CARLOS ALBERTO PASSINHO CAMPOS

Fungicidas agrícolas azólicos e pressão seletiva de fenótipos resistentes em *Aspergillus fumigatus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

SAO PAULO

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Campos, Carlos Alberto Passinho.
Fungicidas agrícolas azólicos e pressão seletiva de fenótipos resistentes em *Aspergillus fumigatus* / Carlos Alberto Passinho Campos - 2019.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.
Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública.
Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

1. *Aspergillus fumigatus* 2. Família 51 do Citocromo P450. 3. Triazóis. 4. Fungicidas industriais. 5. Farmacorresistência fúngica.

SES/CCD/CD-403/2019

A toda minha família, em especial a minha querida Mãe

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. ”

Guimarães Rosa

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a minha família por toda vida e amor que me incentivam a seguir estudando com esperança em um mundo melhor.

A minha querida orientadora Marcia S. C. Melhem por acreditar em mim e me ensinar com entusiasmo os caminhos da Ciência.

Aos meus colegas do Núcleo de Micologia por me receberem tão bem e por toda companhia durante esses anos.

Aos meus colegas da pós-graduação e a todos funcionários do Instituto Adolfo Lutz pelo carinho e dedicação ao trabalho realizado em benefício de toda sociedade.

A toda Equipe do Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro pela parceria na realização do projeto.

À família Botacin por permitirem a construção de parte do meu experimento em sua horta.

A toda equipe do LEMDI-UNICAMP pelo apoio, amizade e ajuda na realização do projeto.

Aos pesquisadores da Universidade de Chiba pelos ensinamentos e bons momentos durante o processo de pesquisa.

A JICA pelo apoio financeiro necessário para realização do projeto.

A CAPES pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

RESUMO

A utilização de fungicidas azólicos pode estar ligada a resistência aos fármacos utilizados no tratamento da aspergilose invasiva. Em cepas de *Aspergillus fumigatus,* foram descritas mutações no gene *cyp*51A resultando em menor afinidade azol-alvo e resistência antifúngica. Mecanismos de resistência aos triazóis já foram descritos em isolados ambientais de áreas agrícolas e em pacientes sob tratamento. A similaridade dos compostos azólicos, clínicos e agrícolas, e o mesmo mecanismo de ação na célula fúngica podem contribuir para a seleção de cepas com resistência cruzada no hospedeiro e no meio ambiente. O gene *cyp*51A codifica a enzima-chave na produção de ergosterol da membrana celular-14α-demetilase, alvo de todos os compostos azólicos. Mutações no gene *cyp*51A resultam na produção de enzima com alterações em sua conformação tridimensional levando à menor afinidade azol-alvo e resistência antifúngica. A indução de tais mutações foi atribuída à exposição extensiva das cepas ambientais a agrotóxicos fungicidas triazólicos. Estudos em diversos países sugerem que esses produtos exercem pressão seletiva em fenótipos resistentes de *A. fumigatus* O objetivo deste estudo foi avaliar a hipótese da origem ambiental de mecanismos de resistência a triazólicos, em 2 isolados clínicos e 2 ambientais de *A. fumigatus*, modulada pela exposição a um fungicida agrícola. Modelo de horta experimental, parte orgânica e parte exposta a agrotóxico triazólico, foi construída e inoculada com os 4 isolados, todos selvagens não mutantes de *A. fumigatus.* Ao longo de um ano, 11 pulverizações e recuperações mensais dos 4 isolados a partir de amostras de solo permitiram monitorar possível emergência de resistência aos triazólicos: difenoconazol, metconazol, tebuconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. A busca da resistência foi feita pela determinação de MIC, tanto de fungicidas quanto de fármacos triazólicos e pesquisa de mutações gênicas no gene *cyp*51A e sua região promotora. O gene *cyp*51A sequenciado para um desses isolados não apresentou mutações. Conclui-se que a pulverização de difenoconazol não resultou em alteração de MIC de

triazóis nas cepas expostas indicando que não houve seleção de fenótipos resistentes. Outra possibilidade é que, de fato, o tempo de exposição, ou volume/concentração de fungicida não foram suficientes para pressão seletiva.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, família 51 do citocromo P450, triazóis, fungicidas industriais, farmacorresistência fúngica

ABSTRACT

Clinical resistance to triazoles, drugs used for invasive aspergillosis, is a growing problem and its relationship with environmental issues is under discussion. The triazolics are also used to control phytopathogenic fungi and the same problem of increasing resistance is present. The relationship between resistance in clinical and environmental strains is based on the same mode of action of the compounds, so that exposure to one triazole compound may select another resistant strain, characterizing "cross-resistance". In environmental strains of the main etiological agent of aspergillosis-*Aspergillus fumigatus*, classified as azole resistant, mutations associated with the *cyp*51A gene have been described. This gene encodes the key enzyme in the production of cell membrane ergosterol-14α-demethylase, target of all azole compounds. Mutations in the *cyp*51A gene result in enzyme production with changes in its three-dimensional conformation leading to lower target azole affinity and antifungal resistance. The induction of such mutations was attributed to the extensive exposure of environmental strains to triazole fungicide pesticides. Studies in several countries suggest that these products exert selective pressure on resistant *A. fumigatus* phenotypes. The objective of this study was to evaluate the hypothesis of the environmental origin of triazole resistance mechanisms in 2 clinical isolates and 2 environmental isolates of *A. fumigatus*, modulated by exposure to an agricultural fungicide. Experimental garden model, organic part and part exposed to triazolic pesticide, was built and inoculated with the 4 isolates, all non-mutant wild *A. fumigatus*. Over a year, 11 sprayings and monthly recoveries of the 4 isolates from soil samples allowed monitoring of possible emergence of resistance to triazoles: difenoconazole, metconazole, tebuconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. The search for resistance was made by the search for gene mutations that, so far, has not been found. MIC determination of both fungicides and triazole drugs against isolates, exposed and recovered by the 5th month. The *cyp*51A gene sequenced for one of these isolates showed no mutations. By microsatellite

technique, the same isolate was not similar to the seeded isolate. It was concluded that difenoconazole spraying did not result in alteration of triazole MIC in the exposed strains indicating that there was no selection of resistant phenotypes. On the other hand, it was not possible to correlate the inoculated strain with the recovered strain and evaluated for MIC. Therefore, other recovered strains should be compared to inoculated strains for more grounded conclusion. Another possibility is that, in fact, exposure time, or fungicide volume / concentration was not sufficient for selective pressure.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, cytochrome P450 family 51, triazoles, industrial fungicides, fungal drug resistance

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: aspergilose broncopulmonar alérgica

AI: aspergilose invasiva

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

APC: aspergilose pulmonar crônica

ATCC: *American type culture collection*

ATP: *binding cassete transporter*

BMD: broth microdilution

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CPZ: Ciproconazol

CYP: citocromo P-450

DFZ: Difenoconazol

DGC: doença granulomatosa crônica

ECV: *epidemiologic cutoff values*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ITZ: Itraconazol

ITS: *Intergenic Transcribed Spacer*

MAT: *Mating type*

MIC: *Minimal Inibitory Concentration*

MSF: *Major Superfamily Facilitator*

MTZ: Metconazol

p.a.: Pró-análise

PBS: tampão fosfato salino

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PZC: Posaconazol

SREBPs: *sterol regulatory element-binding protein*

TBZ: Tebuconazol

TR: *tandem repeat*

UFC: unidades formadoras de colônia

VCZ: Voriconazol

WT: *wild-type*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micromorfologia de *Aspergillus* spp 21

Figura 2. Filogenia combinada usando nove loci (RPB1, RPB2, Cct8, Tsr1, CaM, BenA, SSU, LSU, ITS). No filograma são mostrados os subgêneros e seções do gênero *Aspergillus* 24

Figura 3. Filogenia combinada para BenA, CaM e RPB2, os conjuntos de dados mostram a relação filogenética de espécies e séries na seção Fumigati 25

Figura 4. Estrutura molecular de triazóis..... 33

Figura 5. Ilustração do gene cyp51A de *A. fumigatus*, mostrando região promotora, posição de diferentes mutações e seus fenótipos de resistência aos antifúngicos azólicos 44

Figura 6. *A. fumigatus* gene *cyp*51A, região promotora e os pontos de mutação que conferem resistência aos antifúngicos azólicos..... 44

Figura 7. Mecanismo de resistência em *A. fumigatus* devido a (A) aumento do efluxo do fármaco, (B) super expressão da enzima alvo e (C) importação de colesterol exógeno 45

Figura 8. Os três mecanismos de resistência aos medicamentos azólicos. (A) Presença de mutações responsáveis pela substituição causando modificações estruturais da enzima *cyp*51A que conduz à menor afinidade dos azóis. (B) Super expressão do gene *cyp*51A devido à inserção de 34 pb, em sua região promotora, combinada com substituição no codon 98 de leucina por histidina (TR34 / L98H) causando aumento no nível celular de *cyp*51A. (C) Super expressão dos genes que codificam o transportador de efluxo causando redução na acumulação intracelular de fármaco azólico 47

Figura 9. Mecanismos de resistência a azóis em *A. fumigatus*, em que os MICs (mg/L) das cepas mutantes constam entre parênteses. (A) substituições de aminoácidos nos codons (G54, P216, F219, M220 e G448); (B) transportadores ABC de efluxo; (C) seqüências de repetição na região promotora do gene *cyp*51A..... 47

Figura 10. Dois mecanismos de resistência derivados do meio ambiente. Simplificação dos mecanismos de resistência TR34/L98H (acima) e TR46/Y121F/T289A (abaixo). As estrelas indicam mutações no cyp51A que

conferem substituições de aminoácidos. TR é uma sequência com diversas cópias na região promotora do gene..... 49

Figura 11. As áreas em vermelho mostram países que relataram o mecanismo de resistência TR34/L98H e TR46/Y121F/T289A em isolados de *A. fumigatus* clínicos ou ambientais. 50

Figura 12. Reprodução de *A. fumigatus* e estratégias para adaptação à exposição aos azóis. Núcleos pretos: sensíveis, núcleos vermelhos: resistentes a azóis; outras cores: variabilidade dos núcleos. (A) Reprodução assexual (linha laranja), reprodução sexual (linha azul) e recombinação parassexual (linha roxa). (B) reprodução assexual aumenta o número de mutações espontaneas por divisão mitótica durante a produção intensa de conídios. (C) reprodução sexual como importante estrátegia para aumentar variabilidade genética através da recombinação meiótica. (D) ciclo parassexual que ocorre pela fusão de núcleos, geneticamente diferentes, mas de hifas compatíveis, permitindo a recombinação gênica no estágio diplóide, resultando no aumento da variabilidade genética..... 53

Figura 13. Estrutura molecular de fungicidas triazólicos utilizados na agricultura 55

Figura 14. Rotas ambientais e clínicas do desenvolvimento da resistência a azóis em infecções por seção Fumigati. (A) exposição de conidios aos compostos azólicos na agricultura que pode induzir mutações em conídios resultando fenótipo resistente. (B) Paciente de aspergilose não tratada, após a inalação de conidios resistentes e sensíveis. (C) Paciente tratado com triazóis de uso clínico sob pressão iatrogênica, que leva à seleção de cepas resistentes. (D) Paciente infectado por cepa sensivel que recebe terapia de longo prazo com triazóis. (E) Paciente que recebeu terapia e evoluiu para cura, sem desenvolver resistência (seta preta). (F) Paciente com cepa resistente selecionada após terapia azólica (seta azul) ou por uso de azol na agricultura (seta verde). Isso induz falha no manejo clínico da doença 57

