati*, os valores da CIM 50 foram de 2; 0,5; 0,5 e 0,25 µg/mL e, da CIM 90 foram de 2; 1; 1 e 1 µg/mL para AMB, ITR, VOR e POS, respectivamente. Para *Aspergillus* seção *Flavi*, os valores da CIM 50 foram de 2; 0,25; 0,25 e 0,5 µg/mL e, da CIM 90 foram 2; 0,5; 0,5 e 0,5 µg/mL para AMB, ITR, VOR e POS, respectivamente (tabela 7). As CIMs dos antifúngicos foram avaliadas quanto ao ECV (CLSI, 2018; ESPINEL-INGROFF et al., 2018). Para os isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto*, a AMB apresentou CIM igual ao ECV (2 µg/mL) para 80,4% (n=33/41) dos isolados clínicos e, para 7,3% (n=3/41) dos isolados clínicos, a CIM maior que o ECV (4 e >16 µg/mL). O ITR apresentou CIM maior que o ECV para o isolado clínico LMC9003.01 (2,4%; n=1/41); VOR para os isolados clínicos LMC9015.01, LMC9018.01 e LMC9020.01 (7,3%; n=3/41); e POS, para os isolados clínicos LMC8003.02, LMC8003.03, LMC8003.04, LMC8003.07, LMC8003.08, LMC8003.12, LMC8003.13, LMC8003.14, LMC8003.15, LMC9003.01, LMC9004.01, LMC9026.01, LMC9008.01, LMC9009.01, LMC9015.01, LMC9016.01, LMC9017.01, LMC9020.01, LMC9023.01 e LMC9024.01 (48,8%; n=20/41) (Tabela 6). Já para os isolados clínicos de *A. flavus*, os antifúngicos AMB, ITR, POS e VOR não apresentaram CIM maior que o ECV, isto é, linhagens com perfil selvagem (Tabela 6).

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto* e *A. flavus* aos antifúngicos e mutações no gene *cyp51A* nos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto*.

Isolado Clínico	Identificação molecular	Mutações <i>cyp51A</i>						CIM (µg/mL)			
		F46Y	M172V	N248T	N248K	D255E	E427K	ITR	POS	VOR	AMB
LMC8001.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,062	0,25	4*
LMC8001.03	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	0,5	2
LMC8001.04	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	0,5	2
LMC8001.05	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	1	2
LMC8001.06	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	0,25	2
LMC8001.07	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	0,25	2
LMC8001.10	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	0,5	2
LMC8001.11	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	0,25	2
LMC8001.12 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	0,125	0,5	2
LMC9025.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	1	2
LMC8003.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5	4*
LMC8003.02 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,5	2
LMC8003.03 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,5	2
LMC8003.04 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	1*	0,5	2
LMC8003.05 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	0,125	0,5	2
LMC8003.06	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	<0,031	0,5	2
LMC8003.07 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	1*	1	2
LMC8003.08	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,25	2
LMC9026.01 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M127V	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,25	2
LMC8003.11 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5	2
LMC8003.12 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,5	2
LMC8003.13 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	1*	0,5	2
LMC8003.14 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	1*	0,5	2
LMC8003.15 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	M172V	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,5	2
LMC9001.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,5	0,5	0,25	2
LMC9002.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,5	0,5	0,25	2
LMC9003.01 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	F46Y	M172V	N248T	-	D255E	E427K	8*	>16*	0,5	>16*
LMC9004.01 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	F46Y	M172V	N248T	-	D255E	E427K	0,5	1*	0,5	2

Isolado Clínico	Identificação molecular	Mutações <i>cyp51A</i>						CIM (µg/mL)			
		F46Y	M172V	N248T	N248K	D255E	E427K	ITR	POS	VOR	AMB
LMC9005.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,5	0,25	2
LMC9006.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,5	0,5	2
LMC9007.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,5	0,25	2
LMC9007.02	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,5	0,25	2
LMC9008.01 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	F46Y	M172V	N248T	-	D255E	E427K	0,5	1*	0,5	2
LMC9009.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,5	2
LMC9010.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,25	0,5	2
LMC9011.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,5	0,5	2
LMC9011.02	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,5	0,25	2
LMC9012.01	<i>A. flavus</i>	NR						0,125	0,25	0,25	1
LMC9013.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5	1
LMC9014.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5	1
LMC9015.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	N248K	-	-	1	0,5*	2*	2
LMC9016.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	N248K	-	-	0,5	0,5*	0,5	2
LMC9017.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5*	0,5	2
LMC9018.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	1	0,25	2*	2
LMC9019.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	1	2
LMC9020.01 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	F46Y	M172V	N248T		D255E	E427K	1	0,5*	2*	2
LMC9021.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5	1
LMC9021.02	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5	1
LMC9022.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,125	1	1
LMC9023.01 <sup>§ c</sup>	<i>A. fumigatus s.s.</i>	F46Y	-	-	-	-	E427K	0,5	0,5*	0,5	2
LMC9024.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	1	0,5*	1	2
ATCC204304	<i>A. flavus</i>	NR						0,25	0,25	0,25	2
ATCC46645	<i>A. fumigatus s.s.</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	0,25	0,5	4*

\*, valores > ECV (protocolo M59, CLSI) e Espinel-Ingroff *et al.* (2018) com captura de  $\geq 97,5\%$  da população modelada estatisticamente; <sup>§</sup>, mutações silenciosas G89G, L358L e C454C; <sup>c</sup>, substituição de nucleotídeo T→C 279 pb a montante da região codificadora do gene *cyp51A*; ITR, itraconazol; POS, posaconazol; VOR, voriconazol; AMB, anfotericina B; NR, não realizado. Fonte: autoria própria.

**Tabela 7**– Susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados clínicos agrupados nas seções *Fumigati* e *Flavi*.

<b><i>Aspergillus</i> Seção <i>Fumigati</i> (n=41)</b>				
Antifúngico ( $\mu\text{g/mL}$ )	MG	Intervalo	CIM50	CIM90
AMB	2	1 – 16	2	2
ITR	0,5724	0,5 – 8	0,5	1
VOR	0,5534	0,25 – 2	0,5	1
POS	0,3220	0,03 – 16	0,25	1
<b><i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> (n=10)</b>				
Antifúngico ( $\mu\text{g/mL}$ )	MG	Intervalo	CIM50	CIM90
AMB	1,8661	1 – 2	2	2
ITR	0,2679	0,125 – 0,5	0,25	0,5
VOR	0,3078	0,25 – 0,5	0,25	0,5
POS	0,4353	0,25 – 0,5	0,5	0,5

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

#### 4.4. ESTUDO DO GENE *cyp51A* E REGIÃO PROMOTORA DOS ISOLADOS CLÍNICOS *A. fumigatus sensu stricto*

A modificação do sítio-alvo é um dos principais mecanismos que confere resistência aos azóis, e o alvo mais importante é a 14 $\alpha$ -esterol desmetilase que é codificada pelo gene *cyp51A* de *Aspergillus* spp. Sendo assim, a região promotora e o gene *cyp51A* dos 41 isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* foram investigados. Como resultado, foram identificadas 9 diferentes substituições de nucleotídeos no gene *cyp51A* entre os isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* (tabelas 06 e 08). O gene *cyp51A* de *A. flavus* não foi investigado. Destas substituições de nucleotídeos, três não resultaram na alteração de aminoácidos (mutações silenciosas). Estas foram nos nucleotídeos 267 (G $\rightarrow$ A), 1074 (G $\rightarrow$ A) e 1362 (C $\rightarrow$ T) que correspondem aos aminoácidos G89G, L358L e C454C (tabela 08). Estas mutações silenciosas são descritas na literatura e, embora não apresentem importância no fenótipo de resistência, são interessantes no contexto do estudo filogenético (DUDAKOVA et al., 2017).

As seis mutações encontradas que resultaram na alteração de aminoácidos na cadeia polipeptídica da proteína CYP51A são F46Y, M172V, N248T, N248K, D255E e E427K e foram encontradas em 46% (n=19/41) dos isolados clínicos. As alterações conjuntas dos aminoácidos F46Y, M172V, N248T, D255E e E427K foram encontradas em 9,8% (n=4/41) dos isolados clínicos (LMC9003.01, LMC9004.01, LMC9008.01 e LMC9020.01) (tabelas 6 e

8). Entre estes quatro isolados clínicos, todos apresentam POS com a CIM maior que o ECV. Adicionalmente, os isolados clínicos LMC9003.01 e LMC9020.01 apresentam a CIM, respectivamente, do ITR e VOR maior que o ECV (tabela 6). Outro conjunto de alteração de aminoácidos foi F46Y e D255E presente em 2,4% (n=1/41) dos isolados clínicos (LMC9023.01). Neste, o POS apresentou CIM maior que o valor do ECV. Em 29,3% (n=12/41) dos isolados clínicos (LMC8001.12, LMC8003.02, LMC8003.03, LMC8003.04, LMC8003.05, LMC8003.07, LMC9026.01, LMC8003.11, LMC8003.12, LMC8003.13, LMC8003.14, LMC8003.15) foi encontrada exclusivamente a alteração M172V. Nestes, o POS apresentou CIM maior que o ECV, com exceção dos isolados clínicos LMC8001.12, LMC8003.05 e LMC8003.11 que apresentaram perfil de linhagem selvagem para todos os antifúngicos, inclusive para o POS. Os isolados clínicos LMC9015.01 e LMC9016.01 (4,9%; n=2/41) apresentaram a única alteração de aminoácido N248K. Nestes, o POS apresentou CIM maior que o ECV para ambos isolados clínicos e VOR apresentou CIM maior que o ECV somente para o LMC9015.1 (Tabelas 6 e 8). Curiosamente, as mutações silenciosas G89G, L358L e C454C estão presentes em todos os isolados clínicos que apresentaram alterações de aminoácidos no gene *cyp51A* deste estudo, com exceção da alteração N248K (Tabelas 6 e 8). No geral, 21,7% (n=9/41) dos isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* não tiveram correlação entre a presença de alteração na CYP51A e a altas CIMs. Sendo que, 7,3% (n=3/41) apresentaram a alteração M172V na CYP51A associada ao perfil selvagem aos antifúngicos azólicos testados. Além disso, 12% (n=5/41) e 2,4% (n=1/41) apresentam perfil não selvagem para POS e VOR, respectivamente, mas não apresentam mutação no gene *cyp51A* e alterações na região promotora.

**Tabela 8** – Substituição de nucleotídeos encontradas no gene *cyp51A* dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto*.

Alteração aa	Substituição de nucleotídeos	Códon	Isolados Clínicos
F46Y	137 T → A	TTT → TAT	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9008.01 LMC9020.01 LMC9023.01
G89G*	267 G → A	GGG → GGA	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9026.01 LMC9008.01 LMC9020.01 LMC9023.01 LMC8001.12 LMC8003.02 LMC8003.03 LMC8003.04 LMC8003.05 LMC8003.07 LMC8003.11 LMC8003.12 LMC8003.13 LMC8003.14 LMC8003.15

Alteração aa	Substituição de nucleotídeos	Códon	Isolados Clínicos
M172V	514 A → G	ATG → GTG	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9008.01 LMC9020.01 LMC9026.01 LMC8001.12 LMC8003.02 LMC8003.03 LMC8003.04 LMC8003.05 LMC8003.07 LMC8003.11 LMC8003.12 LMC8003.13 LMC8003.14 LMC8003.15
N248T	743 A → C	AAT → ACT	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9008.01 LMC9020.01
N248K	744 T → A	AAT → AAA	LMC9015.01 LMC9016.01
D255E	765 C → G	GAC → GAG	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9008.01 LMC9020.01
L358L*	1074 A → G	TTA → TTG	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9026.01 LMC9008.01 LMC9020.01 LMC9023.01 LMC8001.12 LMC8003.02 LMC8003.03 LMC8003.04 LMC8003.05 LMC8003.07 LMC8003.11 LMC8003.12 LMC8003.13 LMC8003.14 LMC8003.15
E427K	1279 G → A	GAG → AAG	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9008.01 LMC9020.01 LMC9023.01
C454C*	1362 T → C	TGT → TGC	LMC9003.01 LMC9004.01 LMC9026.01 LMC9008.01 LMC9020.01 LMC9023.01 LMC8001.12 LMC8003.02 LMC8003.03 LMC8003.04 LMC8003.05 LMC8003.07 LMC8003.11 LMC8003.12 LMC8003.13 LMC8003.14 LMC8003.15

aa, aminoácido; \*, mutações silenciosas. Fonte: autoria própria

Com relação à região promotora do gene *cyp51A* de *A. fumigatus sensu stricto*, existem relatos na literatura relacionando a resistência aos azóis associada a repetições de nucleotídeos chamadas de *Tandem Repeats* (TR) que levam à superexpressão do gene *cyp51A*. Três TR já foram relatadas (TR34, TR46 e TR53) e estão localizadas na posição 279 pb a montante da região codificadora do gene *cyp51A* (DUDAKOVA et al., 2017). Na região promotora dos 41 isolados clínicos deste estudo, foram localizados os 34 nucleotídeos na posição 279 pb a montante da região codificadora do gene *cyp51A* que coincidem com padrão selvagem de linhagens de *A. fumigatus*. Portanto, não foram identificados TR entre os isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto* deste estudo. Além disso, foi verificado um polimorfismo na região promotora em que uma timina (T) foi substituída por uma citosina (C) no nucleotídeo 334 a montante da região codificadora do gene *cyp51A* (Figura 5), que não apresenta importância no fenótipo de resistência aos azóis, mas importância em estudo filogenético.