Figura 15. Estufa construída em área agrícola do município de Rio Claro contendo hortas experimentais de cebolinha 62

Figura 16. Esquema de disposição da área controle e da área exposta ao fungicida difenoconazol na horta experimental de cebolinhas. Setas azuis indicam o inóculo das 4 cepas (Af1, Af2, Af3, Af4), setas vermelhas indicam a pulverização do fungicida..... 62

Figura 17. Suspensão das amostras de solo em salina estéril e colônias de *A. fumigatus* recuperadas em ágar batata 63

Figura 18. Placas de ágar dextrose batata com colônias fúngicas recuperadas de amostras de solo. Crescimento de colônias: esquerda colônias-controle não expostas e direita colônias expostas a difenoconazol 73

Figura 19. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de itraconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol. 80

Figura 20. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de voriconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol. 80

Figura 21. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de posaconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol. 81

Figura 22. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de metconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol. 81

Figura 23. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de tebuconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol. 82

Figura 24. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de difenoconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol. 82

Figura 25. Placas de Petri com Ágar Mueller Hinton suplementados com 2mg/L de itraconazol, utilizadas para triagem de fenótipos resistentes das amostras de solo. C+, controle positivo de crescimento; demais placas: não houve recuperação de colônias a partir de amostras de solo 83

Figura 26. Dendograma da análise de microssátelites das 4 cepas originais e 10 isolados recuperados do solo..... 89

Figura 27. Dendograma da análise de microssátelites e valores de MIC das 4 cepas originais e de 10 isolados recuperados do solo..... 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Breakpoints* clínicos aos antifúngicos e categorias interpretativas para fungos filamentosos através dos padrões de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST, 2020 40

Tabela 2. Valores de corte epidemiológicos aos azóis para *Aspergillus* spp. através dos padrões de microdiluição em caldo do CLSI, 2018 e EUCAST, 2020 41

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de fungicidas e fármacos azólicos frente às 4 cepas originais utilizadas para inoculação no solo de horta experimental 75

Tabela 4. Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente aos isolados recuperados do solo da horta não exposta (controle) ao fungicida até 11º mês de experimento 76

Tabela 5. Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente aos isolados recuperados do solo da horta expostas ao fungicida difenoconazol, recuperadas até 11º mes de experimento 77

Tabela 6. Intervalo de valores de concentração inibitória mínima (MIC), MIC_{50} e MIC_{90} e distribuição de MIC de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente ao total, em (%), de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta controle 78

Tabela 7. Intervalo de valores de concentração inibitória mínima (MIC), MIC_{50} e MIC_{90} e distribuição de MIC de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente ao total, em (%), de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta exposta ao fungicida 79

Tabela 8. Resultado da comparação do sequenciamento da β-tubulina com o banco de dados do GenBank 85

Tabela 9. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af1 e três isolados recuperados do solo 86

Tabela 10. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af2 e três isolados recuperados do solo 87

Tabela 11. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af3 e um isolado recuperado do solo. 87

Tabela 12. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af4 e um isolado recuperado do solo. 88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação de DNA da região da *β*-tubulina 2A/2B de *A. fumigatus* 68

Quadro 2. Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação do gene cyp51A de *A. fumigatus* 68

Quadro 3. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento dos 9 fragmentos de DNA para analise de microssatélite de *A. fumigatus*..... 68

Quadro 4. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene β-tubulina 70

Quadro 5. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene cyp51A de *A. fumigatus.* 71

Quadro 6. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento dos 9 fragmentos de DNA para analise de microssatélite de *A. fumigatus*..... 71

INDICE

1. Introdução **20**
1.1 Agentes de aspergilose **20**
1.2 Aspergilose e tratamento **30**
1.2.1 Modo de ação e determinação de atividade de fármacos **35**
1.2.2 Mecanismos de resistência a fármacos azólicos **41**
1.3 Resistência em isolados ambientais de *Aspergillus* **47**
1.4 Fungicidas Agrícolas Azólicos **54**
2. Objetivos **59**
2.1 Objetivo geral **59**
2.2 Objetivos específicos **59**
3. Material e Métodos **60**
3.1 Local de trabalho **60**
3.2 Cepas utilizadas no estudo **60**
3.3 Exposição das 4 cepas originais a fungicida e recuperação das cepas expostas **60**
3.3.1 Preparo do solo com inóculo fúngico **61**
3.3.2 Disposição da horta experimental e exposição ao fungicida **61**
3.3.3 Coleta e processamento das amostras de solo **63**
3.4 Determinação de MIC **64**
3.4.1 Análise de resultados de suscetibilidade de antifúngicos **65**
3.4.2 Triagem de fenótipos resistentes das amostras de solo **65**
3.5 Métodos moleculares **65**
3.5.1 Extração de DNA genômico **66**
3.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase **66**
3.5.4 Eletroforese em gel de agarose **69**
3.5.5 Reação de sequenciamento **70**
3.5.6 Precipitação e lavagem do DNA com etanol **71**
3.5.7 Análise de resultados de sequenciamento **72**
4. Resultados **73**
4. 1 Recuperação dos isolados do solo **73**
4.2 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos clínicos e fungicidas agrícolas **74**
4.3 Triagem de fenótipos resistentes das amostras de solo **83**

4.4 Sequenciamento gênico **84**
4.4.1 Sequenciamento da *β*-tubulina **84**
4.4.2 Sequenciamento de gene *cyp*51A **86**
4.4.3 Análise de microssatélites **86**
5. Discussão **91**
6. Conclusão **97**
7. Referências Bibliográficas **98**

1. Introdução

A aspergilose é uma infecção fúngica oportunista de ocorrência global causada por espécies do gênero *Aspergillus.* Espécies desse gênero estão relacionadas com grande variedade de manifestações clínicas que vão desde reações alérgicas até infecção invasiva. O grau de infecção é determinado pela capacidade da resposta imune do hospedeiro, virulência da cepa e grau de exposição ao patógeno, podendo variar de inflamações locais das vias aéreas até inflamações graves do pulmão e infecção invasiva se disseminando pelo organismo (Richardson & Warnock, 2003; Beisswenger et al., 2012).

1.1 Agentes de aspergilose

*Aspergillus s*ão fungos pertencentes à família *Aspergillaceae*, à ordem dos *Eurotiales*, à classe dos *Eurotiomycetes* e ao filo *Ascomycota.* O gênero *Aspergillus* é subdividido em 6 subgêneros, 27 seções, 75 séries e 446 espécies, das quais cerca de 20 foram identificadas como causa de infecção oportunista. As espécies de maior interesse são *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus* e *A. niger*. *Aspergillus fumigatus* é responsável por 90% dos casos de aspergilose invasiva e os demais são pelas espécies: *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans* e *A. niger* (Latgé, 1999; Balejee et al., 2007; Dagenais & Keller, 2009; Gavier-Widén et al., 2012; Krijgsheld et al., 2013; Jiang et al., 2013; Houbraken et al., 2014; Frisvad et al., 2016; Houbraken et al., 2020).

Os pertencentes ao gênero *Aspergillus* caracterizam-se por serem organismos filamentosos. Na fase anamórfica, ou seja, assexuada, a reprodução é realizada através de esporos assexuais, chamados conídios, e na fase sexuada ou teleomórfica a reprodução ocorre pela formação de ascosporos. As espécies deste gênero são descritas como cosmopolitas

ubíquas no meio ambiente, saprófitas e podem ser encontradas em muitos nichos ambientais diferentes como ar, água, solo, vegetação em decomposição, alimentos, nos animais e até em ambientes interiores (Latgé, 1999; Latgé, 2001; Pattron, 2006; Perrone et al., 2007; Geiser et al., 2009; Alastruey-Izquierdo et al., 2012; Gavier-Widén et al., 2012).

A principal forma de transmissão ocorre pela inalação de esporos (conídios) de *Aspergillus* spp., presentes no meio ambiente, ocasionando infecção do trato respiratório, mas também podem ocorrer em processos dermatológicos, procedimentos cirúrgicos, ferimentos e queimaduras (Oliveira e Caramalho, 2014). Os riscos de exposição variam, temporalmente e geograficamente, estando dependentes de padrões de precipitação, umidade, temperatura e condições de ventos (Panackal et al., 2010).

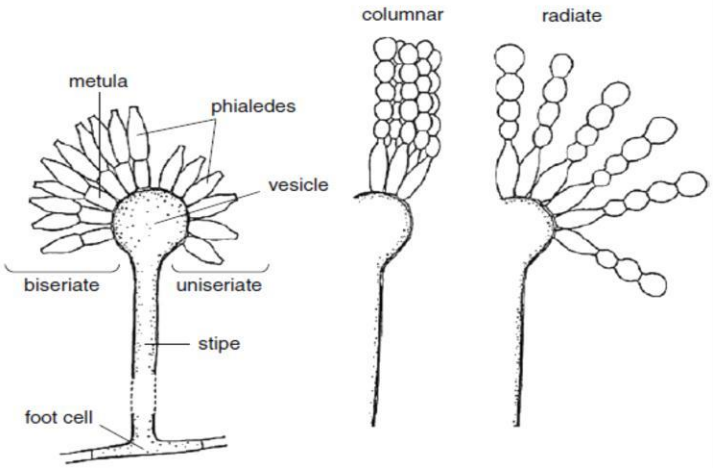


Figura 1. Micromorfologia de *Aspergillus* spp. (Guarro, 2009).

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um talo filamentoso constituído por hifas septadas, com ramificações dicotómicas fazendo ângulos de 45°. Os conidióforos podem exibir uma forma direita, sinuosa, lisa ou rugosa e hialinos ou pigmentados. O conidióforo cresce perpendicular a célula pé e se dilata na extremidade formando uma vesícula. A forma da vesícula (esférica, hemisférica, alongada ou elíptica) constitui uma

característica de identificação da respectiva espécie. Quanto à cor, esta estrutura apresenta-se igual ao conidióforo ou incolor. As fiálides, células conidiogênicas, são suportadas diretamente pela vesícula ou por uma camada de células estéreis chamadas métula (Figura 1). As fiálides podem cobrir toda a vesícula ou apenas o seu topo e podem ter uma ou mais séries, sendo a disposição das fiálides uma característica importante na identificação morfológica. Da extremidade das fiálides os conídios são formados por mitose e geram cadeias conidiais, sendo que estes podem apresentar rugosidade na parede e dimensões variáveis que são características importantes na identificação de espécie. O conjunto da vesícula, das fiálides e das cadeias de conídios é designado por cabeça aspergilar. A cabeça aspergilar situa-se no ápice de um conidióforo que apresenta dimensões variáveis entre 40 a 300 µm, de acordo com a espécie (Minami, 2003; Murray et al., 2006; Pasqualotto, 2010).

Relativamente ao aspecto macroscópico, as colônias apresentam superfície de cor branca, na fase inicial de maturação. Dependendo das espécies, a sua cor pode evoluir para verde, amarelo, castanho ou preto. A textura da colônia inicia-se cotonosa, tornando-se pulverulenta com a produção de esporos (Murray et al., 2006).