**Figura 5** – Alinhamento da região promotora do gene *cyp51A* dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto*.



```

LMC8001.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.03 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.04 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.05 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.06 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.07 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.10 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.11 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.06 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.08 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9009.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9013.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9014.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9015.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9016.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9017.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9018.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9019.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9021.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9021.02 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9022.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9024.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9025.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
ATCC46645 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8001.12 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.02 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.03 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.04 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.05 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.07 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.11 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.12 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.13 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.14 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC8003.15 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9003.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9004.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9008.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9020.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9023.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
LMC9026.01 GCAGCACCACCTTCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCGGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACT
*****

```

ATCC 46645, *A. fumigatus*; Amarelo indica a ‘região variável e/ou repetições’; Azul indica a ‘região estática’ de 34 nucleotídeos; Retângulo vermelho indica a alteração no nucleotídeo 334 a montante da região codificadora do gene *cyp51A* (baseado em DUDAKOVA et al., 2017). Fonte: Autoria própria

#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DA VIRULÊNCIA EM *Galleria mellonella*

Os fatores de virulência do gênero *Aspergillus* atuam naturalmente durante seu desenvolvimento no hospedeiro humano e consistem em características adaptativas como o tamanho dos conídios, a termotolerância e a capacidade de formar biofilme. Estudos fisiológico e de termotolerância dos 51 isolados clínicos deste estudo apresentaram desenvolvimento de colônia a 25°C nos meios de cultura MEA e YAG e a 35°C em meio de cultura YAG. Todos os isolados clínicos desenvolveram colônia nos meio de cultura MEA e YAG à 25°C, excetuando o LMC9013.01. Na temperatura de 45°C em meio de cultura YAG todos apresentaram crescimento, com exceção dos 10 isolados clínicos *A. flavus*, nos quais LMC9002.01, LMC9005.01, LMC9006.01, LMC9007.02, LMC9010.01, LMC9011.02 e

LMC9012.01 (n=6/10) não foram capazes de se desenvolver nesta temperatura e LMC9001.01, LMC9007.01, LMC9011.01 e LMC9012.01 (n=4/10) apresentaram crescimento reduzido à 45°C (Anexo 3).

A formação do biofilme foi avaliada em todos os 51 isolados clínicos deste estudo pela medição da biomassa e da matriz extracelular do biofilme formado pelo fungo. Com o intuito de entender a correlação existente entre os valores de absorbância da biomassa e da matriz do biofilme dos isolados clínicos, foi utilizado o Coeficiente de correlação de Pearson. A análise demonstrou uma correlação positiva significativa entre biomassa e matriz de biofilme para os isolados clínicos ( $P < 0,05$ ). Isto é, os resultados indicam que para a maioria dos isolados clínicos, quanto maior o valor da biomassa, maior o valor da matriz ou então, quanto menor o valor da biomassa, menor o valor da matriz do biofilme (figura 6). Foi observado que 7,8% (n=4/51) apresentaram correlações de absorbâncias próximo ou acima de 1,0, portanto, maior formador de biofilme, em relação aos demais isolados clínicos. Entre eles estão 3 isolados clínicos *A. flavus* (LMC9007.02, LMC9010.01 e LMC9011.02) e 1 *A. fumigatus sensu stricto* (LMC8003.04). Em contrapartida, entre os isolados clínicos com menor produção de biofilme estão isolados clínicos da espécie *A. fumigatus sensu stricto* (LMC8003.07 e LMC8003.12 – Figura 6).

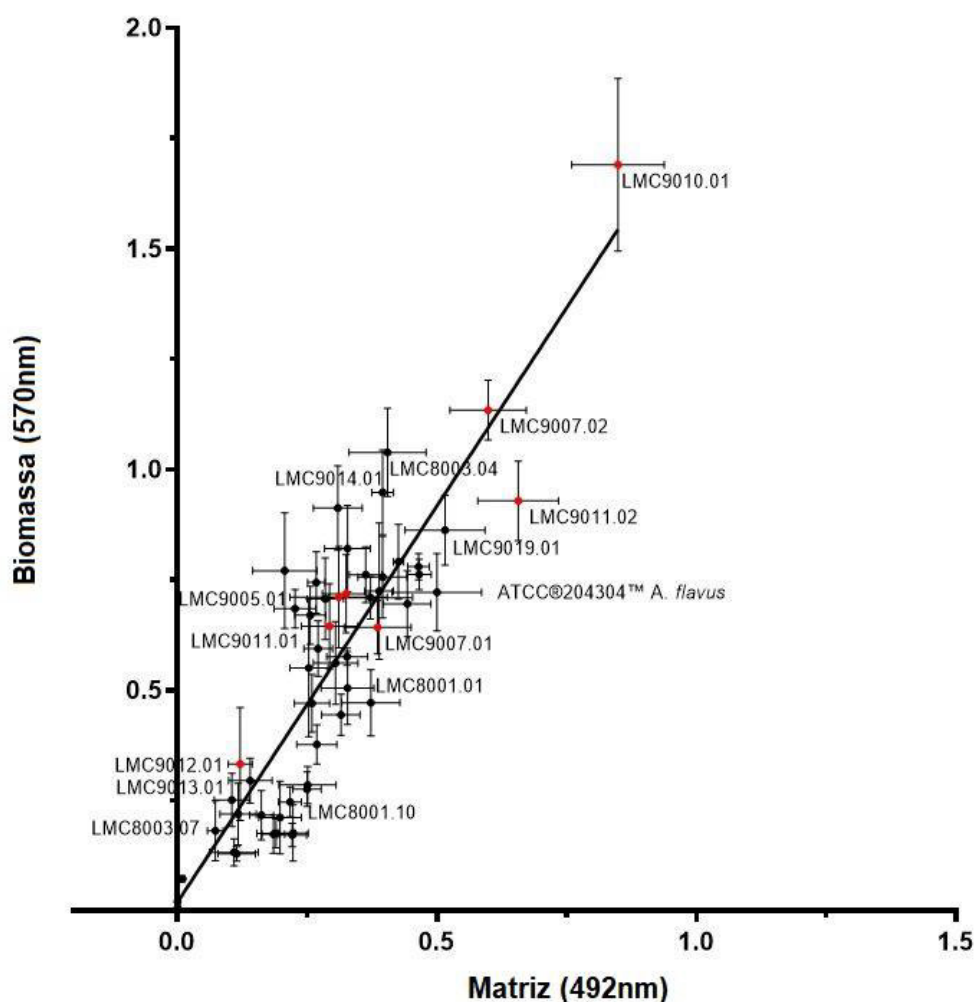
**Tabela 9** – Valores da Matriz e Biomassa do Biofilme dos isolados clínicos deste estudo.

Isolado clínico	Identificação molecular	Matriz (492 nm)		Biomassa (570 nm)	
		Média	DP	Média	DP
LMC8001.01*	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,328	0,051	0,505	0,083
LMC8001.03	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,162	0,023	0,217	0,056
LMC8001.04	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,221	0,028	0,172	0,027
LMC8001.05	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,190	0,037	0,176	0,033
LMC8001.06	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,217	0,022	0,247	0,034
LMC8001.07	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,223	0,029	0,177	0,064
LMC8001.10*	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,198	0,041	0,212	0,082
LMC8001.11	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,373	0,056	0,472	0,075
LMC8001.12	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,500	0,086	0,722	0,088
LMC9025.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,389	0,028	0,725	0,154
LMC8003.01	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,256	0,030	0,670	0,066
LMC8003.02	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,305	0,043	0,562	0,094
LMC8003.03	<i>A. fumigatus s.s.</i>	0,285	0,035	0,707	0,093

Isolado clínico	Identificação molecular	Matriz (492 nm)		Biomassa (570 nm)	
		Média	DP	Média	DP
LMC8003.04*	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,405	0,074	1,039	0,100
LMC8003.05	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,207	0,062	0,771	0,131
LMC8003.06	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,121	0,023	0,333	0,128
LMC8003.07*	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,073	0,015	0,182	0,068
LMC8003.08	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,250	0,027	0,276	0,039
LMC9026.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,227	0,040	0,685	0,044
LMC8003.11	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,000	0,005	0,007	0,007
LMC8003.12	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,109	0,047	0,133	0,031
LMC8003.13	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,114	0,036	0,130	0,016
LMC8003.14	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,185	0,022	0,174	0,043
LMC8003.15	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,117	0,035	0,220	0,070
LMC9001.01	<i>A. flavus</i>	0,443	0,046	0,696	0,075
LMC9002.01	<i>A. flavus</i>	0,309	0,047	0,913	0,096
LMC9003.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,251	0,055	0,286	0,042
LMC9004.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,315	0,037	0,445	0,046
LMC9005.01*	<i>A. flavus</i>	0,311	0,094	0,711	0,115
LMC9006.01	<i>A. flavus</i>	0,373	0,081	0,710	0,048
LMC9007.01*	<i>A. flavus</i>	0,386	0,065	0,643	0,061
LMC9007.02*	<i>A. flavus</i>	0,599	0,074	1,135	0,068
LMC9008.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,269	0,038	0,378	0,044
LMC9009.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,395	0,047	0,757	0,093
LMC9010.01*	<i>A. flavus</i>	0,849	0,089	1,690	0,195
LMC9011.01*	<i>A. flavus</i>	0,293	0,055	0,645	0,097
LMC9011.02*	<i>A. flavus</i>	0,657	0,078	0,929	0,090
LMC9012.01*	<i>A. flavus</i>	0,141	0,042	0,296	0,051
LMC9013.01*	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,105	0,034	0,252	0,060
LMC9014.01*	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,396	0,021	0,948	0,096
LMC9015.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,426	0,010	0,791	0,085
LMC9016.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,465	0,021	0,780	0,030
LMC9017.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,466	0,023	0,763	0,035
LMC9018.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,327	0,040	0,576	0,020
LMC9019.01*	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,516	0,077	0,863	0,079
LMC9020.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,259	0,034	0,471	0,065
LMC9021.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,328	0,044	0,821	0,098
LMC9021.02	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,268	0,016	0,745	0,070
LMC9022.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,363	0,032	0,762	0,063
LMC9023.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,271	0,027	0,595	0,063
LMC9024.01	<i>A. fumigatus s.s</i>	0,253	0,037	0,551	0,156
ATCC 204304	<i>A. flavus</i>	0,325	0,046	0,719	0,089

Dp, Desvio padrão; \*, isolados clínicos selecionados para ensaio de virulência em *G. mellonella*. Fonte: autoria própria.

**Figura 6** – Correlação de Pearson entre os valores de absorvância da biomassa e matriz do biofilme dos isolados clínicos. Fonte: autoria própria.



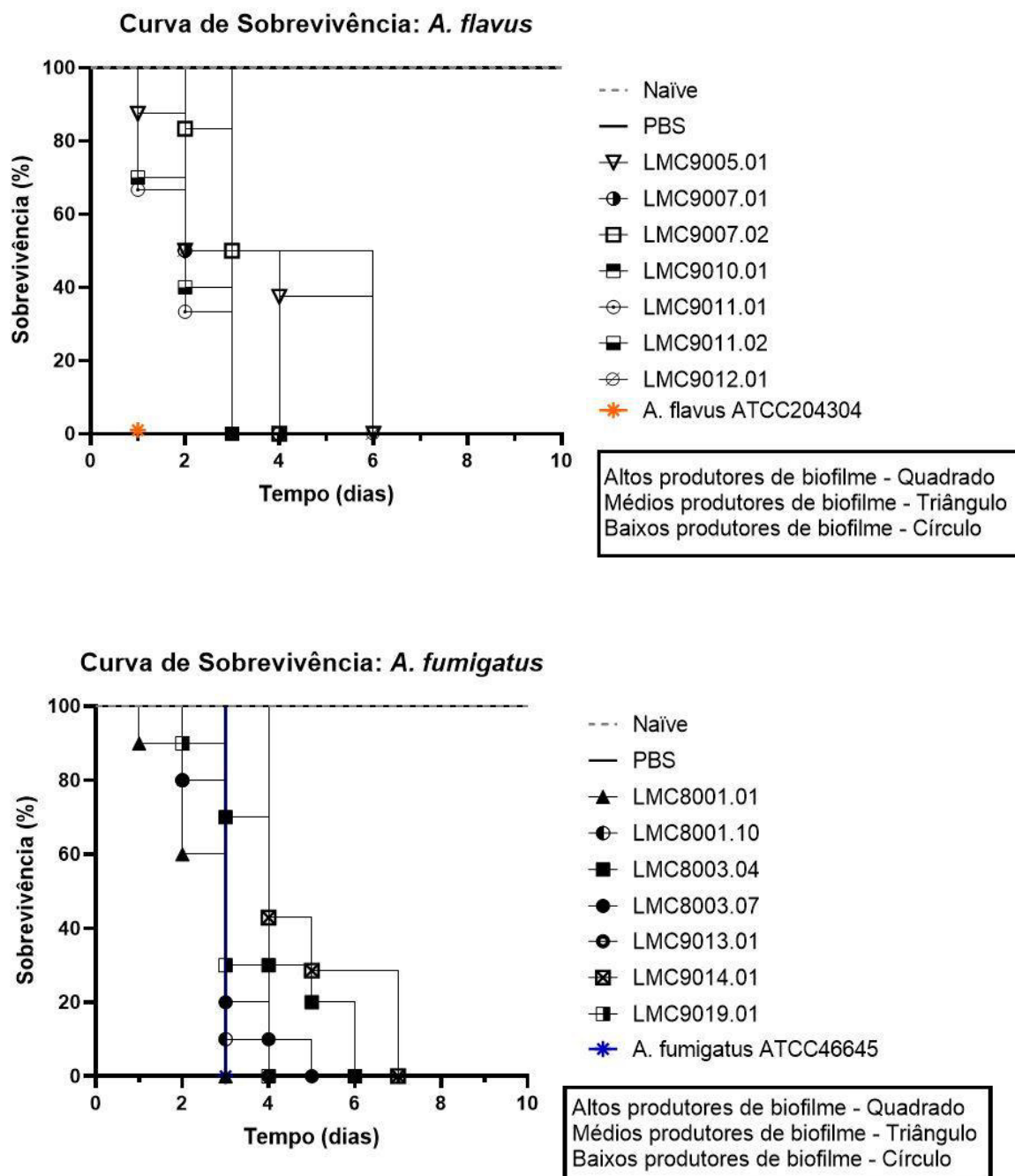
Pontos pretos, isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto*; pontos vermelhos, isolados clínicos de *A. flavus*

A partir dos resultados obtidos do ensaio de biofilme, 14 isolados clínicos foram selecionados para realizar ensaio de virulência utilizando o modelo animal alternativo *Galleria mellonella*. Entre eles estão 6 isolados clínicos altos produtores de biofilme (LMC8003.04, LMC9007.01, LMC9010.01, LMC9011.02, LMC9014.01, LMC9019.01), 2 isolados clínicos médios produtores de biofilme (LMC8001.01, LMC9005.01) e 6 isolados clínicos baixos produtores de biofilme (LMC8001.10, LMC8003.07, LMC9007.02, LMC9011.01, LMC9012.01, LMC9013.01) (Tabela 9).