Para se proceder à identificação da espécie, a aparência da colônia e da estrutura da cabeça conidial pode fornecer uma boa informação. Mas a identificação correta da espécie necessita de análise a nível molecular já que isolados com características fenotípicas iguais podem ser espécies diferentes quando analisadas molecularmente e isolados de amostras humanas e animais podem apresentar diferenças na micromorfologia e impossibilitar a idendificação por aspectos morfológicos. A taxonomia das espécies de *Aspergillus* tem sido revista através de parâmetros moleculares, morfológicos e fisiológicos (Samson et al., 2014; Pelaéz et al., 2012).

A taxonomia baseia-se em abordagem polifásica que considera relevante para a identificação de espécies os dados morfológicos (micro e macroscópicos), fisiológicos, metabólicos e informações moleculares de diferentes regiões genômicas. Através de metodologias moleculares usando

um conjunto de dados da sequência de nove marcadores genéticos o gênero *Aspergillus* foi dividido em 6 subgêneros (*Circumdati*, *Nidulantes*, *Candidi*, *Fumigati*, *Aspergillus*, *Cremei* e *Polypaecilum*) que foram subdivididos em 27 seções, as seções foram subdivididas em séries, total de 75 séries, contendo um total de 446 espécies (Houbraken et al., 2020) (Figura 2). Seções e séries de espécies englobam espécies muitos semelhantes entre si. O sequenciamento da região *Intergenic Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal permite a identificação da seção de *Aspergillus* spp. Pelo sequenciamento dos genes *ß*-tubulina e calmodulina, que possuem grande variabilidade interespecífica e são relativamente conservados entre espécies, é possível identificar as espécies crípticas dentro das diversas seções de *Aspergillus* spp. A identificação correta das espécies crípticas se tornou muito importante, pois características clínicas como virulência e perfil de sensibilidade aos antifúngicos podem variar entre as espécies (Frisvad, 2016). Diferentes espécies do gênero *Aspergillus* pertencem a mesma seção, mas apresentam diferentes perfis de suscetibilidade aos antifúngicos. Muitas espécies da seção Fumigati, como *A. lentulus, A. udagawae*, *A. pseudofisheri*, *A. fumigatiffinis*, *A. thermomutatus* e *A. virinutans* apresentam diminuição da susceptibilidade a diversos agentes antifúngicos como anfotericina B, azóis e equinocandinas (Howard et al., 2011; Baddley et al., 2009; Krishnan et al., 2009).

Aspergillus da seção Fumigati são divididos em 8 séries (Brevipedes, Fennelliarum, Fumigati, Neoglabri, Spathulati, Thermomutati, Unilaterales e Viridinutantes) totalizando 56 espécies, das quais 15 já foram relatadas como isoladas em amostras clínicas. Dentro da série Fumigati está a espécie *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (Figura 3) (Alcazar et al., 2008; Peláez et al., 2012; Alastruey-Izquierdo et al., 2014; Lamonth, 2016; Hagiwara, 2016; Houbraken et al., 2020).

Espécies produtoras de ascomas na seção Fumigati eram, originalmente, descritas como *Neosartorya,* mas foram transferidas para o gênero *Aspergillus*. Espécies como *A. fumigatus* e *A. lentulus,* que se pensava em produção apenas do estado assexual, mostraram-se capazes

de produzir ascomas quando cruzadas com *mating type* oposto (O'Gorman et al., 2009; Swilaiman et al., 2013; Samson et al., 2006, 2007, 2014).

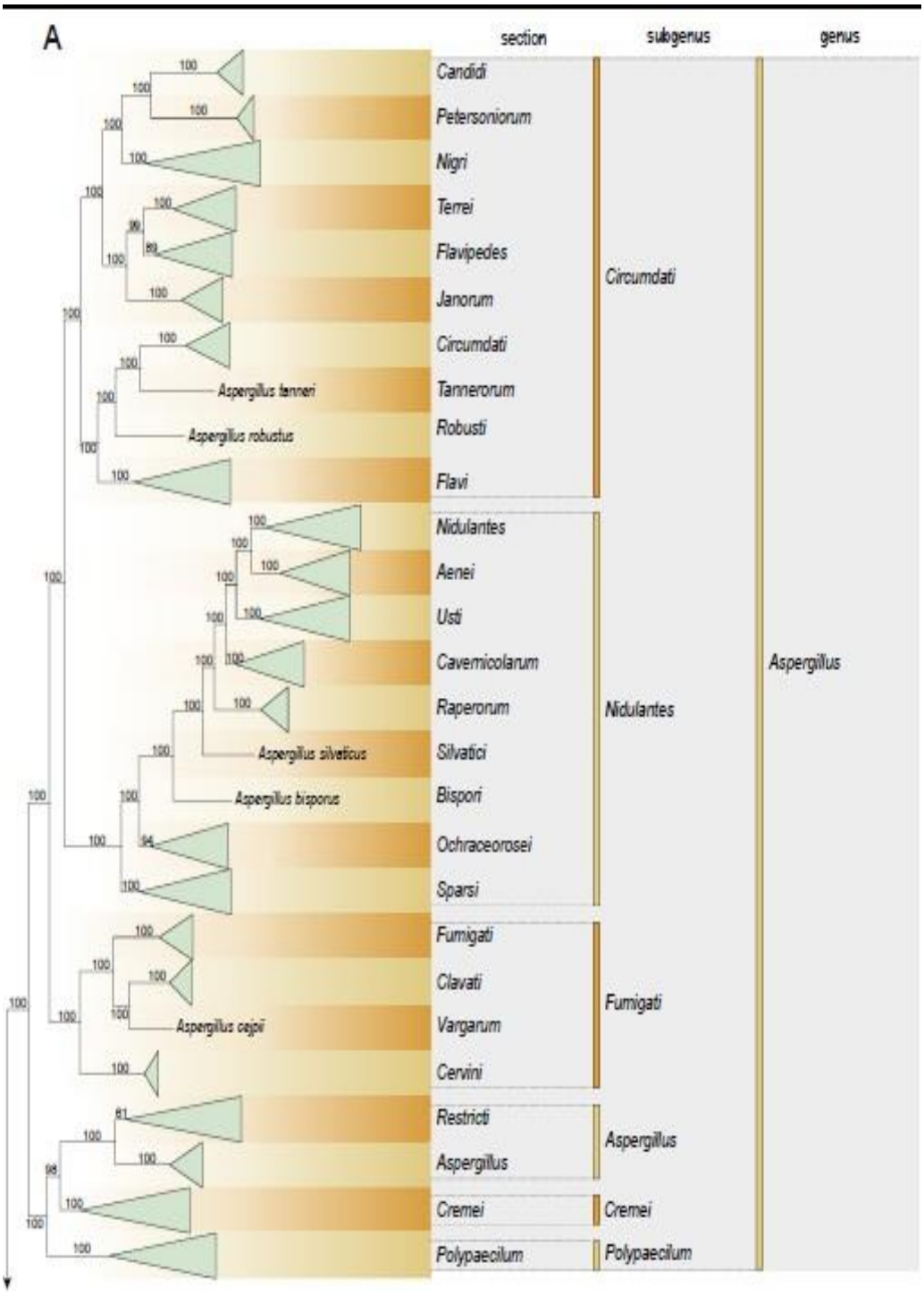


Figura 2. Filogenia combinada usando nove loci (RPB1, RPB2, Cct8, Tsr1, CaM, BenA, SSU, LSU, ITS). No filograma são mostrados os subgêneros e seções do gênero *Aspergillus* (Houbraken et al., 2020).

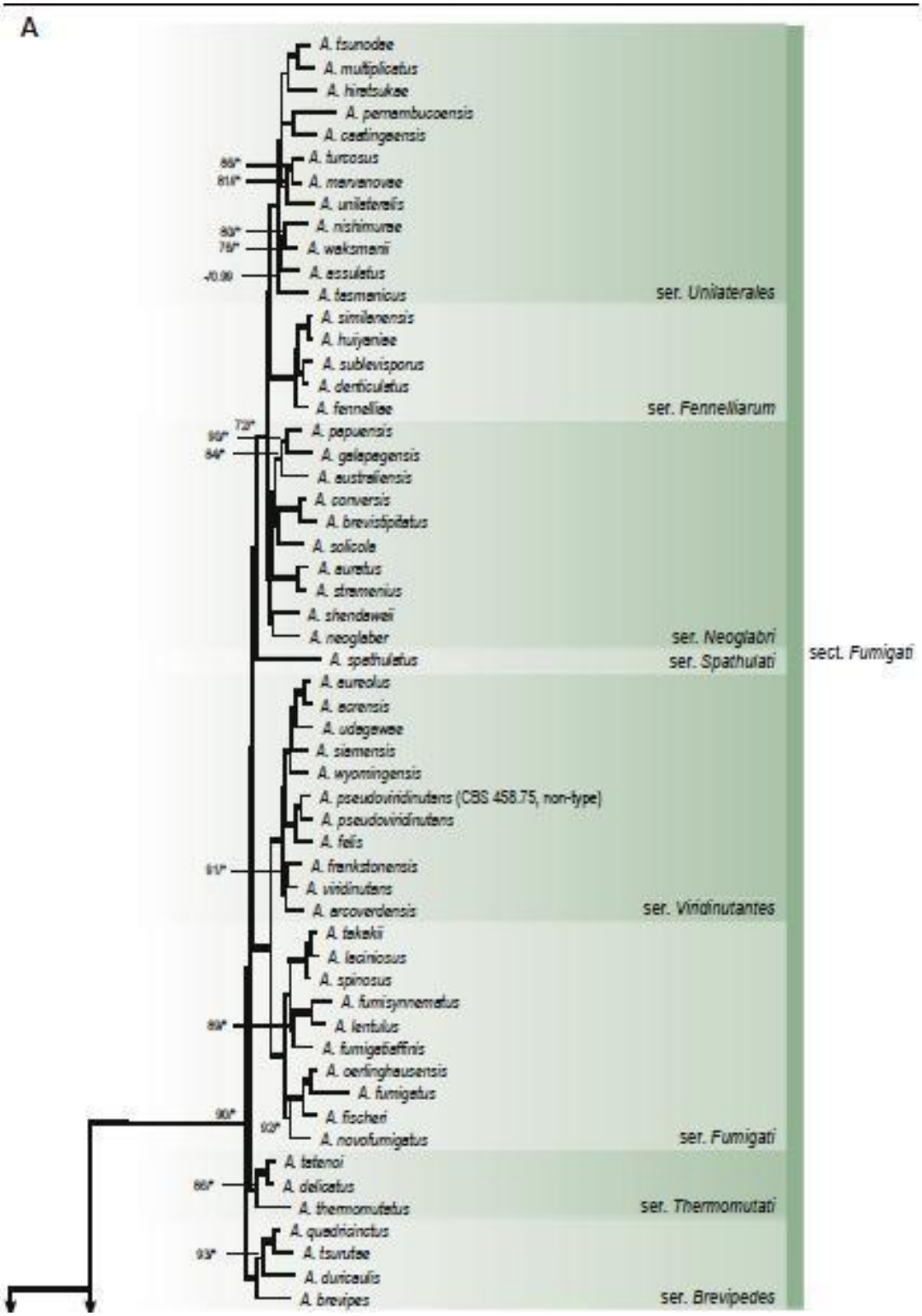


Figura 3. Filogenia combinada para BenA, CaM e RPB2, os conjuntos de dados mostram a relação filogenética de espécies e séries na seção Fumigati (Houbraken et al., 2020).