Os resultados da formação de biofilme dos isolados clínicos de *A. flavus* e *A. fumigatus sensu stricto* foram analisados separadamente e duas curvas de sobrevivência foram geradas (Figura 7). Foi observado que, em ambas as análises, a maioria das mortes ocorreram anterior

ao sétimo dia pós-infecção e, que de maneira geral, houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de sobrevivência dos isolados de *A. flavus* e *A. fumigatus sensu stricto* quando analisados tanto individualmente quanto comparadas as seções ( $P < 0,0001$ ).

**Figura 7** – Sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolados clínicos *A. flavus* e *A. fumigatus sensu stricto*. Fonte: Autoria própria



## 5. DISCUSSÃO

O gênero *Aspergillus* possui distribuição universal e causa grande impacto na área da saúde, uma vez que contém diversas espécies patogênicas causadoras de infecções graves, principalmente em pacientes imunocomprometidos. As manifestações clínicas das infecções causadas pelas espécies deste gênero podem variar desde micoses superficiais até quadros alérgicos, asma e aspergilose invasiva (PÉREZ-CANTERO et al., 2019).

A classificação e identificação das espécies de *Aspergillus* é baseada em características fenotípicas, mas nas últimas décadas foi fortemente influenciada pela caracterização molecular (SAMSON et al., 2014). A identificação precisa dessas espécies se faz necessária uma vez que o quadro da infecção varia de acordo com a relação patógeno *versus* hospedeiro, com relação ao patógeno, é principalmente devido à grande diversidade de espécies e cepas dentro do gênero *Aspergillus* que apresentam diversidade de padrões de resistência aos antifúngicos comerciais, principalmente aos medicamentos do grupo dos azóis e equinocandinas (SATISH et al., 2019). Assim, este estudo teve por finalidade caracterizar a morfologia, identificar por método molecular e verificar a susceptibilidade, fatores de virulência *in vitro* e virulência em *G. mellonella* de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* oriundos de pacientes do HC da FMRP-USP entre os anos 2017 a 2019, sendo uma amostragem retrospectiva por conveniência. Foram analisados 51 isolados clínicos oriundos de diversas amostras biológicas como escarro, lavado broncoalveolar, raspado de mucosa nasal, seio esfenoidal, biópsia de boca, entre outros.

Os isolados clínicos deste estudo apresentaram a macromorfologia e o crescimento da colônia característicos do gênero *Aspergillus* (DE HOOG et al., 2015), embora estas não sejam características exclusivas das espécies pertencentes a este gênero (HOUBRAKEN et al., 2020). Foram observadas as características gerais de cada colônia, como aspecto veludoso a pulverulento, podendo ter as cores marrom e verde, tendo o verde variado nos tons verde oliva, verde escuro e verde acinzentado. Na análise da micromorfologia, foram observados conidióforos característicos deste gênero, que são eretos, não ramificados, com vesícula apical onde formam-se fiálides (unisseriadas) ou métulas e fiálides (bisseriadas). As cadeias de conídios são formadas a partir de cada fiálide, tendo a disposição colunar ou divergente (radial) (DE HOOG et al., 2015). Os conídios apresentaram os diâmetros de 2,2 a 3,8  $\mu\text{m}$  e 3,6 a 6,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente, para os isolados clínicos identificados como *Aspergillus* seção *Fumigati* e *Aspergillus* seção *Flavi*, sendo estes tamanhos característicos de cada seção (WALSH et al., 2018).

Nas últimas décadas, as ferramentas moleculares estão sendo cada vez mais utilizadas no reconhecimento filogenético de espécies fúngicas. Assim, a região do espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA, aceito como o código de barras de DNA oficial para fungos (SCHOCH et al. 2012), foi utilizado para a identificação molecular dos 51 isolados clínicos deste estudo. Entre eles, foram identificados 80% (n=41/51) como *Aspergillus* seção *Fumigati* e 20% (n=10/51) como *Aspergillus* seção *Flavi*. Entretanto, este *locus* foi insuficiente para identificar corretamente as espécies do gênero *Aspergillus* e assim, os marcadores de identificação genéticos secundários, *cam* (calmodulina) e a *benA* ( $\beta$ -tubulina), foram utilizados (SAMSON et al., 2014). O sequenciamento parcial dos genes que codificam estas duas proteínas identificou 100% (n=41/41) de *A. fumigatus sensu stricto* e 100% (n=10/10) de *A. flavus* para os isolados clínicos *Aspergillus* seção *Fumigati* e *Aspergillus* seção *Flavi*, respectivamente. Portanto, o sequenciamento da região ITS e dos genes da calmodulina e da  $\beta$ -tubulina se mostrou eficiente para a identificação molecular dos isolados clínicos de *Aspergillus* já que apresentou elevado nível de identidade, *e-value* e *score* com as sequências referência depositadas no banco de sequência de nucleotídeos *GenBank*. Assim, a identificação morfológica indicou o gênero *Aspergillus* e a identificação molecular identificou, entre os isolados clínicos deste estudo, as espécies *A. fumigatus sensu stricto* e *A. flavus*. Estas são as espécies mais frequentemente associadas às micoses superficiais, subcutâneas e invasivas causadas pelo gênero *Aspergillus* (LAMOTH, 2016; REICHERT-LIMA et al., 2017) o que justifica a maior prevalência destas na amostragem deste estudo.

As espécies de *Aspergillus* são importante causa de infecções com risco de vida em pacientes imunocomprometidos. Entretanto, a incidência clínica e principalmente a resistência aos antifúngicos é pouco conhecida. Assim, a susceptibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* de Ribeirão Preto e macrorregião foi estudada. Estes dados são de extrema relevância clínica, pois a resistência de diversas espécies aos antifúngicos comerciais disponíveis é um fator a ser levado em consideração no momento do tratamento da infecção (PATTERSON et al., 2016).

Considerando o ECV da AMB para *A. fumigatus*, 88% (n=36/41) dos isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* deste estudo apresentaram a CIM igual (2  $\mu$ g/ml) ou maior (4 e >16  $\mu$ g/ml) que este índice. Isto é, um perfil não selvagem para a AMB. Já para *A. flavus*, considerando o ECV para esta espécie, todos os isolados clínicos apresentaram perfil selvagem para este antifúngico. A AMB é um antifúngico frequentemente utilizado no tratamento de infecções fúngicas em ambiente hospitalar, além de ser o tratamento alternativo nos casos de

aspergilose resistente aos triazóis (ZAKARIA et al., 2020). Entretanto, o padrão de susceptibilidade de *Aspergillus* sp. à AMB é pouco conhecido em muitas partes do mundo (ASHU et al., 2018). O que se sabe é que a resistência à AMB tem sido frequentemente observada em *A. terreus*, com baixa frequência em *A. flavus* (BLUM et al., 2008 e GONÇALVES et al., 2013) e rara frequência em *A. fumigatus* (ASHU et al., 2018). Um recente estudo da região sul do Brasil, descreve que a CIM da AMB para isolados clínicos de *A. fumigatus* e *A. flavus* variaram de 0,5 a 1,0 mg/L e de 0,5 a 2,0 mg/L, respectivamente (DENARDI et al., 2018). Adicionalmente, um relato recente de isolados clínicos do sudeste brasileiro mostrou que 27% dos isolados de *A. fumigatus* foram resistentes a AMB (CIM >2 mg/L), o maior relatado até agora na literatura (ASHU et al., 2018; REICHERT-LIMA et al., 2017). Estes resultados corroboram com os dados obtidos em nosso estudo e sugerem que pode haver alguma especificidade geográfica em nossa região, em que altas CIMs da AMB são observadas para *A. fumigatus sensu stricto*. Portanto, se for verdade, a recomendação clínica atual precisará ser modificada em consequência desta especificidade geográfica. Entretanto, estudos adicionais relacionando estes dados com resultado de tratamento de pacientes com aspergilose são necessários para associar se estes altos valores de CIM correspondem a uma falha terapêutica no tratamento da infecção no paciente.

Os antifúngicos triazólicos são frequentemente utilizados no tratamento de infecções fúngicas ambulatoriais e hospitalares (ZAKARIA et al., 2020), sendo recomendada a terapia a longo prazo para o tratamento da aspergilose pulmonar invasiva (DENNING et al., 2011). Contudo, com o surgimento da resistência aos azóis em espécies de *Aspergillus*, especialmente *A. fumigatus*, o manejo da aspergilose tornou-se um desafio. A terapia azólica de longo prazo e o uso irrestrito de compostos azólicos no ambiente como os fungicidas na indústria agrícola e hortícola foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento de resistência (VERWEIJ et al., 2015). A resistência aos azóis é uma preocupação que está em crescimento, uma vez que está associada a uma maior probabilidade de falha no tratamento e pode levar a um aumento na taxa de mortalidade de pacientes que apresentam quadro de aspergilose pulmonar invasiva. A resistência tem sido relatada em todos os continentes, embora em muitas regiões a frequência dessa resistência permanece desconhecida (TASHIRO et al., 2012; ESCRIBANO et al., 2013; VERWEIJ et al., 2015; DENNING et al. 2016). Vários estudos em países do continente europeu relataram altas taxas de resistência aos antifúngicos azólicos, especialmente ao ITR. Na Espanha, um estudo descreve que 66% dos pacientes carregam isolados de *A. fumigatus sensu lato* resistentes aos azóis (ESCRIBANO et al., 2021). Na



Holanda, a porcentagem de pacientes infectados com *Aspergillus* do tipo não selvagem para os azóis atinge 11% (LESTRADE et al., 2020). A ocorrência de resistência aos azóis com valores de prevalência entre 0% e 5% também foi observada, embora esporadicamente, na França, Índia, Japão, China, Dinamarca, Suíça, Noruega e Alemanha (PHAM et al., 2014; VAN DER LINDEN et al., 2015, DENNING et al., 2016).

Em um estudo que envolveu a vigilância da resistência aos azóis realizada no sudeste do Brasil, 1,7% e 24% dos isolados clínicos *A. fumigatus* apresentam perfil não selvagem para ITR e VOR, respectivamente (REICHERT-LIMA et al., 2017). Também no Brasil, um estudo multicêntrico retrospectivo (1998-2017) de isolados clínicos de *A. fumigatus* mostrou que 26% dos isolados clínicos apresentam a CIM de ITR igual ao ECV (1 mg/L), isto é, nenhum isolado com perfil não selvagem para este antifúngico. Além disso, 1,8% dos isolados clínicos apresentam perfil não selvagem para VOR e todos os isolados clínicos do estudo apresentaram POS com valor de CIM  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  (NEGRI et al., 2017). No sul do Brasil, um estudo mostrou que 48% de isolados clínicos *A. fumigatus* apresentam perfil não selvagem para ITR (CIM  $\geq 2$  mg/L) enquanto 4% e 20% dos isolados clínicos *A. fumigatus* apresentam perfil não selvagem para POS e VOR, respectivamente (DENARDI et al., 2018).

Em nosso estudo, a susceptibilidade dos isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* e *A. flavus* aos triazóis ITR, POS e VOR foi investigada. Considerando o ECV para *A. fumigatus*, ITR, POS e VOR apresentaram, respectivamente, 2,4% (n=1/41; CIM 8  $\mu\text{g/mL}$ ), 48,7% (n=20/41; CIM  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ ) e 7,3% (n=3/41; CIM  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* com perfil de linhagem não selvagem. Já para os isolados clínicos *A. flavus*, considerando o ECV para esta espécie, entre os triazóis testados, somente POS (80%; n=8/10) apresentou perfil de linhagem não selvagem. A porcentagem de isolados clínicos do tipo não selvagem para POS analisada em nosso estudo (58%; n=30/51) é elevada em relação aos países europeus, os quais apresentam maior proporção de isolados do tipo selvagem. Em contrapartida, as linhagens não selvagens para ITR são pouco frequentes na nossa região, o que difere da maior prevalência na Europa, bem como no sul do Brasil (DENARDI et al., 2018). O VOR é o antifúngico altamente recomendado e de primeira escolha no tratamento de aspergilose (PATTERSON et al., 2016). Portanto, é importante ressaltar que em nosso estudo encontramos baixa porcentagem de isolados clínicos não selvagem de *A. fumigatus sensu stricto* para VOR, ratificando o protocolo de tratamento de aspergilose que apresenta este antifúngico como de primeira escolha no tratamento da infecção (PATTERSON et al., 2016).

A resistência de *A. fumigatus* aos azóis está frequentemente associada a mutações em regiões de *hotspot* do gene que codifica a enzima 14 $\alpha$ -esterol desmetilase (*cyp51A*) que pode ou não incluir TR na região promotora deste mesmo gene. Assim, os diferentes graus e padrões de resistência são dependentes do tipo de TR e mutação no gene *cyp51A* (DUDAKOVA et al., 2017). Na região promotora dos isolados clínicos deste estudo não foram identificadas TR, mas identificamos os 34 nucleotídeos na posição 279 pb a montante da região codificadora do gene *cyp51A* que coincidem com padrão de linhagens selvagens de *A. fumigatus* (DUDAKOVA et al., 2017). Além disso, foi verificado um polimorfismo no promotor em que uma timina (T) foi substituída por uma citosina (C) no nucleotídeo 334 a montante da região codificadora do gene *cyp51A*. Neste estudo, entre os isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto*, foram identificadas 9 diferentes tipos de mutações no gene *cyp51A*, sendo que três delas, 267 pb (G $\rightarrow$ A), 107 pb (A $\rightarrow$ G) e 1362 pb (T $\rightarrow$ C), não resultaram na alteração do aminoácido (mutações silenciosas). Embora essas mutações não apresentem importância no fenótipo de resistência, são importantes no contexto filogenético (DUDAKOVA et al., 2017).

As seis mutações no gene *cyp51A* que resultaram nas seis substituições de aminoácidos na proteína CYP51 dos isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* deste estudo foram F46Y, M172V, N248T, N248K, D255E e E427K. Estas mesmas substituições, excetuando N248K, foram descritas no Brasil (REICHERT-LIMA et al., 2017), o que indica que são substituições comuns à nossa região. É relatado que estas substituições de aminoácidos possivelmente não estão envolvidas na resistência aos azóis, pois esses pontos estão localizados principalmente na superfície da proteína CYP51A e são encontradas em diferentes combinações em isolados sensíveis aos azóis. Entre estas substituições de aminoácido, os isolados que abrigam a CYP51A multiplamente substituída F46Y/G89G/M172V/L358L/E427K/C454C parecem formar um subgrupo filogenético separado em vez de agrupar com cepas com resistência adquirida. Embora, essas substituições possam ocorrer ao lado daquelas que são reconhecidamente relevantes para a redução da suscetibilidade aos medicamentos antifúngicos, como TR34/L98H (DUDAKOVA et al., 2017). Em nosso estudo, 46,3% (n=19/41) dos isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* apresentaram alterações de aminoácidos no CYP51A. Entre os isolados clínicos que apresentaram alteração de aminoácido, 63,1% (n=12/19) apresentaram somente a alteração M172V, 10,5% (n=2/19) com N248K, 5,2% (n=1/19) com F46Y/E427K e 21,5% (n=4/19) com o conjunto F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K. Para os isolados clínicos *A. fumigatus sensu stricto* de nosso estudo que apresentaram a alteração de aminoácidos na CYP51A, somente 15,8% (n=3/19) apresentou perfil selvagem para os antifúngicos, isto é,

apresentou baixas CIMs aos antifúngicos. Os demais 84,2% (n=16/19) apresentaram pelo menos um antifúngico azólico com valor da CIM acima que o ECV. Com isso, apesar dos isolados clínicos não apresentarem TR na região promotora e apresentarem alterações de aminoácidos com baixa relevância para a resistência do microrganismo aos azóis, existem indícios de que na nossa amostragem estas alterações tenham influenciado nas altas CIMs destes antifúngicos. Entretanto, são necessários mais estudos de investigação de outros fatores que possam causar essa elevação da CIM de cada isolado clínico.

As manifestações clínicas da aspergilose são determinadas por fatores inerentes ao fungo e pela resposta imune do hospedeiro (TSANG et al., 2018). Os isolados clínicos deste estudo foram obtidos de diversos sítios anatômicos sendo que 40% dos *A. flavus* são provenientes da mucosa nasal, 20% provenientes da mucosa oral, 20% do escarro, 10% do esôfago e 10% do ouvido; de *A. fumigatus sensu stricto* 78% são provenientes de escarro, 7,3% provenientes do seio esfenoidal, 4,8% da secreção traqueal, 4,8% do lavado bronco alveolar (LBA), 2,4% provenientes de ferida cirúrgica e 2,4% provenientes de mucosa nasal. Os fungos são capazes de causar doenças e sobrecarregar o sistema de defesa do hospedeiro devido à presença de diversos genes e proteínas associados à sua patogenicidade, chamados de fatores de virulência. Os fatores de virulência do gênero *Aspergillus* atuam naturalmente durante seu desenvolvimento no hospedeiro humano; esses fatores de virulência protegem o microrganismo das condições desfavoráveis e aumentam a disseminação da infecção por *Aspergillus* nos tecidos (MEZHER et al., 2015). Dessa forma, características adaptativas como o tamanho dos conídios, a termotolerância e a capacidade de formar biofilme podem estar relacionados com a taxa de sucesso e com o local de infecção da espécie no hospedeiro. É observado na literatura que o maior causador de aspergiloses invasivas é o *A. fumigatus*, pois ele apresenta conídios pequenos que favorecem sua chegada aos alvéolos pulmonares e a termotolerância, o qual é uma característica observada em patógenos bem-sucedidos (DAVIS, 2009; SALES-CAMPOS et al., 2013; PASQUALOTTO, 2009). Em nosso estudo, a maior porcentagem de isolados provenientes do escarro foi de *A. fumigatus sensu stricto*, espécie que apresentou uma média de diâmetro dos conídios reduzida, quando comparada com as demais espécies do gênero *Aspergillus*; e apresentou termotolerância, situação que não foi observada nos isolados clínicos *A. flavus*. Devido à sua termotolerância e seus pequenos conídios, *A. fumigatus* é um dos patógenos fúngicos humanos mais comuns (DAGENAIS; KELLER, 2009) o que corrobora com nossos dados pois 80% (n=41/51) dos isolados clínicos são desta espécie.

Além disso, a capacidade de formar biofilme é um fator de virulência que também propicia a infecção fúngica (RAMAGE et al., 2011) e entre os diversos microrganismos associados à produção de biofilme estão as espécies do gênero *Aspergillus* (RAMAGE et al., 2012). Estudos demonstram que isolados clínicos de *A. flavus* apresentaram alta taxa de formação de biofilme o qual contribui para a virulência dos isolados clínicos dessa espécie (GHORBEL et al., 2019; EL-HOUSSAINI et al., 2019). Na análise da capacidade de formação do biofilme dos isolados clínicos deste estudo, notou-se, de modo geral, uma produção proporcionalmente semelhante de biomassa e matriz para cada isolado clínico tanto para *A. flavus* quanto para *A. fumigatus sensu stricto*. Adicionalmente, os isolados clínicos *A. flavus*, principalmente o LMC9010.01, apresenta maior produção de biofilme. O que corrobora com os dados da literatura que indicam *A. flavus* como alto produtor de biofilme.

Considerando que existe a associação da capacidade de produção de biofilme com o grau de virulência do microrganismo, testes de virulência no modelo animal alternativo *Galleria mellonella* foram realizados. Este modelo animal alternativo tornou-se um dos modelos de invertebrados mais utilizados com mais de 7.000 artigos científicos publicados desde 2018. Algumas revisões descrevem os diversos benefícios da utilização desse modelo, e dentre eles está a semelhança entre o mecanismo de defesa utilizado pelas larvas e o sistema imune inato de vertebrados; a alta taxa de reprodução e fácil manutenção em laboratório; além do fato da larva sobreviver em amplo espectro de temperatura (18 °C a 37 °C) o que facilita o estudo em patógenos humanos (MAURER et al., 2015; KAVANAGH; FALLON, 2010)

Isolados clínicos de ambas as espécies foram testados com o intuito de verificar a virulência e associar com a respectiva capacidade de formação de biofilme. Todos os isolados clínicos causaram a morte das larvas de *G. mellonella* em até sete dias pós-infecção, indicando que independente do perfil de formação de biofilme, todos foram capazes de matar as larvas do inseto. Importante ressaltar que adicionalmente foi observado que, comparativamente, os isolados clínicos *A. flavus* foram mais virulentos que *A. fumigatus sensu stricto*. Este dado corrobora com dados da literatura, em que é atribuída maior virulência a *A. flavus* (BINDER et al., 2016). Assim, possivelmente a maior capacidade de formar biofilme de *A. flavus* leva a uma maior taxa de virulência.

## 6. CONCLUSÕES

- 80% dos isolados clínicos foram identificados como *A. fumigatus sensu stricto* e 20% como *A. flavus*;
- 68,6% dos isolados clínicos deste estudo apresentaram perfil não selvagem para a AMB;
- A porcentagem de isolados clínicos do tipo não selvagem para POS analisados em nosso estudo (58%; n=30/51) é elevada em relação aos países europeus;
- As linhagens não selvagens para ITR são pouco frequente na nossa região, o que difere da maior prevalência na Europa;
- Foi encontrada baixa porcentagem de isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto* não selvagem ao VOR;
- Não foram encontradas TR na região promotora do gene *cyp51A* e 46,3% (n=19/41) dos isolados apresentaram mutações no gene *cyp51A*, sendo as alterações F46Y, G89G, M172V, N248T, N248K, D255E, L358L, C454C;
- Apesar dos isolados clínicos de *A. fumigatus sensu stricto* não apresentarem TR na região promotora e apresentarem alterações de aminoácidos com baixa relevância para a resistência do microrganismo aos azóis, existem indícios de que na nossa amostragem estas alterações tenham influenciado nas altas CIMs destes antifúngicos;
- Os isolados clínicos de *A. flavus* apresentaram maior produção de biofilme e maior virulência em *G. mellonella*, em comparação com *A. fumigatus sensu stricto* deste estudo.

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAZAR-FUOLI, Laura; MELLADO, Emilia; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana; CUENCA-ESTRELLA, Manuel; RODRIGUEZ-TUDELA, Juan L.. Aspergillus Section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 1244-1251, 22 jan. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00942-07>.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

A. ESPINEL-INGROFF, M. CUENCA-ESTRELLA, A. FOTHERGILL, J. FULLER, M. GHANNOUM, E. JOHNSON, T. PELAEZ, M. A. PFALLER, J. TURNIDGE. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and Aspergillus spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Oct 2011, 55 (11) 5150-5154; DOI: 10.1128/AAC.00686-11

BALAJEE, S. Arunmozhi; NICKLE, David; VARGA, Janos; MARR, Kieren A.. Molecular Studies Reveal Frequent Misidentification of Aspergillus fumigatus by Morphotyping. *Eukaryotic Cell*, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 1705-1712, out. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00162-06>.

BINDER, R *et al.* Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. *Medicine Baltimore*, [s. l], v. 61, n. 2, p. 109-124, mar. 1982. Doi: 10.1097/00005792-198203000-00005.

Binder U, Elisabeth Maurer, Cornelia Lass-Flörl, Galleria mellonella: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species, *Fungal Biology*, Volume 120, Issue 2, 2016, Pages 288-295, ISSN 1878-6146, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.002>.

BLUM G, Perkhofer S, Haas H, et al. Potential basis for amphotericin B resistance in Aspergillus terreus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1553–1555.

BRENNAN, Marc; THOMAS, David Y.; WHITEWAY, Malcolm; KAVANAGH, Kevin. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *Fems Immunology & Medical Microbiology*, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 153-157, out. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2002.tb00617.x>.

BUEID, A.; HOWARD, S. J.; MOORE, C. B.; RICHARDSON, M. D.; HARRISON, E.; BOWYER, P.; DENNING, D. W.. Azole antifungal resistance in Aspergillus fumigatus: 2008 and 2009. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, [S.L.], v. 65, n. 10, p. 2116-2118, 20 ago. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq279>.

Camps, S.M., Dutilh, B.E., Arendrup, M.C., Rijs, A.J., Snelders, E., Huynen, M.A., et al. (2012) Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing. *PLoS One* 7: e50034.

CHATTOPADHYAY, Amitabha; JAFURULLA, Md.. A novel mechanism for an old drug: amphotericin b in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 416, n. 1-2, p. 7-12, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.023>.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 2nd ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, Approved standard M38-A, 2008.

CLSI. Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing, 2nd ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CHEN, P.; LIU, J.; ZENG, M.; SANG, H.. Exploring the molecular mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Journal de Mycologie Médicale*, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 1-5, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100915>.

CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; RANDHAWA, H. S.; GAUR, S. N.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F.. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, [S.L.], v. 67, n. 2, p. 362-366, 25 out. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr443>.

DAVIS, Dana A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. ***Current Opinion in Microbiology***, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 365-370, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.006>.

DAGENAIS, Taylor R. T.; KELLER, Nancy P.. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 447-465, jul. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00055-08>.

de HOOG, G.S., J. Guarro, J. Gene and M.J. Figueras. 2015. Atlas of Clinical Fungi (Version 4.1.2). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands

DENNING, David W.; RINIOTIS, Kostantinos; DOBRASHIAN, Richard; SAMBATAKOU, Helen. Chronic Cavitory and Fibrosing Pulmonary and Pleural Aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. ***Clinical Infectious Diseases***, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 265-280, out. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/376526>.

Denning DWPS, Lass-Florl C, Fraczek MG, Kirwan M, Gore R, et al. High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis*. 2011;52(9):1123–9.

DENNING, D.; Cadranel, J.; Beigelman-Aubry, C.; Ader, F.; Chakrabarti, A.; Blot, S.; Ullmann, A.J.; Dimopoulos, G.; Lange, C.; on behalf of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases and European Respiratory Society. Chronic pulmonary

aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J.* 2016, 47, 45–68.

DERESINSKI SC, Stevens DA. Caspofungin. *Clin Infect Dis.* 2003 Jun 1;36(11):1445-57. doi: 10.1086/375080. Epub 2003 May 19. PMID: 12766841.

DIAZ-GUERRA, T. M. *et al.* A Point Mutation in the 14 $\alpha$ -Sterol Demethylase Gene *cyp51A* Contributes to Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 47, n. 3, p. 1120-1124, mar. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.47.3.1120-1124.2003>.

DIEKEMA DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug;41(8):3623-6. doi: 10.1128/JCM.41.8.3623-3626.2003. PMID: 12904365; PMCID: PMC179829.

DHINGRA, Sourabh; CRAMER, Robert A.. Regulation of Sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. *Frontiers In Microbiology*, [S.L.], v. 8, n. 92, p. 1-14, 1 fev. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00092>.