Aspergillus lentulus era considerado uma espécie irmã de *A. fumigatus*, mas considerando o perfil dos seus metabólitos secundários mostrou ser muito diferente de *A. fumigatus* (Larsen et al., 2007; Tamiya et al., 2015). As espécies *A. pseudofelis*, *A. parafelis* e *A. pseudoviridinutans* não foram ainda examinadas extensivamente, sob ponto de vista químico, mas são fenotipicamente e morfologicamente muito próximas às espécies *A. felis* e podem ser, realmente, espécies irmãs sem grandes diferenças fenotípicas (Samson et al., 2007; Sugui et al., 2014; Frisvad, 2016).

A espécie *A. fumigatus,* descrita pela primeira vez em 1863 pelo médico Georg W. Frenesius, é a espécie com maior incidência em amostras biológicas. O termo *Fumigatus* é derivado do latim ‑fumigave‖, que significa fumaça referindo-se à cor do micélio cinza-azulado esfumaçado. *A. fumigatus* é termotolerante e cresce a temperaturas entre 15ºC a 53ºC. Esta característica pode justificar sua capacidade de adaptação ao hospedeiro animal, sendo um mecanismo de sobrevivência que permite colonização de ambientes extremos, inibição de crescimento de outras espécies ou gêneros de fungos (Bhabhra & Askew, 2005; Martins et al., 2005). Pilhas de compostagem, em processo de auto aquecimento, são importantes fontes ambientais de *A. fumigatus* devido à sua forte termotolerância. Um estudo encontrou 100.000 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de peso seco de composto (Anastasi et al., 2005; Chung, 2013), pilhas de compostagem de folhas e galhos podem ser fontes de muitas e puras culturas de *A. fumigatus* (Kwon-Chung, 1992, 2013).

A termotolerância em *A. fumigatus* é ainda mais marcante nos ascósporos, propágulos formados no ciclo sexual. Os ascósporos de *A. fumigatus* são protegidos por uma parede grossa, em comparação às outras espécies de *Aspergillus* e podem germinar mesmo depois de exposto a temperaturas de 70ºC por 30 minutos. Os conídios de *A. fumigatus* também podem sobreviver a longos períodos de desidratação. *Aspergillus fumigatus* é equipado para sobreviver e se propagar, com êxito, em ampla gama de condições ambientais na maior parte do mundo e pode ser isolado de grande variedade de substratos, ao longo do ano. Apesar de ter um

crescimento ideal à 37ºC sob pH 3,7 a 7,6, pode ser isolado em qualquer lugar onde vegetação em decomposição e solo alcançarem temperaturas entre 12ºC e 65ºC sob pH 2,1 a 8,8 (Jensen, 1931; Latgé, 1999; Sugui et al., 2011; Kwon-Chung, 2013).

Aspergillus fumigatus é um dos fungos dominantes em jardins e solos de estufas compreendendo 35% a 70% do total do número de formação de colônias fúngicas. É um eficiente reciclador na natureza, possuí um metabolismo versátil que atende a sua necessidade nutricional em diferentes condições ambientais. A presença de numerosas glicosil hidrolases e um grupo de proteinases extracelular no genoma do *A. fumigatus* atestam a habilidade de crescer, pela degradação de polissacarídeos da parede celular, em plantas e adquirir fontes de nitrogênio disponibilizado pela degradação de substratos protéicos (Tekaia and Latge, 2005; Abad et al., 2010; Gibbons et al., 2012; Kwon-Chung, 2013).

As colônias de *A. fumigatus*, geralmente, possuem aspecto aveludado com coloração cinza-azulada ou cinza-esverdeada, podendo ocorrer produção ou ausência de pigmento em algumas amostras. Os conidióforos de *A. fumigatus* são hialinos, de parede lisa, com vesícula piriforme. As cabeças conidiais são colunares, unisseriadas produzidas por uma fila única de fiálides. Os conídios do *A. fumigatus* são globosos ou subglobosos com um diâmetro de 2,0-3,0µm, com extremos de 3,5 µm, tamanho adequado para passar pela depuração da mucosa ciliada e alcançar o trato respiratório inferior. Um adulto pode inalar mais de 100 conídios de *A. fumigatus,* diariamente, de acordo com estimativa da concentração conidial em ambientes interiores e exteriores (1 a 100 conídios/m^3) (Brakhage, 2002; Martins et al., 2005).

As seguintes características tornam *A. fumigatus* um patógeno ubíquo: sobreviver e crescer em ampla variedade de condições ambientais, dispersão eficiente no ar, características físicas do conídio que permitem alcançar as vias áereas e rápida adaptação ao ambiente do hospedeiro (Latge, 1999; Abad et al., 2010; Kwon-Chung, 2013).

As características físicas e químicas do conídio contribuem na instalação das infecções do trato respiratório. Esporos fúngicos fazem parte de significativa proporção da massa de partículas aerolisadas no ambiente em que o trato respiratório humano está exposto diariamente. Existem vários tamanhos de esporos fúngicos no ar, esporos com 5,0 µm de diâmetro são muito grandes para alcançar as vias aéreas inferiores onde as infecções sistêmicas, em regra, são iniciadas (Cohen et al., 2011). Os conídios de *A. fumigatus* são dispersos com mais eficiência no ar, do que outros fungos filamentosos. Uma pequena corrente de ar pode causar a dispersão dos conídios devido a sua notável hidrofobia; os conídios de coloração azul-esverdeado são protegidos da radiação ultravioleta no ar, pelo acúmulo de melanina 1,8-dihidroxinaftaleno. A melanina na parede celular do conídio oferece proteção contra espécies reativas de oxigênio, enquanto também pode possibilitar a resistência à lise celular pelas células do hospedeiro (Tsai et al., 1999; Brakhage, 2002, 2005). Além disso, a superfície do conídio do *A. fumigatus* contém resíduos de ácido siálico com carga negativa mais expostos do que em outras espécies de *Aspergillus;* o ácido siálico auxilia, parcialmente, a adesão às proteínas da lâmina basal do hospedeiro e, dessa forma, o conídio de *A. fumigatus* adere ao epitélio das vias áereas e alveolares com mais eficiência que outras espécies de fungos com conídios de tamanhos similares (Wasylnka, 2001). O conídio de *A. fumigatus* germina e se adapta, rapidamente, ao ambiente do hospedeiro imunocomprometido; o conídio que alcança alvéolos é incapaz de suportar a resposta imune de hospedeiros imunocompetentes, devido a falta de fatores especializados de virulência (Tekaia, 2005). Pacientes submetidos a transplantes, quimioterapia ou doença granulomatosa crônica (DGC) estão em condições de alto risco de infecção. O conídio inalado germina e cresce rapidamente a 37ºC, temperatura corporal dos mamíferos, e cada conídio aumenta de volume e rompe a camada hidrofóbica em 4 horas para formar hifa curta (McDonagh et al., 2008). Durante esse curto período de crescimento, o conídio do *A. fumigatus* responde ao estresse imposto pelo ambiente do hospedeiro utilizando um programa de expressão gênica altamente coordenado que

habilita a adaptação a limitação de ferro, privação de nitrogênio, glicose, estresse alcalino e outras condições desfavoráveis. Uma das características durante o início da infecção em cobaias é a ativação da biosíntese de gliotoxina, uma vez que, esta substância é imunossupressora, além de antimicrobiana de amplo espectro, que pode estar relacionada à adaptação ao ambiente do hospedeiro (McDonagh et al., 2008; Sugui et al., 2007). *A. fumigatus* está equipado para sobreviver em diversas condições desfavoráveis e o organismo de um hospedeiro imunodeficiente é uma condição no qual pode se adaptar com sucesso (Kwon-Chung, 2013).

A ampla distribuição de *A. fumigatus* na natureza pode ser devido à presença de sistema de defesa bem-sucedido com produção de metabólitos secundários e bombas de efluxo. O genoma do *A. fumigatus* contém 22 grupos de genes ligados ao metabolismo secundário e 16 diferentes metabólitos secundários foram identificados, incluindo gliotoxina (Gibbons et al., 2012; Frisvad and Samson, 1990; Sugui et al., 2007).

As sequências completas do genoma estão disponíveis para *A. fumigatus*. O tamanho do genoma está entre 29 e 37 Mb, e a genômica comparativa tem mostrado uma variação extensa entre espécies, mas baixos níveis de diversidade genética entre estirpes de *A. fumigatus* especulativamente devido à sua estrutura de população em grande parte clonal. O genoma do *A. fumigatus* é dividido em oito cromossomos, cada um entre 1,8 - 4,9 Mb de tamanho, e existem 9.632 genes codificadores de proteínas, a maioria com função desconhecida (Pringle et al., 2005; Nierman et al., 2005).

O genoma do *A. fumigatus* também é rico em enzimas específicas como catalases, superóxido dismutases e glutationas transferases para desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (Abad et al., 2010; Burns et al., 2005). Todas essas características auxíliam *A. fumigatus* a sobreviver e se propagar em condições desfavoráveis a ampla gama de outros organismos ambientais (Kwon-Chung, 2013).

1.2 Aspergilose e tratamento

Fungos do gênero *Aspergillus,* esporadicamente, são patogênicos em hospedeiros saudáveis imunocompetentes. O diagnóstico preciso da aspergilose é difícil, pois os sintomas clínicos não são específicos e podem ser confundidos com outras infecções, além do fato de que a ocorrência *Aspergillus* em cultura, nem sempre identifica vigência de infecção, o que pode justificar as altas taxas de mortalidade (Dimopoulos et al, 2010). Com novos métodos diagnósticos, por biomarcadores e métodos de imagem, ao lado de novas estratégias terapêuticas, as taxas de mortalidade reduziram chegando a 43% em alguns estudos. Imagens tomográficas computadorizadas de alta resolução e provas sorológicas para detecção de anticorpos e antígenos, considerados como biomarcadores, no soro quanto no lavado broncoalveolar, galactomanana, β-1,3-D-glucana, metabólitos e ácidos nucleicos específicos dos fungos são ferramentas diagnósticas complementares aos métodos tradicionais de exame direto, histologia e cultura (De Pauw et al, 2008; Neofytos et al, 2009; Nucci et al, 2013). Biomarcadores otimizam o diagnóstico, mas podem gerar resultados falsos-positivos e falsos-negativos, sendo necessário a combinação de sinais clínicos e isolamento do agente em cultura, para comprovar a infecção (Murray et al, 2006; Neofytos et al, 2013; Maertens et al, 2009). A galactomanana e DNA no soro de pacientes são os biomarcadores mais eficientes para aspergilose, mas ainda com baixa especificidade e sensibilidade nos testes devido à presença de biomarcadores no meio ambiente, alimentos, ar inalado, produtos farmacêuticos e instrumentos hospitalares (Vergidis et al, 2014; Millon et al, 2010; Harrison et al, 2010).