Dos Reis, T.F., Silva, L.P., de Castro, P.A., de Lima, P.B.A., do Carmo, R.A., Marini, M.M., et al. (2018) The influence of genetic stability on *Aspergillus fumigatus* virulence and azole resistance. *G3 (Bethesda)* 8: 265–278.

DUDAKOVA, Anna *et al.* Molecular Tools for the Detection and Deduction of Azole Antifungal Drug Resistance Phenotypes in *Aspergillus* Species. **Asm Journals**, [S.I.], v. 30, n. 4, p. 1-21, set. 2017

DURIEUX, Marie-Fleur; MELLOUL, Élise; JEMEL, Sana; ROISIN, Lolita; DARDÉ, Marie-Laure; GUILLOT, Jacques; DANNAOUI, Éric; BOTTEREL, Françoise. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 818-834, 8 mar. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2021.1893945>.

EL-HOUSSAINI, Houdaii H.; ELNABAWY, Omnia M.; NASSER, Hebatallah A.; ELKHATIB, Walid F.. Influence of subinhibitory antifungal concentrations on extracellular hydrolases and biofilm production by *Candida albicans* recovered from Egyptian patients. *Bmc Infectious Diseases*, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-9, 16 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-3685-0>.

ESCRIBANO, Pilar; PELÁEZ, Teresa; MUÑOZ, Patricia; BOUZA, Emilio; GUINEA, Jesús. Is Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* a Problem in Spain? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 2815-2820, 29 abr. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02487-12>.

ESPINEL-INGROFF *et al.* 2018. Posaconazole MIC distributions for *Aspergillus fumigatus* species *Chencomplex* by four methods: impact of *cyp51A* mutations on estimation of



epidemiological cutoff values. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01916-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01916-17>.

FANNING, Saranna; MITCHELL, Aaron P.; Fungal Biofilms. **Plos Pathog**, [S.I], v. 8, n. 4, p. 1-4, maio 2012.

FUCHS, Beth Burgwyn; MYLONAKIS, Eleftherios. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Current Opinion In Microbiology*, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 346-351, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.004>.

GAUTIER, M., et al. "Previously Unknown Species of *Aspergillus*". *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no 8, agosto de 2016, p. 662–69. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.013>.

GHORBEL, D.; HADRICH, I.; NEJI, S.; TRABELSI, H.; BELAAJ, H.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; MAKNI, F.; AYADI, A.. Detection of virulence factors and antifungal susceptibility of human and avian *Aspergillus flavus* isolates. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 292-302, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100900>.

GODET, Marie; MUNAUT, Françoise. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 304, n. 2, p. 157-168, mar. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x>.

GONÇALVES SS, Stchigel AM, Cano J, Guarro J, Colombo AL. In vitro anti-fungal susceptibility of clinically relevant species belonging to *Aspergillus* section Flavi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1944–1947.

Gsaller, F., Hortschansky, P., Furukawa, T., Carr, P.D., Rash, B., Capilla, J., et al. (2016b) Sterol biosynthesis and azole tolerance is governed by the opposing actions of SrbA and the CCAAT binding complex. *PLoS Pathog* 12: e1005775.

HARGROVE, Tatiana Y. *et al.* Structure-Functional Characterization of Cytochrome P450 Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and Molecular Basis for the Development of Antifungal Drugs. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.I], v. 290, n. 39, p. 1-19, set. 2015.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W.. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, [S.L.], v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 1 jun. 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/007641-0>.

HINSON, K. F. W. *et al.* Broncho-pulmonary Aspergillosis - A Review and a Report of Eight New Cases. **Thorax**, [S.I], v. 7, n. 4, p. 317-333, dez. 1952.

HOULN, Jiří; SPÍŽEK, Jaroslav; HAVLÍČEK, Vladimír. Antifungal Drugs. Metabolites, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 106, 12 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo10030106>.

J. HOUBRAKEN, S. Kocsubé, C.M. Visagie, N. Yilmaz, X.-C. Wang, M. Meijer, B. Kraak, V. Hubka, K. Bensch, R.A. Samson, J.C. Frisvad, Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species, *Studies in Mycology*, Volume 95, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.

JUDSON MA. Noninvasive *Aspergillus* pulmonary disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004 Apr;25(2):203-19. doi: 10.1055/s-2004-824904. PMID: 16088463.

JUNGHANS H., Metzloff M. (1990) A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *Biotechniques* 2: 176

KAUR, Savneet; SINGH, Shweta. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, [S.I.], v. 52, n. 1, p. 2-9, jan. 2014.

KAVANAGH, Kevin; FALLON, John P.. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*, [S.L.], v. 24, n. 1-2, p. 79-83, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2010.04.001>.

KOICHIRO Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski, Sudhir Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 30, Issue 12, December 2013, Pages 2725–2729, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

KOUSHA M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011 Sep 1;20(121):156-74. doi: 10.1183/09059180.00001011. PMID: 21881144.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology And Evolution**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1547-1549, jun. 2018.

LAMOTH, Frédéric. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-8, 17 maio 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00683>.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R.. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 32, n. 10, p. 1295-1309, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748\(02\)00092-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00092-9).

LI, Li; YANG, Hong-Jun; LIU, Dai -Cheng; HE, Hong-Bin; WANG, Chang-Fa; ZHONG, Ji-Feng; GAO, Yun-Dong; ZENG, Yanjun. Analysis of biofilm formation and associated gene detection in *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis. *African Journal of Biotechnology*, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 2113-2118, 26 jan. 2012. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb11.081>.

LI et al. Disruption of the phospholipase D gene attenuates the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*. n.1, v. 80, p. 429-440, 2012.

LI, Yeqi; ZHANG, Yuanwei; LU, Ling. Calcium signaling pathway is involved in non-CYP51 azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, [S.L.], v. 57, n. 2, p. 233-238, 28 fev. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy075>.

MAURER, Elisabeth; BROWNE, Niall; SURLIS, Carla; JUKIC, Emina; MOSER, Patrizia; KAVANAGH, Kevin; LASS-FLÖRL, Cornelia; BINDER, Ulrike. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. *Virulence*, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 591-598, 24 jun. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1045183>.

MELLADO, E.; DIAZ-GUERRA, T. M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.. Identification of Two Different 14- $\alpha$  Sterol Demethylase-Related Genes ( *cyp51A* and *cyp51B* ) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* species. *Journal Of Clinical Microbiology*, [S.L.], v. 39, n. 7, p. 2431-2438, jul. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.7.2431-2438.2001>.

MELLADO, E., G. Garcia-Effron, et al. “Targeted Gene Disruption of the 14- $\alpha$  Sterol Demethylase (Cyp51A) in *Aspergillus Fumigatus* and Its Role in Azole Drug Susceptibility”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, junho de 2005. world, *journals.asm.org*, <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2536-2538.2005>.

MELLADO, E., G. Garcia-Effron, L. Alcázar-Fuoli, et al. “A New *Aspergillus Fumigatus* Resistance Mechanism Conferring In Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of Cyp51A Alterations”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, junho de 2007. world, *journals.asm.org*, <https://doi.org/10.1128/AAC.01092-06>.

MEZHER MA, Raoof WM, Bandar KI. Identification study some virulence factors of invasive mold infections isolated from patients undergoing chemotherapy in Tikrit teaching Hospital. *Egypt Acad J Biolog Sci*. 2015;7(1):1–11.

MILLER WT. Aspergillosis: a disease with many faces. *Semin Roentgenol*. 1996 Jan;31(1):52-66. doi: 10.1016/s0037-198x(96)80040-x. PMID: 8838945.

MONEY, NP. Chapter 1 - Fungal Diversity. In: WATKINSON, Sarah C.; BODDY, Lynne; MONEY, Nicholas P.. **The Fungi**. 3. ed. Ohio: Elsevier, 2015. Cap. 1. p. 1-36.

MOUSSALLE, Sérgio Kalil et al. Revisão: Otite externa fúngica. *International Archives Of Otorhinolaryngology, Porto Alegre*, v. 3, n. 4, p. 193-195, nov. 1999.

MOYE-ROWLEY WS. 2015. Multiple mechanisms contribute to the development of clinically significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol* 6:70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00070>.

NYWENING, Ashley V.; RYBAK, Jeffrey M.; ROGERS, Phillip David; FORTWENDEL, Jarrod R.. Mechanisms of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. ***Environmental Microbiology***, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 4934-4952, 21 out. 2020. Wiley. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15274>

PASQUALOTTO, Alessandro C.; POWELL, Georgina; NIVEN, Robert; DENNING, David W.. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respirology*, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1121-1127, nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01640.x>.

PATTERSON, Karen C.; STREK, Mary E.; Diagnosis and Treatment of Pulmonary Aspergillosis Syndromes. *Chest*, Pennsylvania, v. 5, n. 146, p. 1358-1368, jun. 2016.

PATTERSON, Thomas F.; THOMPSON, George R.; DENNING, David W.; FISHMAN, Jay A.; HADLEY, Susan; HERBRECHT, Raoul; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.; MARR, Kieren A.; MORRISON, Vicki A.; NGUYEN, M. Hong. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of america. *Clinical Infectious Diseases*, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 1-60, 29 jun. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw326>.

PÉREZ-CANTERO, Alba *et al.* Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, Terragona, v. 55, n. 1, p. 1-11, set. 2019.

PFALLER, Michael A.. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal Of Medicine*, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 3-13, jan. 2012.

PHAM, C.D.; Reiss, E.; Hagen, F.; Meis, J.F.; Lockhart, S.R. Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, 20, 1498–1503

POSCH, Wilfried, et al. “*Aspergillus Terreus*: Novel Lessons Learned on Amphotericin B Resistance”. *Medical Mycology*, vol. 56, n° suppl\_1, abril de 2018, p. S73–82. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx119>.

RAMAGE, Gordon; RAJENDRAN, Ranjith; SHERRY, Leighann; WILLIAMS, Craig. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal Of Microbiology*, [S.L.], v. 2012, p. 1-14, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/528521>.

RAMAGE, Gordon; RAJENDRAN, Ranjith; GUTIERREZ-CORREA, Marcel; JONES, Brian; WILLIAMS, Craig. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *Fems Microbiology Letters*, [S.L.], v. 324, n. 2, p. 89-97, 8 set. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02381.x>.

RAJENDRAN, Ranjith; MOWAT, Eilidh; MCCULLOCH, Elaine; LAPPIN, David F.; JONES, Brian; LANG, Sue; MAJITHIYA, Jayesh B.; WARN, Peter; WILLIAMS, Craig; RAMAGE, Gordon. Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* Biofilms Is Partly Associated with Efflux Pump Activity. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, [S.L.], v. 55, n. 5, p. 2092-2097, maio 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01189-10>.

REICHERT-LIMA, Franqueline; LYRA, Luzia; PONTES, Lais; MORETTI, Maria Luiza; PHAM, Cau D.; LOCKHART, Shawn R.; SCHREIBER, Angélica Zaninelli. Surveillance for

azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. *Mycoses*, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 360-365, 23 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12759>.

RENEWICK, Julie; DALY, Paul; REEVES, Emer P.; KAVANAGH, Kevin. Susceptibility of Larvae of *Galleria mellonella* to Infection by *Aspergillus fumigatus* is Dependent upon Stage of Conidial Germination. *Mycopathologia*, [S.L.], v. 161, n. 6, p. 377-384, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-006-0021-1>.

RENEWICK, Julie; REEVES, Emer P.; WIENTJES, Frans B.; KAVANAGH, Kevin. Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47phox and p67phox to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella*. *Developmental & Comparative Immunology*, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 347-359, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.06.007>.

SALES, Maria da Penha Uchoa. Capítulo 5 - Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S.L.], v. 35, n. 12, p. 1238-1244, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37132009001200012>.

SALES-CAMPOS, Helioswilton; TONANI, Ludmilla; CARDOSO, Cristina Ribeiro Barros; KRESS, Márcia Regina von Zeska. The Immune Interplay between the Host and the Pathogen in *Aspergillus fumigatus* Lung Infection. *Biomed Research International*, [S.L.], v. 2013, p. 1-14, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/693023>.

SAMSON, R. A.; What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Utrecht, v. 47, n. 1, p. 13-20, fev. 2009.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 78, p. 141-173, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.

SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. Cap.54. p.799-807

SATISH, Shruthi; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, Cristina; ZHAO, Yanan; LEE, Min Hee; DOLGOV, Enriko; KRÜGER, Thomas; PARK, Steven; DENNING, David W.; KNIEMEYER, Olaf; BRAKHAGE, Axel A.. Stress-Induced Changes in the Lipid Microenvironment of  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan Synthase Cause Clinically Important Echinocandin Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Mbio**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 1-15, 4 jun. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00779-19>.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241–6246.

SEIDLER, Marc J.; SALVENMOSER, Stefanie; MÜLLER, Frank-Michael C. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52, n. 11, p. 4130-4136, 2008.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Medica*, 1999

SKOV M, Main KM, Sillesen IB, Müller J, Koch C, Lanng S. Iatrogenic adrenal insufficiency as a side-effect of combined treatment of itraconazole and budesonide. *Eur Respir J*. 2002 Jul;20(1):127-33. doi: 10.1183/09031936.02.00248002. PMID: 12166560.

SNELDERS, Eveline, et al. “Azole Resistance Profile of Amino Acid Changes in *Aspergillus Fumigatus* CYP51A Based on Protein Homology Modeling”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, junho de 2010. world, *journals.asm.org*, <https://doi.org/10.1128/AAC.01599-09>.

SOKOL-ANDERSON Marcia L., Janina Brajtburg, Gerald Medoff, Amphotericin B-Induced Oxidative Damage and Killing of *Candida albicans*, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 154, Issue 1, July 1986, Pages 76–83, <https://doi.org/10.1093/infdis/154.1.76>

SPIESS, Birgit; POSTINA, Patricia; REINWALD, Mark; CORNELLY, Oliver A.; HAMPRECHT, Axel; HOENIGL, Martin; LASS-FLÖRL, Cornelia; RATH, Peter-Michael; STEINMANN, Jörg; MIETHKE, Thomas. Incidence of Cyp51 A Key Mutations in *Aspergillus fumigatus*—A Study on Primary Clinical Samples of Immunocompromised Patients in the Period of 1995–2013. *Plos One*, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 103-113, 29 jul. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103113>.

STANDAR, Kerstin; KREIKEMEYER, Bernd; REDANZ, Sylvio; MÜNTER, Wanja L.; LAUE, Michael; PODBIELSKI, Andreas. Setup of an In Vitro Test System for Basic Studies on Biofilm Behavior of Mixed-Species Cultures with Dental and Periodontal Pathogens. *Plos One*, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 13135-13148, 1 out. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013135>.

STEENWYK JL, Shen XX, Lind AL, Goldman GH, Rokas A. A Robust Phylogenomic Time Tree for Biotechnologically and Medically Important Fungi in the Genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *mBio*. 2019 Jul 9;10(4): e00925-19. doi: 10.1128/mBio.00925-19. PMID: 31289177; PMCID: PMC6747717.

TASHIRO, M.; Izumikawa, K.; Minematsu, A.; Hirano, K.; Iwanaga, N.; Ide, E.; Mihara, T.; Hosogaya, N.; Takazono, T.; Morinaga, Y.; *et al.* Antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 584–587.

TSANG, Chi-Ching; TANG, James Y.M.; LAU, Susanna K.P.; WOO, Patrick C.y.. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 16, p. 197-210, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2018.05.003>.

VAN DER LINDEN, J.W.M.; Arendrup, M.C.; Warris, A.; Lagrou, K.; Pelloux, H.; Hauser, P.M.; Chryssanthou, E.; Mellado, E.; Kidd, S.E.; Tortorano, A.M.; *et al.* Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Cdc. Eid. J.* 2015, 21, 1041–1044

VERWEIJ PECA, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis.* 2015;civ885.

VILLENA, G.K.; GUTIERREZ-CORREA, M.. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters In Applied Microbiology*, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 262-268, set. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.01960.x>.

WALSH, Thomas J.; HAYDEN, Randall T.; LARONE, Davise H. Identification of Fungi in Culture. *In: Larone's Medically Important Fungi-A guide to identification.* 3<sup>rd</sup>. Edition, ASM Press (Washington DC), 2018.

WITTWER, Daniela; FRANCHINI, Antonella; OTTAVIANI, Enzo; WIESNER, Andreas. PRESENCE OF IL-1- AND TNF-LIKE MOLECULES IN GALLERIA MELLONELLA (LEPIDOPTERA) HAEMOCYTES AND IN AN INSECT CELL LINE FROM ESTIGMENE ACRAEA (LEPIDOPTERA). *Academic Press*, [S.I.], v. 11, n. 9, p. 637-642, set. 1999.

ZAKARIA, Ayate; OSMAN, Marwan; DABBOUSSI, Fouad; RAFEI, Rayane; MALLAT, Hassan; PAPON, Nicolas; BOUCHARA, Jean-Philippe; HAMZE, Monzer. Recent trends in the epidemiology, diagnosis, treatment, and mechanisms of resistance in clinical *Aspergillus* species: a general review with a special focus on the middle eastern and north african region. **Journal Of Infection and Public Health**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-10, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.007>

ZHANG, Jianhua; ZOLL, Jan; ENGEL, Tobias; HEUVEL, Joost van Den; VERWEIJ, Paul E.; DEBETS, Alfons J. M.. The Medical Triazole Voriconazole Can Select for Tandem Repeat Variations in Azole-Resistant *Aspergillus Fumigatus* Harboring TR34/L98H Via Asexual Reproduction. *Journal Of Fungi*, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 277-289, 11 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6040277>.

ZHANG, Jianhua; DEBETS, Alfons J. M.; VERWEIJ, Paul E.; SNELDERS, Eveline. Azole-Resistance Development; How the *Aspergillus fumigatus* Lifecycle Defines the Potential for Adaptation. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 599, 24 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7080599>.

ZORAN, Tamara *et al.* Azole-Resistance in *Aspergillus terreus* and Related Species: An Emerging Problem or a Rare Phenomenon? **Frontiers In Microbiology**, [S.I.], v. 9, n. 516, p. 1-9, mar. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00516>

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1 – Identificação molecular dos 51 isolados clínicos de *Aspergillus* spp. deste estudo.

Isolado clínico	Identif. Seção	Ref.a GenBank	ITS			Referência GenBank	$\beta$ -tubulina ( <i>benA</i> )				Ref. GenBank	Calmodulina ( <i>caM</i> )			
			Identid. (%)	E-value	Max. Score		Identif.	Identid. (%)	E-value	Max. Score		Identif.	Identid. (%)	E-value	Max. Score
LMC8001.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	976	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,81	0.0	946
LMC8001.03	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	994	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC8001.04	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1027	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC8001.05	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1000	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC8001.06	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	933	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC8001.07	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	994	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC8001.10	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	990	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC8001.11	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1003	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC8001.12	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	992	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,61	0.0	941
LMC9025.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99.6	0.0	1005	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,8	0.0	953
LMC8003.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	902	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	896
LMC8003.02	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.03	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.04	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.05	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891



Isolado clínico	ITS					$\beta$ -tubulina ( <i>benA</i> )					Calmodulina ( <i>caM</i> )				
	Identif. Seção	Ref.a GenBank	Identid. (%)	E-value	Max. Score	Referência GenBank	Identif.	Identid. (%)	E-value	Max. Score	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E-value	Max. Score
LMC8003.06	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	902	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,59	0.0	885
LMC8003.07	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1007	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.08	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	861	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	902	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.11	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	861	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.12	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	994	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.13	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	992	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.14	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	990	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC8003.15	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	987	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99.8	0.0	896	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,79	0.0	891
LMC9026.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1014	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	841	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	968
LMC9001.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1033	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.1	0.0	845	-	-	-	-	-
LMC9002.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1026	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.4	0.0	900	-	-	-	-	-
LMC9003.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1018	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	977
LMC9004.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1018	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	872	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,8	0.0	974
LMC9005.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1024	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9006.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	99.1	0.0	970	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9007.01	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1003	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99.8	0.0	911	-	-	-	-	-
LMC9007.02	<i>Flavi</i>	AF027863.1	100	0.0	1007	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9008.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	100	0.0	1011	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	872	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,4	0.0	959
LMC9009.01	<i>Fumigati</i>	EF669931.1	99,8	0.0	987	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,1	0.0	870

Isolado clínico	ITS					$\beta$ -tubulina ( <i>benA</i> )					Calmodulina ( <i>caM</i> )				
	Identif. Seção	Ref.a GenBank	Identid. (%)	E-value	Max. Score	Referência GenBank	Identif.	Identid. (%)	E-value	Max. Score	Ref. GenBank	Identif.	Identid. (%)	E-value	Max. Score
LMC9010.01	Flavi	AF027863.1	98,1	0.0	950	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	918	-	-	-	-	-
LMC9011.01	Flavi	AF027863.1	99,8	0.0	1000	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	100	0.0	881	-	-	-	-	-
LMC9011.02	Flavi	AF027863.1	99,8	0.0	1007	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99,8	0.0	911	-	-	-	-	-
LMC9012.01	Flavi	AF027863.1	100	0.0	1005	EF661485.1	<i>A. flavus</i>	99,1	0.0	845	-	-	-	-	-
LMC9013.01	Fumigati	EF669931.1	100	0.0	1000	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,6	0.0	968
LMC9014.01	Fumigati	EF669931.1	99,8	0.0	1011	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	880	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,6	0.0	924
LMC9015.01	Fumigati	EF669931.1	99,8	0.0	1009	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	893	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	966
LMC9016.01	Fumigati	EF669931.1	100	0.0	1013	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	887	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	830
LMC9017.01	Fumigati	EF669931.1	99,6	0.0	998	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	872	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,2	0.0	902
LMC9018.01	Fumigati	EF669931.1	99,6	0.0	1000	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	966
LMC9019.01	Fumigati	EF669931.1	99,6	0.0	1000	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	911	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,8	0.0	980
LMC9020.01	Fumigati	EF669931.1	100	0.0	1018	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	944	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,8	0.0	900
LMC9021.01	Fumigati	EF669931.1	100	0.0	972	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	883	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,6	0.0	1029
LMC9021.02	Fumigati	EF669931.1	100	0.0	1014	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,5	0.0	857	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,4	0.0	1046
LMC9022.01	Fumigati	EF669931.1	99,6	0.0	1005	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	907	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	822
LMC9023.01	Fumigati	EF669931.1	99,6	0.0	1005	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,8	0.0	905	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,8	0.0	963
LMC9024.01	Fumigati	EF669931.1	100	0.0	1013	EF669791.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	99,8	0.0	904	EF669860.1	<i>A. fumigatus</i> s.s.	100	0.0	974

Identid., identidade; Fonte: Autoria própria.

## 8.2. Anexo 2 –Tabela dos resultados gerais dos 51 isolados clínicos do gênero *Aspergillus*.

Isolado Clínico	Data da coleta	Conídio (µm)		Colônia Gigante* (cm)				ID molecular	Antifúngicos (µg/mL)				Biofilme			
		MD	DP	24 h	48 h	72 h	96 h		AMB	ITR	VOR	POS	Matriz (492 nm)		Biomassa (570 nm)	
													M	DP	M	DP
LMC8001.01	20/07/2018	2,74	0,36	1,1	2,7	4,7	6,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	4	0,5	0,25	0,062	0,328	0,051	0,505	0,083
LMC8001.03	14/09/2018	3,81	0,39	1,1	3,2	5,2	7,4	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,125	0,162	0,023	0,217	0,056
LMC8001.04	14/09/2018	3,13	0,40	0,9	3,2	5,4	7,2	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,125	0,221	0,028	0,172	0,027
LMC8001.05	14/09/2018	3,68	0,27	1,0	3,2	5,4	7,4	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	1	0,125	0,190	0,037	0,176	0,033
LMC8001.06	14/09/2018	3,21	0,35	0,9	3,2	5,5	7,6	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,25	0,125	0,217	0,022	0,247	0,034
LMC8001.07	14/09/2018	3,16	0,39	0,9	3,3	5,3	7,1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,25	0,125	0,223	0,029	0,177	0,064
LMC8001.10	14/09/2018	3,59	0,32	1,3	3,3	5,4	7,5	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,125	0,198	0,041	0,212	0,082
LMC8001.11	30/11/2018	2,70	0,66	0,9	2,7	4,7	6,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,25	0,125	0,373	0,056	0,472	0,075
LMC8001.12	30/11/2018	3,48	0,35	0,7	2,7	4,8	7,0	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,125	0,500	0,086	0,722	0,088
LMC8003.01	18/05/2018	2,76	0,26	1,0	2,7	4,7	6,8	<i>A. fumigatus s.s.</i>	4	0,5	0,5	0,25	0,256	0,030	0,670	0,066
LMC8003.02	18/05/2018	2,24	0,25	1,1	2,8	4,9	7,0	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,305	0,043	0,562	0,094

Isolado Clínico	Data da coleta	Conídio (µm)		Colônia Gigante* (cm)				ID molecular	Antifúngicos (µg/mL)				Biofilme			
		MD	DP	24 h	48 h	72 h	96 h		AMB	ITR	VOR	POS	Matriz (492 nm)		Biomassa (570 nm)	
													M	DP	M	DP
LMC8003.03	18/05/2018	2,43	0,21	1,0	2,6	4,1	5,3	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,285	0,035	0,707	0,093
LMC8003.04	18/05/2018	2,44	0,33	1,1	2,9	4,8	6,9	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	1	0,405	0,074	1,039	0,100
LMC8003.05	21/05/2018	2,50	0,21	1,0	2,8	4,8	7,1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,125	0,207	0,062	0,771	0,131
LMC8003.06	21/05/2018	3,21	0,24	0,9	2,2	3,4	4,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	<0,031	0,121	0,023	0,333	0,128
LMC8003.07	21/05/2018	2,57	0,25	0,9	1,9	3,3	4,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	1	1	0,073	0,015	0,182	0,068
LMC8003.08	21/05/2018	2,44	0,23	1,2	3,0	5,2	7,5	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,25	0,5	0,250	0,027	0,276	0,039
LMC8003.11	31/08/2018	2,44	0,24	0,9	2,9	5,0	7,3	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,25	0,000	0,005	0,007	0,007
LMC8003.12	31/08/2018	2,55	0,29	0,9	3,0	5,3	7,5	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,109	0,047	0,133	0,031
LMC8003.13	14/09/2018	2,52	0,27	0,8	3,0	5,3	7,5	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	1	0,114	0,036	0,130	0,016
LMC8003.14	26/10/2018	2,62	2,62	0,9	2,9	5,5	7,6	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	1	0,185	0,022	0,174	0,043
LMC8003.15	26/10/2018	2,49	2,49	0,8	3,2	5,4	7,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,117	0,035	0,220	0,070