O aumento de pacientes submetidos a transplantes e tratamentos com capacidade de imunodepressão, como quimioterapia, elevaram a probabilidade de infecção fúngica e ocasionaram introdução de profilaxia universal à base de fluconazol para diminuir mortalidade, em sua maior parte, por infecções invasivas por *Candida* spp.; apesar da diminuição dos casos de candidíase, o espectro de ação do fluconazol não inclui *Aspergillus*

spp. facilitando para a aspergilose ser considerada uma infecção emergente (Goodman et al., 1992; Marr et al., 2000; Nucci et al., 2006; Steinbach et al., 2012; Neofytos et al., 2013, Jiang et al, 2013).

As taxas de mortalidade em casos de aspergilose invasiva (AI) são altas, podendo ser 40% nos 3 primeiros meses e dependem do estado imunológico do paciente, chegando em 38% em pacientes com leucemia mieloide crônica, 50% a 60% em casos de transplante de órgãos sólidos e 70% a 85% em outros pacientes imunocomprometidos (Denning et al, 1996; Lin et al, 2001; Lass-Florl et al, 2005; Pagano et al, 2010). O risco de infecção fúngica grave com alta mortalidade ocorre, de fato, em pacientes imunodeprimidos, representados por portadores de infecção avançada por HIV, neutropenia prolongada, imunodeficiência primária, transplantes de órgãos sólidos e de células tronco hematopoiéticas (Samarokoon e Soubani, 2008). Aspergilose invasiva é observada, também, em pacientes críticos sem imunosupressão aparente em unidades de tratamento intensivo e em casos de pacientes com malignidade hematológica aguda, doença granulomatosa crônica, síndrome mielodisplástica, doenças ligadas a falhas na medula óssea como anemia aplástica, recidiva de leucemia aguda, alcoolismo, diabetes *mellitus*, terapia de imunossupressão, infecção por citomegalovírus, influenza, tratamentos com altas doses de corticosteroides sistêmicos e respiração mecânica prolongada (Patterson et al., 2016). Outras formas de aspergilose incluem a pulmonar crônica (APC) que ocorre em pacientes imunocompetentes e vem sendo considerada um dos principais problemas globais de saúde, estimando-se prevalência de 3 milhões de casos mundiais. A forma mais frequente é a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e estima-se que a doença afete mais de 4 milhões de adultos (Denning et al., 2011a).

O grau de risco do paciente e a epidemiologia local são a base da abordagem terapêutica. Para um tratamento adequado é fundamental ferramentas diagnósticas adequadas e conhecimento sobre a multiplicidade dos fatores de risco (Lothary, 2011; Lopez-Medrano, 2016; Veirweij, 2016a; Alanio, 2017). Atualmente existem três principais famílias de antifúngicos

utilizados no tratamento clínico de infecções fúngicas invasivas e disponíveis para o tratamento da aspergilose. Os polienos, os azóis, e as equinocandinas (Sanglard, 2016; Alastruey-Izquierdo et al., 2015; Baddley et al, 2013; Chandrasekar, 2010; Herbrecht et al., 2004).

Os polienos são uma classe de antifúngicos representados pela anfotericina B e pela nistatina. A anfotericina B é pouco solúvel em água e não é absorvida pela via de administração intramuscular ou oral. A forma convencional de ser administrada é por via intravenosa no tratamento de infeções fúngicas sistêmicas (Murray et al, 2006; Scaglione, 2009). A anfotericina B é considerada o antifúngico mais eficaz para o tratamento da aspergilose invasiva, apresentando uma atividade clínica útil à semelhança da caspofungina e dos azóis, no tratamento primário da aspergilose invasiva. Também é utilizada no tratamento de diversas outras infeções fúngicas. Este antifúngico demonstra elevada atividade contra várias espécies de fungos. A maioria de *A. fumigatus* são inibidos por concentrações de 0,03 a 1 mg/mL de anfotericina B (Scaglione, 2009; Warris, 2015; Qiao, 2008). Resistência primária à anfotericina B é rara, mas foi identificada em *A. terreus*, em alguns isolados de *A. flavus* e *A. ustus* (Gonçalves et al., 2013 e 2016; Koss et al., 2002; Azzola et al., 2004). O tratamento com anfotericina B é limitado pela sua toxicidade a nível renal. Esta limitação levou ao desenvolvimento de formulações lipídicas do fármaco, com o objetivo de reduzir a toxicidade. As formulações lipídicas da anfotericina B aumentam a eficácia e diminuem os efeitos colaterais como a nefrotoxicidade. São recomendadas principalmente no tratamento de infeções fúngicas que não responderam à anfotericina B ou em pessoas com função renal deficiente (Murray et al, 2006).

Na prática médica, os azóis, mais especificamente os triazóis, são os antifúngicos mais utilizados para as micoses invasivas. Possuem um largo espectro de atividade *in vitro,* sendo agentes terapêuticos importantes para o tratamento sistémico e de prevenção de infecções fúngicas graves, como a aspergilose. Os triazóis apresentam uma toxicidade, significativamente menor quando comparados com a anfotericina B (Sanglard, 2016; Espinel-

Ingroff et al., 2010; Warris, 2015; Scaglione, 2009). Os antifúngicos de 1ª escolha utilizados no tratamento de aspergilose invasiva são os triazóis itraconazol, posaconazol e voriconazol (Figura 4), milhares de pacientes são tratados com esses fármacos, no mundo todo, e dependem da eficácia desses medicamentos para sua sobrevida. (Van der Linden et al, 2013; Fortún et al., 2012).

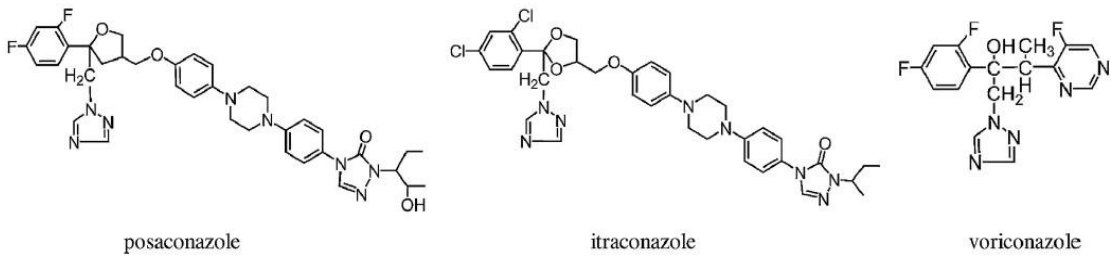


Figura 4. Estrutura molecular de triazóis (Ren et al., 2017).

O itraconazol atua contra um largo espectro de fungos, incluindo *Aspergillus* spp., que podem causar infeções superficiais e sistêmicas, sendo eficaz em pacientes imunocomprometidos menos graves, transplantados de órgãos, pacientes com anemias e pacientes com HIV e casos de falha no tratamento com anfotericina B. O itraconazol liga-se fortemente às proteínas plasmáticas e tem atividade fungicida contra *Aspergillus* spp, sendo considerado um agente de segunda linha no tratamento da aspergilose invasiva (Latgé, 1999; Murray et al., 2006; Scaglione, 2009).

O voriconazol exerce uma ação antifúngica de largo espectro, sendo utilizado no tratamento de infeções graves e é considerado o antifúngico de primeira linha para o tratamento de aspergilose invasiva. Vários estudos demonstram que a maioria das cepas de *Aspergillus* spp. são totalmente suscetíveis ao voriconazol. Este antifúngico possui uma atividade antifúngica de largo espectro *in vitro* contra: *A. fumigatus, A. flavus, A. terreus, A. nidulans* e *A. ustus,* sendo indicado quando há falha no tratamento com a anfotericina B, e para a profilaxia de infecções fúngicas invasivas (Scaglione, 2009; Guinea et al., 2008).

O posaconazol demonstra atividade fungistática contra *Aspergillus* spp. resistentes a outros azóis e a anfotericina B. O posaconazol é um agente antifúngico oral com um amplo espectro de ação e com mellhor eficácia clínica do que os outros antifúngicos disponíveis. É menos nefrotóxico e, provavelmente, menos propenso a interações medicamentosas (Howard et al., 2011; Zoller et al., 2010).

A anfotericina B e o itraconazol podem ser utilizados, também, como profilaxia em pacientes com fator de risco alto (Saballs-Radresa et al., 2000; Kontoyiannis et al., 2005). A combinação é indicada pois estes fármacos têm diferentes mecanismos de ação com distintos locais alvo na célula fúngica (Chandrasekar, 2010). No entanto, a profilaxia, pode selecionar cepas resistentes e aumentar o risco de infecção dos pacientes, criando um risco individual (Verweij et al., 2016; Alanio, 2017).

Apesar de *A. fumigatus* geralmente ser, na clínica, suscetível aos antifúngicos azólicos foi relatado aumento da resistência adquirida nos últimos anos (Camps et al, 2012a; Verweij et al, 2009; Snelders et al., 2008). A resistência clínica na aspergilose aos antifúngicos, em particular, em *A. fumigatus* é um fator de risco emergente no tratamento de pacientes com infecções agudas e crônicas. As taxas de mortalidade aumentam, significativamente, e alcançam 88% quando o agente apresenta resistência verificada em laboratório. A infecção por cepa resistente, portanto, podem tornar o tratamento ineficiente com um ou todos os triazóis (Verweij et al, 2016; Denning & Bowyer, 2013). Casos de resistência adquirida vêm sendo descritos exclusivamente em pacientes com cavidade pulmonar ou aspergiloma (Camps et al., 2012; Howard et al., 2013).

Nas resistências aos antifúngicos envolvendo *A. fumigatus* vem sendo observada a presença de resistência primária ou intrínseca aos azóis e outros agentes antifúngicos e a resistência secundária ou adquirida aos azóis (Gonçalves et al., 2016). Uma das rotas de seleção de cepas resistentes é através da longa exposição aos azóis em pacientes com formas crônicas de aspergilose. Nesses casos alguns pesquisadores sugerem que há evidência da evolução fúngica no pulmão, desde que cepas

com mesmo genótipo e diferentes perfis de suscetibilidade foram detectadas. Resistência aos azóis tem sido comum nessa população de pacientes, e os mecanismos de resistência são bastante variados (Verweij et al., 2015; Mortensen et al., 2011; Howard et al., 2011; Howard et al., 2009).

1.2.1 Modo de ação e determinação de atividade de fármacos

A anfotericina B tem a capacidade de se ligar à membrana plasmática do fungo, a qual é constituída pelo ergosterol necessário para manter a integridade da membrana. O ergosterol contribui para uma variedade de funções celulares, incluindo a fluidez e integridade da membrana e a função adequada de enzimas ligadas à membrana, tal como as proteínas associadas com o transporte de nutrientes e a síntese de quitina (Latgé, 2009). A anfotericina B cria canais pelos quais atravessam íons de potássio, resultando assim num aumento da permeabilidade aos cátions e na interrupção do gradiente de prótons, inibindo assim as bombas de prótons ATPase. Isto causa esgotamento das reservas energéticas celulares, o que resulta num aumento da fragilidade da membrana podendo causar danos oxidativos na mesma (Latgé, 1999; Qiao, 2008; Sanglard, 2016). As resistências a esta classe de antifúngicos são extremamente raras no gênero *Aspergillus.* A maioria dos isolados de *A. terreus* são resistentes à anfotericina B, *in vitro*, não sendo claros os mecanismos da resistência intrínseca de *A. terreus* a este antifúngico. Foi recentemente observada a resistência à anfotericina B em *A. fumigatus*, mas é rara (Latgé, 1999; Qiao, 2008).

As equinocandinas, como exemplo a caspofungina, pertencem a uma classe de antifúngicos recente, atuando através de um novo mecanismo que inibe um componente essencial na parede celular dos fungos, através da inibição da ß-glucana, componente essencial da parede celular de *Aspergillus* spp. Como a ß-glucana não está presente nas células dos mamíferos, a atividade da caspofungina revela-se especifica para fungos,

razão pela qual esta classe de antifúngicos revelam um perfil excelente em termos de tolerância. As equinocandinas vieram resolver alguns dos problemas relacionados com terapias antifúngicas, em particular com azóis, dada a necessidade de ajustamento da dose administrada consoante a idade, a função renal e hepática (Collier, 1998; Sanglard, 2016; Scaglione, 2009).

O mecanismo de ação dos triazóis interfere com a biossíntese do ergosterol presente na membrana dos fungos, através da inibição da enzima do citocromo P-450 (CYP) a 14-*α*-desmetilase, codificada pelo gene *cyp*51A, que catalisa a biossíntese do ergosterol, convertendo o lanosterol em ergosterol, levando à acumulação intracelular de 14-α-metilesteróis. A inibição do citocromo impede a síntese do ergosterol nas membranas dos fungos, alterando a via de síntese e acumulação de fosfolipídeos e ácidos graxos insaturados dentro da célula fúngica, prejudicando a fluidez da membrana celular. A inibição da síntese de ergosterol resulta na inibição do crescimento da célula fúngica, efeito fungistático, ou na morte celular, efeito fungicida. Este mecanismo é específico porque estes antifúngicos têm maior afinidade com as enzimas da célula fúngica do que para as enzimas do citocromo P-450 humanas. Os azóis interagem e inibem as proteínas do *cyp*51, que por sua vez reduzem o teor de ergosterol e prejudicam o metabolismo de esterol nas células, resultando em um efeito fungistático em baixas concentrações de azóis ou fúngicida em altas concentrações de azóis (Murray et al., 2006; Alcazar-Fuolli et al., 2008; Scaglione, 2009; Chandrasekar, 2010; Espinel-Ingroff et al., 2010; Abdolrasouli et al., 2015; Warrilow et al., 2015).

O primeiro caso publicado de isolados de *A. fumigatus* resistentes ao itraconazol ocorreu em 1979. Apesar de ser incomum, a resistência aos azóis em *A. fumigatus* é cada vez mais importante. O uso crescente de antifúngicos tem provocado uma pressão seletiva sobre as diferentes espécies e cepas de fungos, levando ao aparecimento de resistências: as espécies/cepas sensíveis vão sendo substituídas por cepas resistentes, havendo assim transição na epidemiologia das infeções fúngicas, levando a

desenvolvimento de resistências secundárias em várias espécies/cepas (Latgé, 1999; Qiao, 2008; Alastruey-Izquierdo et al., 2015).

Nos últimos anos casos de resistência clínica têm aumentado, tornando-se um problema de saúde pública, em paralelo à demonstração *in vitro* da resistência, tanto em isolados clínicos, quanto em ambientais de *A. fumigatus* em diversas partes do mundo (Espinel-Ingroff et al., 2010; Hajjeh, 2001; Azevedo et al., 2015; Verweij et al., 2009). As resistências foram descritas para praticamente todos os antifúngicos, azólicos, incluindo itraconazol, posaconazol, voriconazol e isavuconazol, em várias espécies de *Aspergillus*. Novos padrões de resistência vêm sendo observados, incluindo o aparecimento de resistência simultânea a diferentes classes de antifúngicos (multirresistência) ou resistência cruzada, definida como aquela que ocorre frente a diferentes moléculas antifúngicas pertencentes à mesma classe, p.ex. *Aspergillus* spp. resistentes a vários azóis (Collier, 1998; Sanglard, 2016). O fenômeno de multirresistência leva à sérias consequências no manejo de infecções fúngicas. A resistência cruzada tendo sido demonstrada, *in vitro* e *in vivo,* entre itraconazol e posaconazol, que são estruturalmente semelhantes, sendo menos frequentes entre itraconazol e voriconazol que são estruturalmente diferentes (Qiao et al., 2008; Verweij et al., 2009).

Foram descritas taxas de resistência a triazóis de 3,2%, entre cepas da seção Fumigati; entre os isolados resistentes, 78% eram *A. fumigatus sensu stricto*, e 22% eram espécies crípticas *A. udagawae*, *A. thermomutatus*, e *A. lentulus* (Lamoth et al., 2016; Van der Linden et al., 2015). Em 2015, Bastos e colaboradores, descreveram o primeiro caso brasileiro de aspergilose pulmonar invasiva causada por *A. lentulus*, relatando uma cepa resistente a anfotericina B e aos azóis itraconazol e voriconazol. Em outro estudo brasileiro os altos valores de concentração inibitória mínima (MIC) de itraconazol e voriconazol (2 e 16 g/mL, respectivamente) foram observadas para um isolado de *A. thermomutatus* (Nascimento et al., 2003; Negri et al., 2014; Bastos et al., 2015).

Considerando que as diferentes espécies podem apresentar perfis de suscetibilidade distintos, a identificação de espécies se tornou um importante preditor do resultado clínico (Nascimento et al., 2003; Negri et al., 2014; Bastos et al., 2015). Dada a emergência de resistências aos compostos azólicos em *Aspergillus* spp., bem como os distintos perfis de suscetibilidade apresentado por diferentes espécies crípticas dentro da mesma seção, torna-se essencial efetuar a determinação da suscetibilidade aos antifúngicos. Deste modo, determinar MIC desses compostos, em isolados clínicos e ambientais, por métodos adequados é necessário para contribuir com dados epidemiológicos, além de melhorar os resultados nos tratamentos clínicos (Verweij et al., 2009a). Nas últimas décadas, testes de suscetibilidade a antifúngicos foram normatizados e, atualmente, aplicam-se a laboratórios de microbiologia. Métodos de referência norte americanos e europeus foram desenvolvidos, assim como os equivalentes sistemas comerciais, estes últimos mais apropriados a laboratórios clínicos. Além disso, foram realizados muitos estudos sobre a correlação de resultados obtidos *in vitro* com o desfecho clínico de pacientes, mas para fungos filamentosos esse objetivo ainda não foi atingido. Com base em valores específicos de MIC os fungos podem ser atribuídos às categorias clínicas "suscetível", "intermediário ou suscetível, aumentando exposição" e "resistente". Um microrganismo é classificado como ‑suscetível‖ (S), quando existe uma elevada probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dosagem padrão do agente. Quando existe uma alta probabilidade de sucesso terapêutico devido ao aumento da exposição ao agente ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção o microrganismo é classificado como "intermediário" ou "suscetível, aumentando exposição" (I) e quando há alta probabilidade de falha terapêutica, mesmo quando há um aumento da exposição, o microrganismo é classificado como –resistente‖ (R) (Arendrup et al., 2020).

Os *breakpoints* podem ser alterados devido a mudanças nas circunstâncias (por exemplo, mudanças nas dosagens de medicamentos comumente usadas) ou quando surgem dados/conhecimentos adicionais).

O EUCAST estabeleceu *breakpoints* para alguns antifúngicos azólicos e anfotericina B contra espécies de *Aspergillus*, esses *breakpoints* são válidos apenas ao usar o método EUCAST de TSA (Tabela 1) (Hope et al., 2013; Arendrup et al., 2020). O CLSI aprovou seu primeiro *breakpoint* para fungos filamentosos na reunião de 26 de janeiro de 2019 do Subcomitê de Teste de Susceptibilidade Antifúngica. O *breakpoint* a susceptibilidade de *A. fumigatus* ao voriconazol é ≤ 0,5 µg/ml, e o *breakpoint* da resistência é ≥ 2 µg/ml. O CLSI não tem *breakpoints* para outras espécies de *Aspergillus* ou outros fungos filamentosos. Embora existam poucos *breakpoints* de *Aspergillus*, os resultados de MIC, também, podem ser compilados por espécie e anfifúngico e apresentados em gráficos de modo a elaborar curvas de distribuição. Estas curvas permitem o cálculo de pontos de corte epidemiológicos (*epidemiologic cutoff values*, ECV) que representam uma ferramenta essencial para separação de isolados selvagens (*wild-type*, WT) e não-selvagens (N-WT), estes últimos com probabilidade de apresentarem mecanismos de resistência. Os valores de corte epidemiológicos (ECVs ou ECOFFs), para várias espécies de *Aspergillus* e combinações de antifúngicos, foram desenvolvidos pelo EUCAST e podem ser utilizados como critérios interpretativos, o CLSI ainda não publicou valores de ECVs para *Aspergillus* spp. (Tabela 2) (Alastruey-Izquierdo et al., 2015; Lockhart et al., 2020).

Os ECVs permitem classificar um isolado de fungo filamentoso como tipo selvagem (*wild-type* - WT), para uma espécie, pela ausência de mecanismos de resistência adquiridos e mutacionais fenotipicamente detectáveis ao farmáco em questão e é definido como (*non-wild-type* - NWT) pela presença de mecanismos de resistência adquiridos ou mutacionais detectáveis fenotipicamente ao farmáco em questão (Arendrup et al., 2020).

Os critérios utilizados para estabelecer ECVs para os fungos filamentosos são baseados em cálculos estatísticos arbitrários e os valores notificados para *A. fumigatus* tem base na distribuição de frequência de MICs para grandes coleções de isolados clínicos e ambientais (Meletiadis et al., 2011). Desse modo, o conhecimento da epidemiologia local e global da

resistência pode ser avaliada e monitorada ao longo do tempo (Alastruey-Izquierdo et al., 2015).

Pontos de corte epidemiológicos, utilizando-se a metodologia de microdiluição (CLSI-BMD) para três antifúngicos triazólicos, foram propostos para *A. fumigatus*: itraconazol (1mg/L), voriconazol (1mg/L) e posaconazol (0,25mg/L). Para 637 isolados, MICs acima dos ECVs (não WT), respectivamente de itraconazol, voriconazol e posaconazol, foram observados em 0,2%, 0,2% e 0,8% (Pfaller et al., 2009). Em outro estudo com grande número de isolados (n=2778) as taxas de não WT foram maiores: 2,6%, 3,1% e 2,2%, respectivamente, para itraconazol, voriconazol e posaconazol (ECV de posaconazol considerado em 0,5mg/L) (Espinel-Ingrof et al., 2010).

Tabela 1. *Breakpoints* clínicos aos antifúngicos e categorias interpretativas para fungos filamentosos através dos padrões de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST, 2020.

		CLSI *breakpoint* (µg/ml)				**EUCAST *breakpoint* (mg/L)**			
Antifúngico	**Espécie**	**S**	**I**	**SDD**	**R**	**S**	**I**	**SDD**	**R**
Voriconazol	*A. fumigatus*	≤ 0,5	—	—	≥ 2	≤ 1	—	—	> 2
Itraconazol	*A. flavus*	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 2
	A. fumigatus	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 2
	A. nidulans	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 2
	A. terreus	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 2
Isavuconazol	*A. fumigatus*	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 1
	A. nidulans	—	—	—	—	≤ 0,25	—	—	> 0,25
	A. terreus	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 1
Posaconazol	*A. fumigatus*	—	—	—	—	≤ 0,125	—	—	> 0,25
	A. terreus	—	—	—	—	≤ 0,125	—	—	> 0,25
Anfotericina B	*A. fumigatus*	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 2
	A. niger	—	—	—	—	≤ 1	—	—	> 2

Os *breakpoints* CLSI e EUCAST são relatados em diferentes unidades. Traços emem representam instâncias em que os *breakpoints* não foram estabelecidos. S, suscetível; I, intermediário; SDD, suscetível dose dependente; R, resistente.