Isolado Clínico	Data da coleta	Conídio (µm)		Colônia Gigante* (cm)				ID molecular	Antifúngicos (µg/mL)				Biofilme			
		MD	DP	24 h	48 h	72 h	96 h		AMB	ITR	VOR	POS	Matriz (492 nm)		Biomassa (570 nm)	
													M	DP	M	DP
LMC9026.01	21/05/2018	3,48	0,33	1,1	2,8	5,2	7,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,25	0,5	0,227	0,040	0,685	0,044
LMC9001.01	24/04/2017	5,81	0,40	1,2	2,3	4	5,1	<i>A. flavus</i>	2	0,5	0,25	0,5	0,443	0,046	0,696	0,075
LMC9002.01	05/06/2017	6,49	0,46	1,4	2,5	4,3	5,6	<i>A. flavus</i>	2	0,5	0,25	0,5	0,309	0,047	0,913	0,096
LMC9003.01	06/11/2017	3,22	0,30	1	2,4	5	6,9	<i>A. fumigatus s.s.</i>	<16	8	0,5	<16	0,250	0,054	0,285	0,042
LMC9004.01	20/11/2017	3,09	0,21	1	2,8	4,9	7,5	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	1	0,315	0,037	0,444	0,046
LMC9005.01	13/12/2017	3,65	0,34	1,4	2,5	4,3	5,7	<i>A. flavus</i>	2	0,25	0,25	0,5	0,310	0,093	0,711	0,114
LMC9006.01	15/12/2017	3,67	0,26	1,6	2,6	4,4	5,6	<i>A. flavus</i>	2	0,25	0,5	0,5	0,372	0,080	0,709	0,048
LMC9007.01	11/01/2018	3,85	0,31	1,4	2,5	4,2	5,4	<i>A. flavus</i>	2	0,25	0,25	0,5	0,385	0,064	0,642	0,061
LMC9007.02	11/01/2018	3,85	0,36	1,4	2,5	4,3	5,5	<i>A. flavus</i>	2	0,25	0,25	0,5	0,598	0,073	1,134	0,068
LMC9008.01	14/06/2018	2,44	0,24	1,2	2,9	6	8,5	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	1	0,269	0,038	0,378	0,044
LMC9009.01	28/06/2018	3,01	0,31	1,2	2,6	5,5	7,3	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,395	0,047	0,757	0,093
LMC9010.01	28/06/2018	4,46	0,32	1,2	2,1	3,1	4	<i>A. flavus</i>	3	0,25	0,5	0,25	0,849	0,089	1,690	0,195
LMC9011.01	17/07/2018	4,35	0,32	1,4	2,5	4,3	5,5	<i>A. flavus</i>	2	0,25	0,5	0,5	0,293	0,055	0,645	0,097
LMC9011.02	17/07/2018	3,92	0,20	1,4	2,7	4,6	6,1	<i>A. flavus</i>	2	0,25	0,25	0,5	0,657	0,078	0,929	0,090

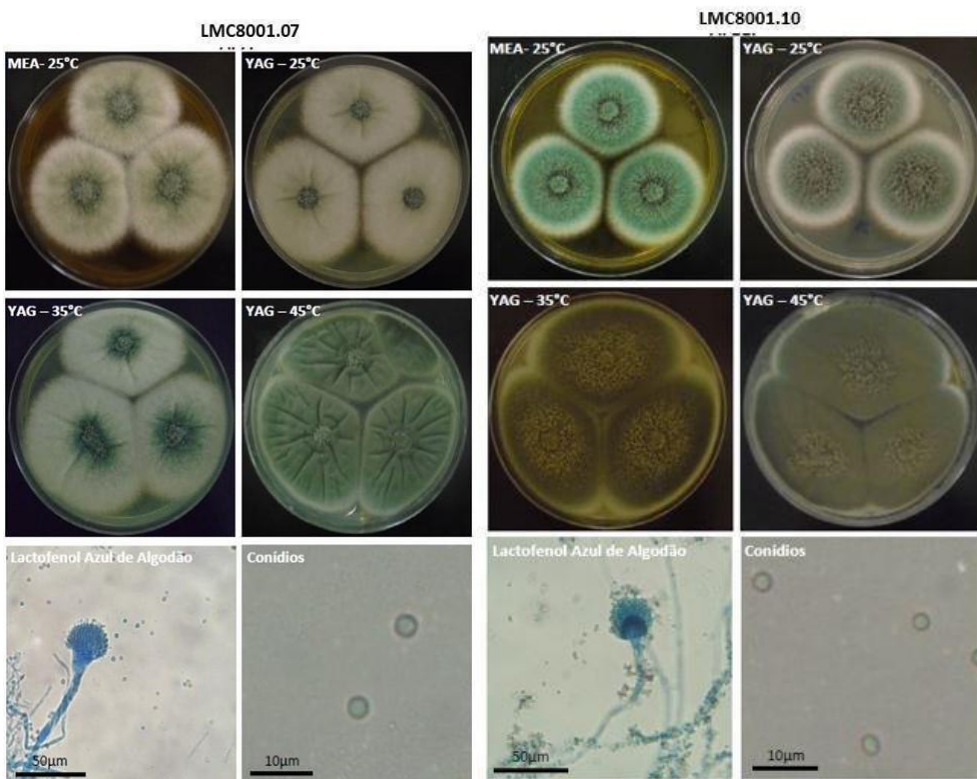
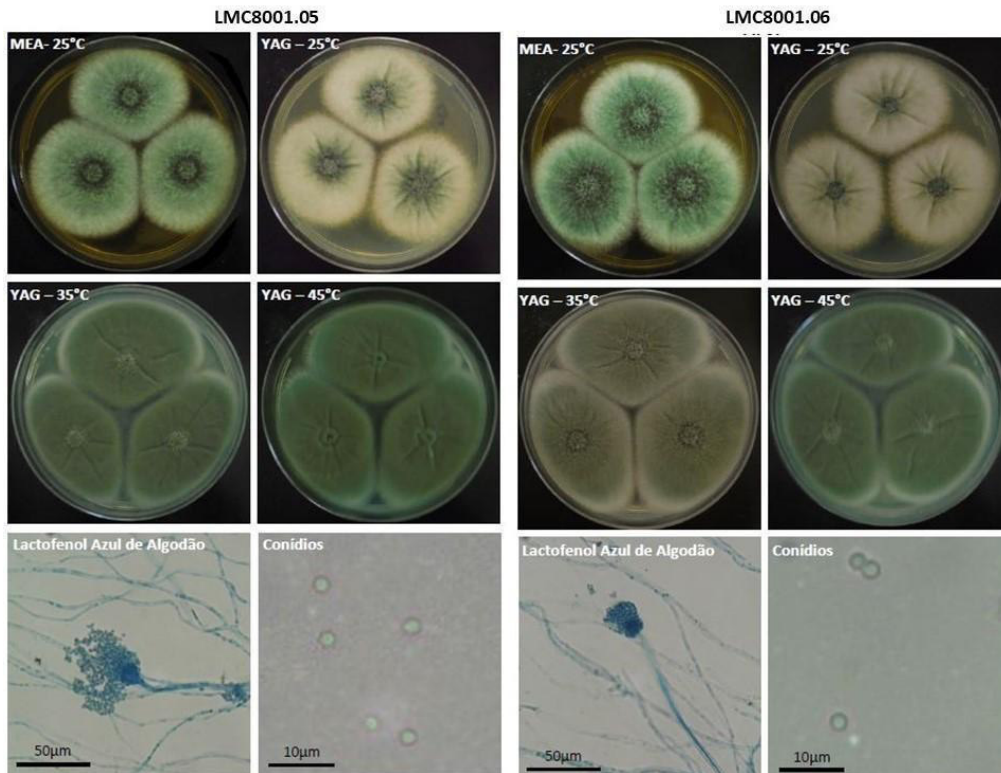
Isolado Clínico	Data da coleta	Conídio (µm)		Colônia Gigante* (cm)				ID molecular	Antifúngicos (µg/mL)				Biofilme			
		MD	DP	24 h	48 h	72 h	96 h		AMB	ITR	VOR	POS	Matriz (492 nm)		Biomassa (570 nm)	
													M	DP	M	DP
LMC9012.01	03/10/2018	4,15	0,24	1,3	2,2	4	5	<i>A. flavus</i>	1	0,13	0,25	0,25	0,141	0,042	0,296	0,051
LMC9013.01	30/10/2018	3,54	0,36	1,3	3,2	5,3	7,2	<i>A. fumigatus s.s.</i>	1	0,5	0,5	0,25	0,105	0,034	0,252	0,060
LMC9014.01	16/11/2018	3,23	0,24	1,1	3	5,2	7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	1	0,5	0,5	0,25	0,396	0,021	0,948	0,096
LMC9015.01	12/11/2018	2,81	0,22	0,7	2,7	4,8	6,9	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	1	2	0,5	0,426	0,010	0,791	0,085
LMC9016.01	17/12/2018	2,97	0,30	1,1	3	5,2	7,1	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,465	0,021	0,780	0,030
LMC9017.01	20/12/2018	2,95	0,20	0,9	2,5	4,5	6,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,466	0,023	0,763	0,035
LMC9018.01	12/12/2018	2,39	0,22	1	2,8	4,9	7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	1	2	0,25	0,327	0,040	0,576	0,020
LMC9019.01	08/01/2019	2,39	0,16	1,2	2,9	5,5	6,9	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	1	0,25	0,516	0,077	0,863	0,079
LMC9020.01	11/01/2019	2,52	0,18	0,8	2,5	4,3	6,8	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	1	2	0,5	0,259	0,034	0,471	0,065
LMC9021.01	05/02/2019	2,34	0,21	1,2	2,9	5	6,7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	1	0,5	0,5	0,25	0,328	0,044	0,821	0,098
LMC9021.02	15/02/2019	2,82	0,18	1,1	2,9	5	6,5	<i>A. fumigatus s.s.</i>	1	0,5	0,5	0,25	0,268	0,016	0,745	0,070

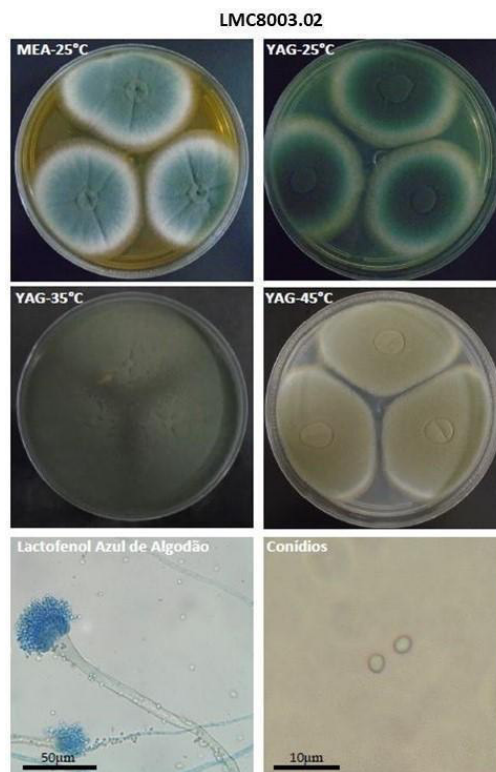
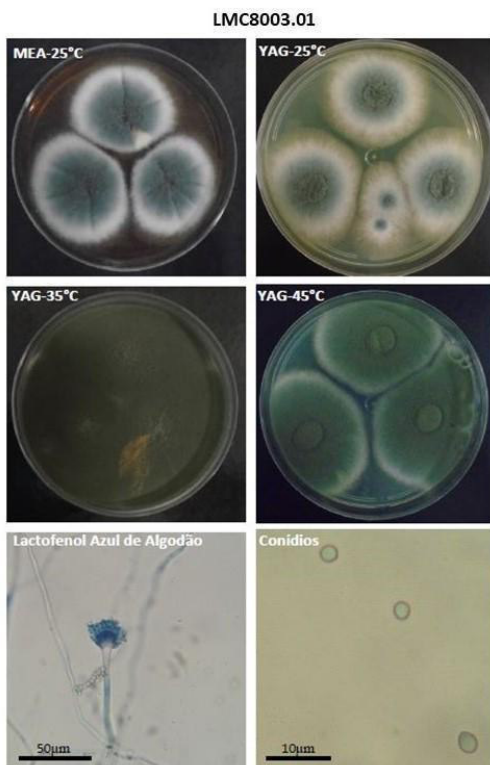
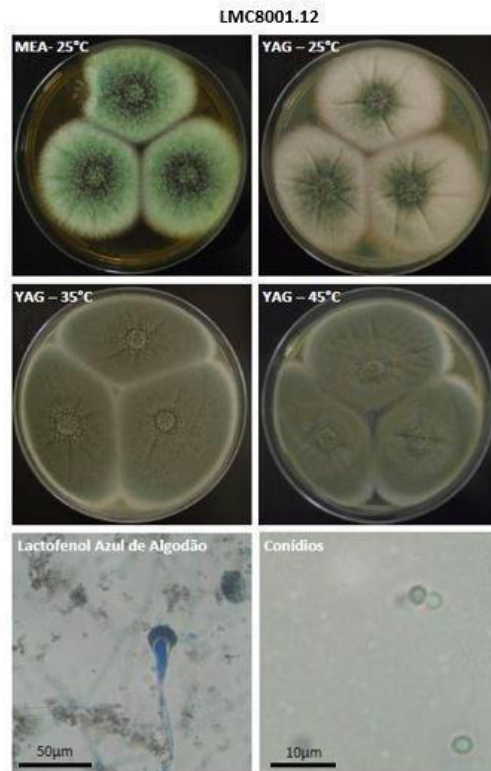
Isolado Clínico	Data da coleta	Conídio (µm)		Colônia Gigante* (cm)				ID molecular	Antifúngicos (µg/mL)				Biofilme			
		MD	DP	24 h	48 h	72 h	96 h		AMB	ITR	VOR	POS	Matriz (492 nm)		Biomassa (570 nm)	
													M	DP	M	DP
LMC9022.01	11/02/2019	2,74	0,32	0,9	2,6	4,7	5,9	<i>A. fumigatus s.s.</i>	1	0,5	1	0,125	0,363	0,032	0,762	0,063
LMC9023.01	19/02/2019	2,69	0,21	0,6	2,2	4,3	5,8	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	0,5	0,5	0,271	0,027	0,595	0,063
LMC9024.01	06/05/2019	2,29	0,27	1	2,9	5,2	7	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	1	1	0,5	0,253	0,037	0,551	0,156
LMC9025.01	30/05/2019	2,79	0,24	1,3	3,1	5,3	7,2	<i>A. fumigatus s.s.</i>	2	0,5	1	0,125	0,389	0,028	0,725	0,154
ATCC204304 <i>A. flavus</i>	-	3,96	0,41	0,4	2,1	3,7	5,3	<i>A. flavus</i>	2	0,25	0,25	0,25	0,325	0,046	0,719	0,089
ATCC46645 <i>A. fumigatus</i>	-	2,44	0,36	0,9	2,5	4,0	5,3	<i>A. fumigatus</i>	4	0,5	0,5	0,25	-	-	-	-