Tabela 2. Valores de corte epidemiológicos aos azóis para *Aspergillus* spp. através dos padrões de microdiluição em caldo do CLSI, 2018 e EUCAST, 2020.

Antifúngico	Espécie	CLSI ECV (µg/ml)	EUCAST ECOFF (mg/L)
Voriconazol	*A. flavus*	2	2
	A. fumigatus	1	1
	A. niger	2	2
	A. terreus	2	2
Itraconazol	*A. flavus*	1	1
	A. fumigatus	1	1
	A. nidulans	—	1
	A. niger	4	4
	A. terreus	2	0,5
Isavuconazol	*A. flavus*	1	2
	A. fumigatus	1	2
	A. nidulans	—	0,25
	A. niger	4	4
	A. terreus	1	1
Posaconazol	*A.flavus*	0,5	—
	A. niger	2	—
	A. terreus	1	—

Traços emem representam situações em que os ECVs não foram estabelecidos

1.2.2 Mecanismos de resistência a fármacos azólicos

Os mecanismos básicos verificados em micro-organismos pouco sensíveis/resistentes a fármacos são: redução da afinidade e interação da proteína alvo do fármaco, super expressão da proteína alvo na célula, degradação do fármaco intra ou extracelular ou, ainda, diminuição da concentração do fármaco, por sistemas de bombas de efluxo ou rotas ainda desconhecidas (Hagiwara et al., 2016).

A. fumigatus possuí alto número de transportadores, em relação aos seus parentes genéticos próximos (Nierman et al., 2005). Apesar de *A.*

fumigatus ser um micro-organismo eucariótico a complexidade da sua composição celular não o impede de desenvolver rapidamente resistência à exposição de antimicrobianos, assim como bactérias patogênicas. Entretanto a transferência horizontal de genes, que é comum nos casos de resistência bacteriana, não é comumente vista nos fungos. Os mecanismos de resistência aos azóis foram elucidados pela identificação de diversas mutações em isolados resistentes de *A. fumigatus*. As mutações detectadas com maior frequência estão relacionadas com a proteína alvo dos azóis codificada pelo gene *cyp*51A, a 14-*α*-desmetilase. *A. fumigatus* também possui o gene *cyp*51B, com 63% de semelhança genética ao *cyp*51A, mas que codifica proteínas diferentes. Mutações, raramente, foram encontradas no gene *cyp*51B e não parecem estar relacionadas à resistência; no entanto, a expressão e super expressão do gene *cyp*51B é observada em isolados clínicos resistentes aos azóis (Martel et al., 2010; Buied et al., 2013). As mutações causam diminuição na afinidade do azol com a enzima-alvo 14-*α*-desmetilase, mas sem alterar a atividade enzimática para produção do ergosterol. Mutações ocasionando a troca de aminoácidos específicos ou a inserção de repetições (34pb, 46pb, 53pb) na região promotora do gene *cyp*51A, têm sido observadas em isolados clínicos de *Aspergillus* spp. resistentes aos azóis (Latgé, 1999; Alastruey-Izquierdo et al., 2015). A substituição de um único aminoácido (G54, G138, G448, M220, P216, F219, Y121, Y431) na proteína formada pelo *cyp*51A pode conferir resistência aos azóis (Figuras 4 e 5) (Mann et al., 2003; Mellado et al., 2004; Howard et al., 2009; Camps et al., 2012a; Krishnan-Natesan et al., 2012; Albarrag et al., 2011; Lescar et al., 2014; Chowhary et al., 2014a).

Recombinações de mutações (TR34/L98H e TR46/Y121F/T289A) são predominantes em isolados de pacientes expostos, ou não, a tratamentos com fármacos azólicos. No entanto, 64% e 71% dos isolados de *A. fumigatus* resistentes a mais de um azol (convencionalmente, denominada resistência cruzada) foram descritos em pacientes com AI que nunca tinham sido expostos a tratamentos com azóis (Chang et al., 2016; Van der Linden et al., 2011; Sanglard, 2016; Van der Linden et al., 2013).

Mecanismo de resitência com repetição em *tandem* de 53 pares de bases no região promotora do *cyp*51A (TR53) não associado a outras mutações pontuais foi relatado em isolado recuperado de um paciente com doença granulomatosa crônica e amostras ambiemtais de solo (Hodiamont et al., 2009; Alvarez-Moreno et al., 2017).

Os mecanismos de resistência em *Aspergillus* são, portanto, caracterizados em regra (90%) por pontos de mutação no gene *cyp*51A. Algumas mutações são responsáveis por resistência a múltiplos azóis e cada grau de resistência pode ter impacto no resultado de pacientes com aspergilose invasiva e doença crônica (Mellado et al., 2001; Denning et al., 2013; Chowdhary et al., 2014a; Lazzarini et al., 2015; Moye-Rowley, 2015).

Em número crescente de isolados resistentes, o mecanismo subjacente permanecia desconhecido até que, recentemente, 2 isolados isogênicos de *A. fumigatus*, ambos com gene *cyp*51A de tipo selvagem, um suscetível e outro resistente, foram analisados por sequenciamento do genoma para identificação da mutação que conferia resistência. Várias mutações potenciais não sinônimas, em regiões codificadoras de proteínas, foram identificadas. Destas, 6 mutações foram estudadas por PCR e sequenciamento Sanger. Apenas uma mutação, no gene HapE, conferiu resistência na progênie, enquanto as outras 5 não se correlacionaram com resistência. As experiências de cruzamento para obtenção da fase sexual mostraram que uma substituição de P88L no fator de transcrição de ligação CCAAT estava conferindo resistência no gene HapE. O potencial da mutação HapE P88L para conferir o fenótipo de resistência foi demonstrado pela clonagem do gene HapE mutado em uma estirpe suscetível aos azóis. Curiosamente, os isolados clínicos de *A. fumigatus* portadores de uma mutação neste *locus* revelaram redução da afinidade desses fármacos. Estudos detalhados relativos ao diagnóstico molecular de resistência são necessários para entender caminhos alternativos e suas implicações em isolados resistentes de *A. fumigatus* (Camps et al., 2012B).

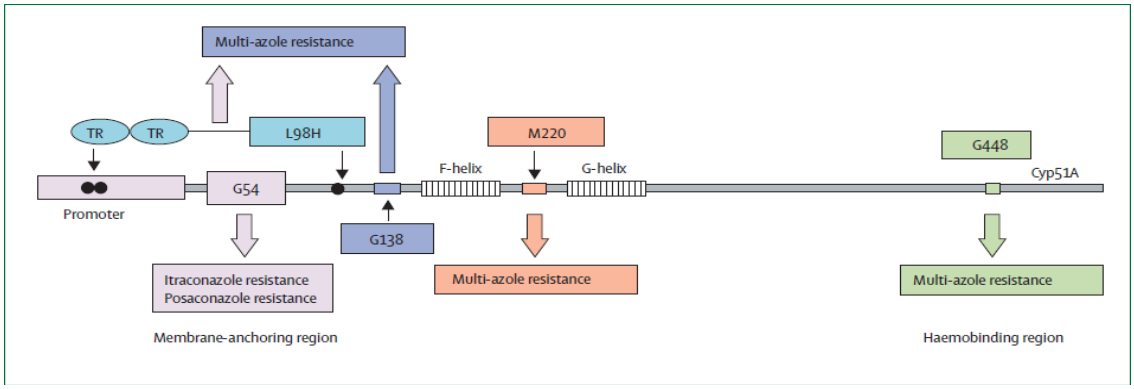


Figura 5. Ilustração do gene cyp51A de *A. fumigatus*, mostrando região promotora, posição de diferentes mutações e seus fenótipos de resistência aos antifúngicos azólicos (Verweij, 2009B)

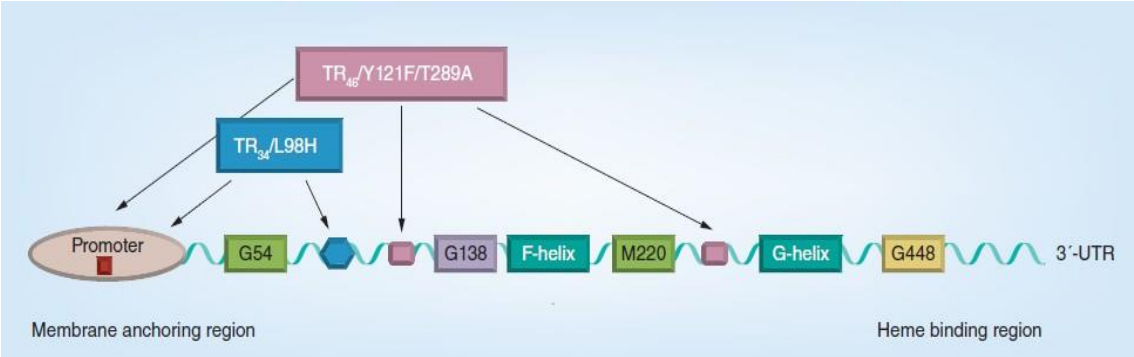


Figura 6. *A. fumigatus* gene *cyp*51A, região promotora e os pontos de mutação que conferem resistência aos antifúngicos azólicos (Chowdhary et al., 2014A)

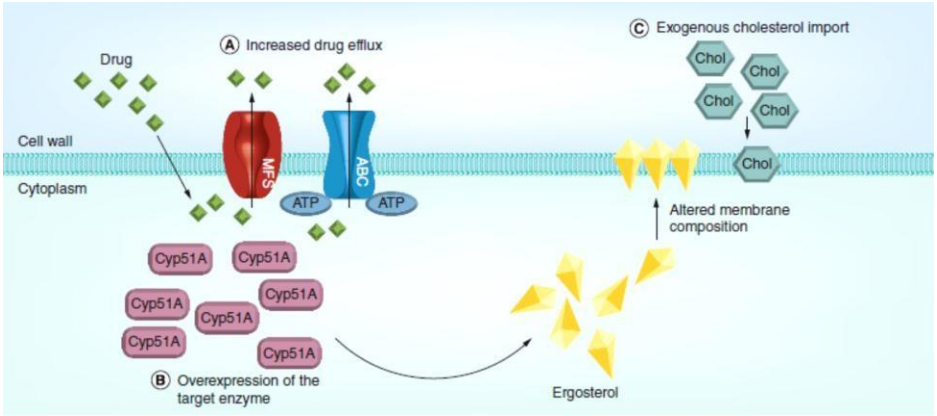


Figura 7. Mecanismo de resistência em *A. fumigatus* devido a (A) aumento do efluxo do fármaco, (B) super expressão da enzima alvo e (C) importação de colesterol exógeno (Chowdhary et al., 2014A)

Ainda que o gene *cyp*51A possa ser considerado o mais frequente ponto de acesso às mutações ligadas à resistência, muitos isolados com fenótipo de resistência aos azóis não apresentavam mutações nesse gene, o que sugeriu a existência de outros mecanismos de resistência. A fim de infectar e colonizar o hospedeiro os fungos precisam superar o acúmulo de toxinas intra celulares, o que é realizado por bombas de efluxo transportadoras tipo ATP-binding cassette (ABC) e transportadoras da principal super família facilitadora (MFS). A super expressão desses transportadores de efluxo já foi bem documentada em leveduras; em *A. fumigatus* contém, ao menos, 49 genes codificando ABC (Lelièvre et al., 2013). Entre eles, 12 genes estão relacionados com a codificação de uma sub-classe de ABC, conhecida por PDR (ABC-G); um desses genes (Cdr1B) já foi identificado como responsável por resistência aos azóis em *A. fumigatus*, por estar super-expresso em isolados resistentes e por sua deleção estar ligada à ocorrência de alta suscetibilidade aos azóis (Coleman & Mylonakis, 2009; Fraczek et al., 2013; Paul et al., 2013).