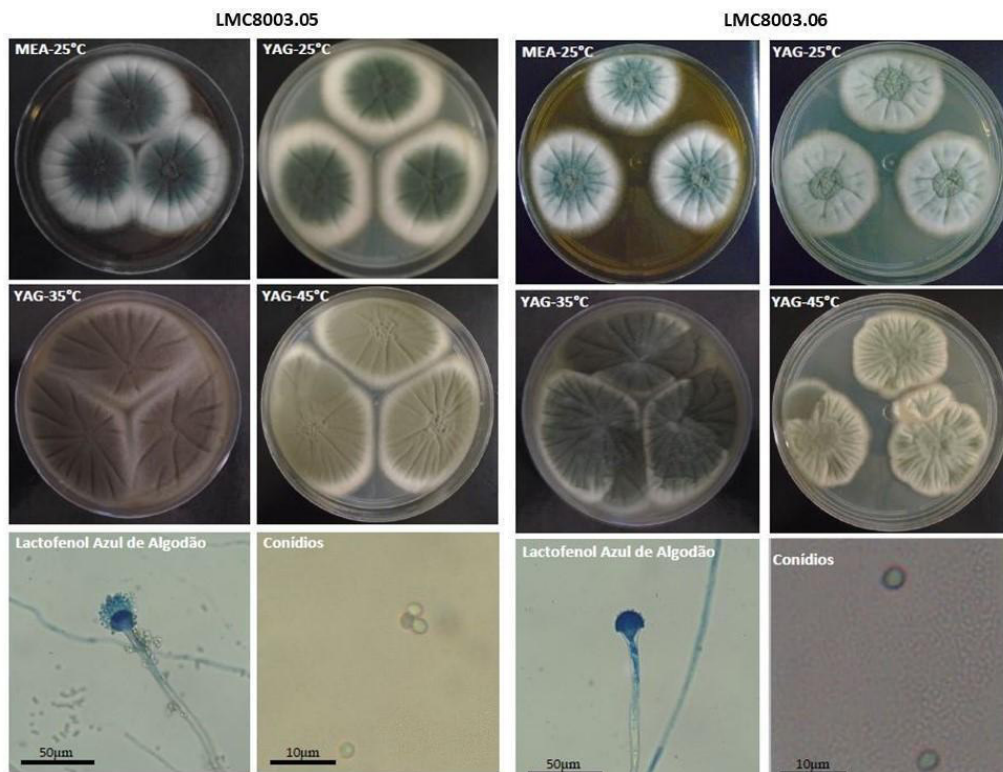
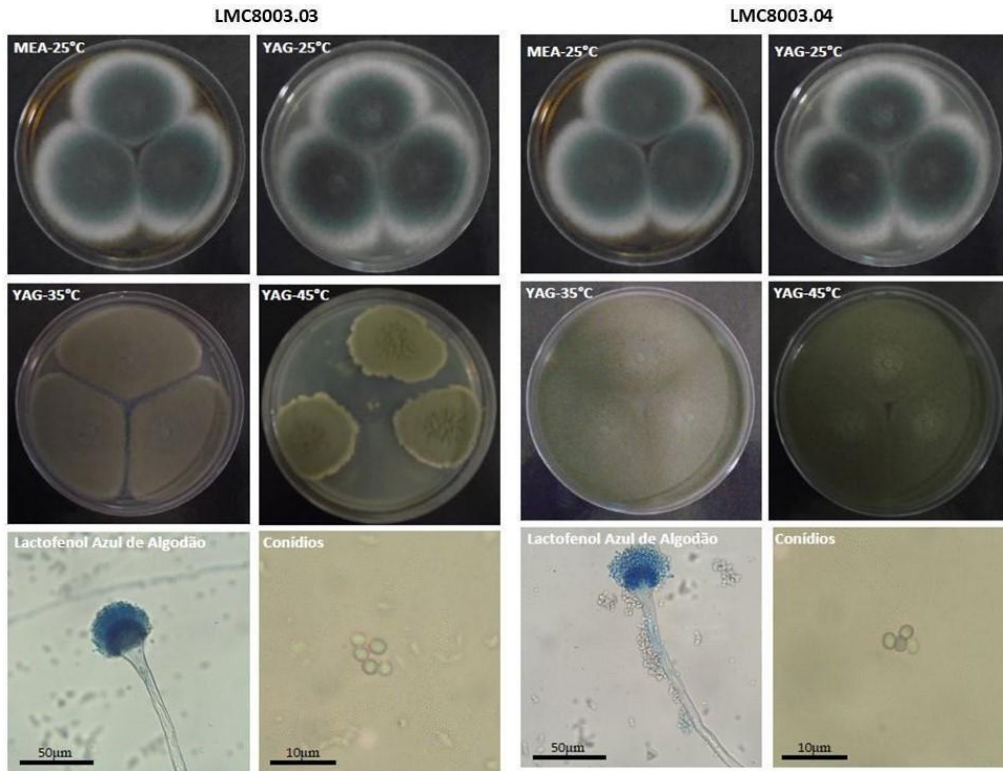
\*, meio de cultura YAG, 37°C, 4 dias; ID, identificação; MD, média diâmetro; DP, desvio padrão; AMB, anfotericina B; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CIM, concentração inibitória mínima; M, média; -, não realizado. Fonte: autoria própria.

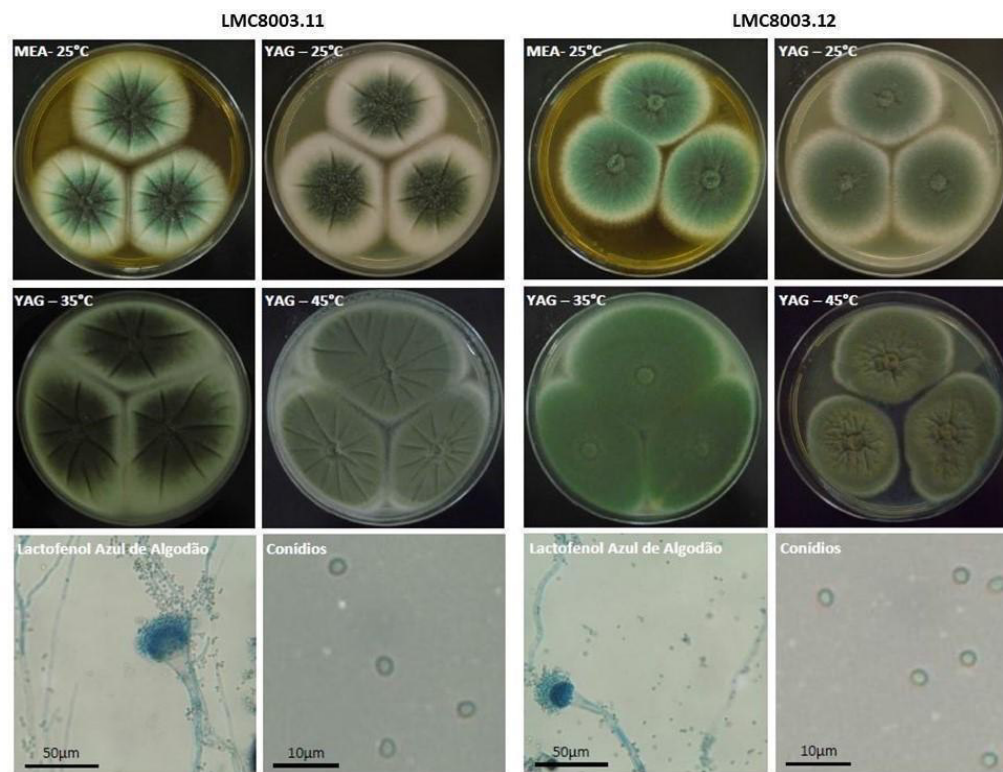
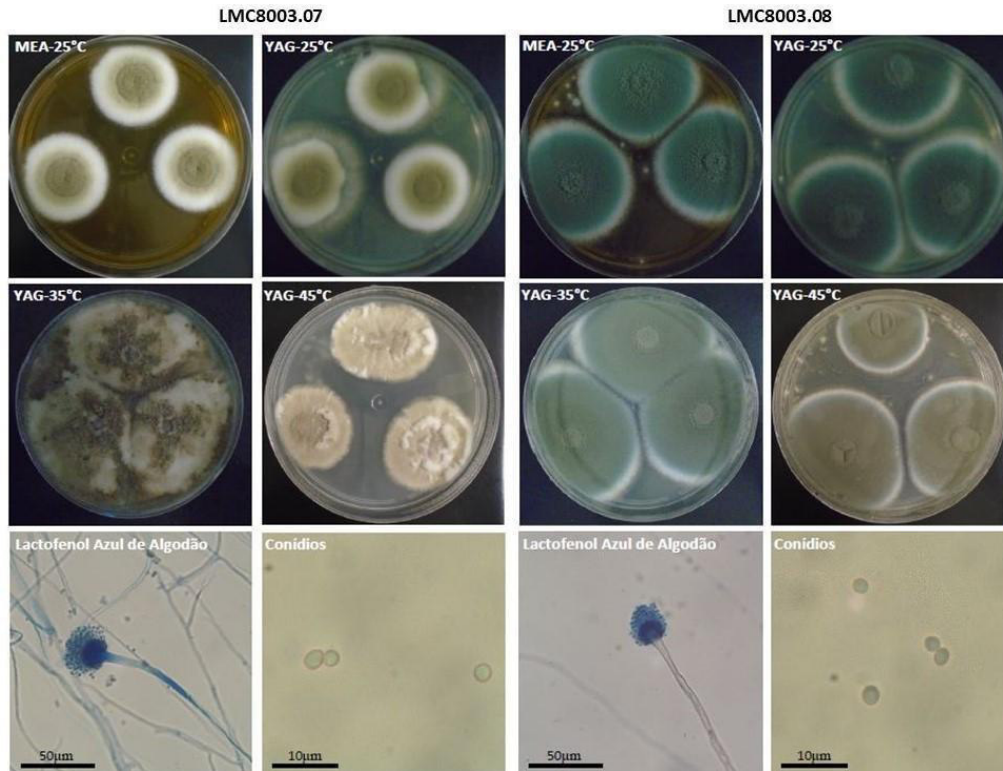




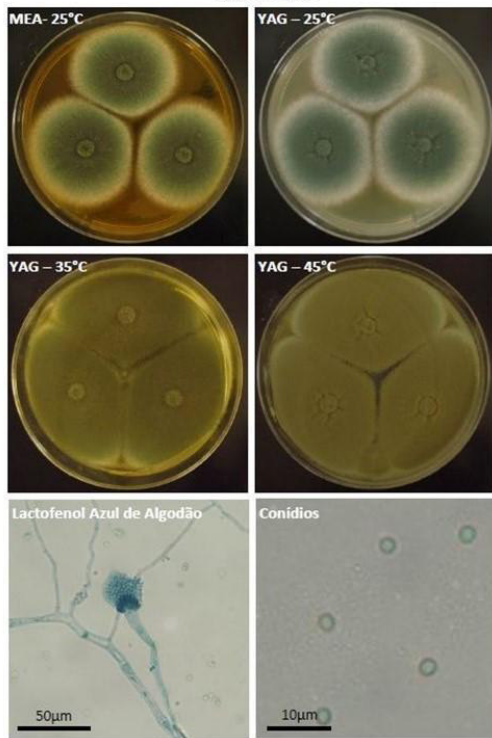




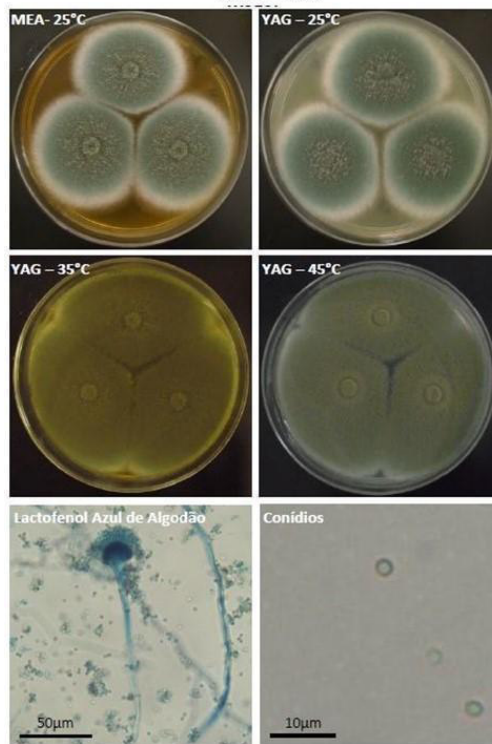




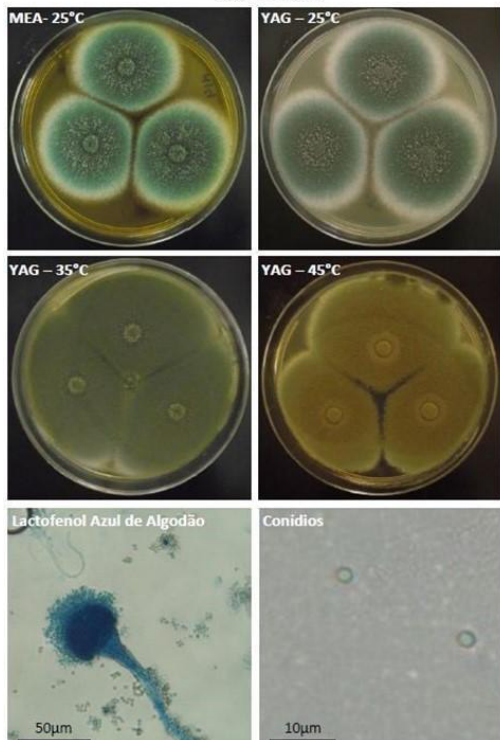
LMC8003.13



LMC8003.14



LMC8003.15



LMC9001.01