Outro mecanismo de resistência aos azóis adotado por *A. fumigatus* após a exposição aos triazóis é a incorporação na membrana plasmática de colesterol exógeno compensando o ergosterol depletado pela ação

desses fármacos. Xiong e colaboradores demonstraram *in vitro* atenuação da atividade de itraconazol contra *A. fumigatus* na presença de soro ou colesterol no meio de cultura. As proteínas de ligação são fatores de transcrição ligados à membrana (SREBPs) e identificadas, pela primeira vez, em mamíferos como reguladores do colesterol e metabolismo lipídico (Espenshade, 2006; Espenshade & Hughes, 2007; Xiong et al., 2005).

Importante ressaltar que mutações que levam substituição de um único amino ácido tendem a surgir durante tratamentos prolongados de aspergilose crônica com azóis ou paciente infectado com isolados suscetíveis e resistentes (Mann et al., 2003; Mellado et al., 2004; Howard et al., 2009; Camps et al., 2012a; Krishnan-Natesan et al., 2012; Albarrag et al., 2011; Lescar et al., 2014). Tais condições podem estar presentes em pacientes com aspergiloma em tratamento com azóis, em que dentro da cavidade pulmonar a reprodução assexual do *A. fumigatus* ocorre produzindo muitos conídios, muitos dos quais podem conter mutações que configurem resistência aos azóis. Análises genéticas de culturas de *A. fumigatus,* provindos de pacientes com aspergilose e de biópsias de aspergilomas confirmam que *A. fumigatus* sofre diversas alterações geneticas durante a infecção incluindo aquelas que o permitem desenvolver resistência aos azóis (Camps et al., 2012A). Isto pode refletir no diagnóstico onde colônias com multiplos mecanismos de resistência aos azóis podem estar presentes na cultura, simultaneamente, a colônias suscetíveis aos azóis (Howard et al., 2013).

Um resumo dos mecanismos conhecidos de resistência aos azóis (Figura 7) e, em particular, aqueles descritos para *A. fumigatus* (Figura 8).

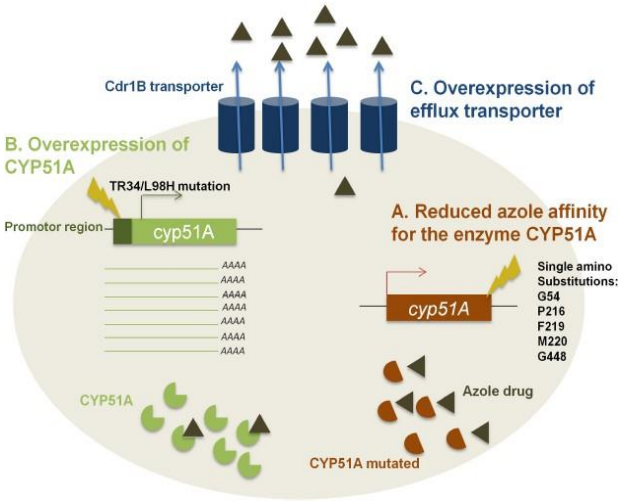


Figura 8. Os três mecanismos de resistência aos medicamentos azólicos. (A) Presença de mutações responsáveis pela substituição causando modificações estruturais da enzima *cyp*51A que conduz à menor afinidade dos azóis. (B) Super expressão do gene *cyp*51A devido à inserção de 34 pb, em sua região promotora, combinada com substituição no codon 98 de leucina por histidina (TR34 / L98H) causando aumento no nível celular de *cyp*51A. (C) Super expressão dos genes que codificam o transportador de efluxo causando redução na acumulação intracelular de fármaco azólico (Berger et al., 2017)

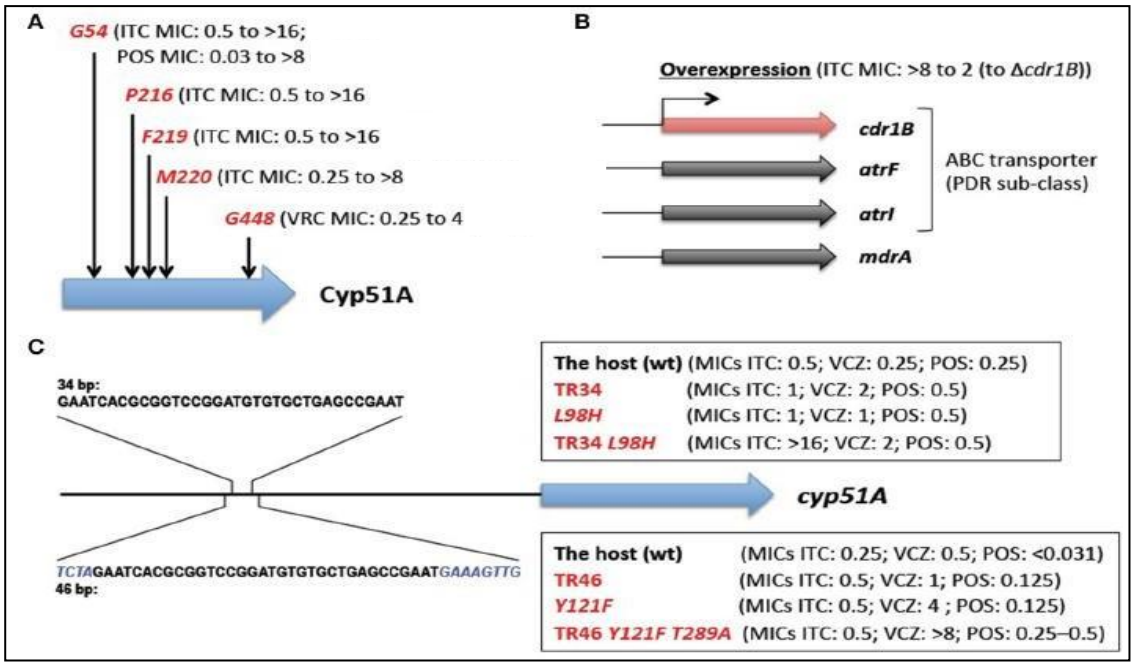


Figura 9. Mecanismos de resistência a azóis em *A. fumigatus*, em que os MICs (mg/L) das cepas mutantes constam entre parênteses. (A) substituições de aminoácidos nos codons (G54, P216, F219, M220 e G448); (B) transportadores ABC de efluxo; (C) seqüências de repetição na região promotora do gene *cyp*51A (Hagiwara et al., 2016)

A super expressão do gene *cyp*51 ocorre, ainda, em isolados de fungos fitopatógenos e presentes no solo, estando também relacionada a inserções na região promotora do gene *cyp*51. As mutações nesse gene são responsáveis por 90% dos casos de resistência e são relacionadas às condições ambientais de longa exposição a fungicidas azólicos (Figura 9) (Becher and Wirsel, 2012; Hamamoto et al., 2000; Hagiwara, 2016). Os mecanismos de resistência em cepas ambientais de *A. fumigatus* também estão relacionados a diferentes substituições recombinantes de aminoácidos no gene *cyp*51A com, ou sem inserção de TR no promotor do gene *cyp*51A (Snelders et al., 2011, 2015). Do mesmo modo como descrito para isolados clínicos resistentes de *Aspergilllus* spp., mutações que ocasionam troca de aminoácidos específicos ou inserção de repetições 34pb, 46pb, 53pb podem ocorrer também em isolados ambientais resistentes aos azóis (Latgé, 1999; Alastruey-Izquierdo et al., 2015).

A maioria das cepas resistentes aos azóis portam a mutação TR34/L98H no gene *cyp*51A, com substituição da leucina códon 98 por histidina (L98H) além da presença de 2 cópias de sequência em *tandem* de 34-bp no gene *cyp*51A resultando em super expressão do gene *cyp*51A (Snelders et al., 2008; Abdolrasouli et al., 2015; Mellado et al., 2007; Van der Linden et al., 2011; Shapiro et al., 2011; Van Ingen et al., 2015).

Os recombinantes que abrigam TR34 e TR46 apresentam aumento da expressão do gene *cyp*51A, se comparados às cepas parentais; quando ocorre apenas TR o efeito é moderado sobre a suscetibilidade aos azóis, com pouca alteração do MIC de itraconazol (de 0,25 a 0,5 para 0,5 a 1mg/L) e MIC de voriconazol (de 0,25 a 0,5 para 1 a 2 mg/L).

As mutações descritas para isolados clínicos de *A. fumigatus*, estão sendo descritas em isolados ambientais de diversos países da Europa, China, Oriente Médio, Índia, África, Austrália, Turquia, Estados Unidos e Colômbia (Figura10). A combinação de mutações representada por TR46/Y121F/T289A alterações de aminoácidos de tirosina em fenilalanina no codon 121 e treonina em alanina no codon 289, acoplado com uma repetição em *tandem* de uma sequência de 46 pares bases na região

promotora, está ligada à resistência ao voriconazol e foi observada, também, em isolados *A. fumigatus* de meio ambiente na Europa, Índia, África e América Latina (Verweij et al., 2015; Abdolrasouli et al., 2015; Le Pape et al., 2016; Fuhren et al., 2015; Tashiro et al., 2012; Fischer et al, 2014; Astvad et al., 2014; Chowdhary et al., 2014B; Chen et al., 2015; Pelaez et al., 2015; Steinmann et al., 2015; Lavergne et al., 2015).

As mutações ligadas a mecanismos de resistência (TR34/L98H e TR46/Y121F/T289A) são predominantes em isolados ambientais. (Chang et al., 2016; Van der Linden et al., 2011; Sanglard, 2016; Van der Linden et al., 2013). As mutações L98H ou Y121F sozinhas foram associadas a aumento moderado nos MICs (itraconazol de 0,25 a 0,5 para 0,5 a 1 mg/L e voriconazol 0,25 a 0,5 para 1a 4 mg/L). Porém, os níveis de resistência aos azóis são altos na presença de uma combinação de TR e substituição de aminoácido. Na vigência da combinação TR34 com L98H, os MICs atingem valores acima de 16 mg/L para itraconazol e 2 mg/L para voriconazol, e para recombinantes de TR46 com Y121F observam-se MICs acima de 8 mg/L, tanto para itraconazol, quanto para voriconazol (Paul et al., 2012).

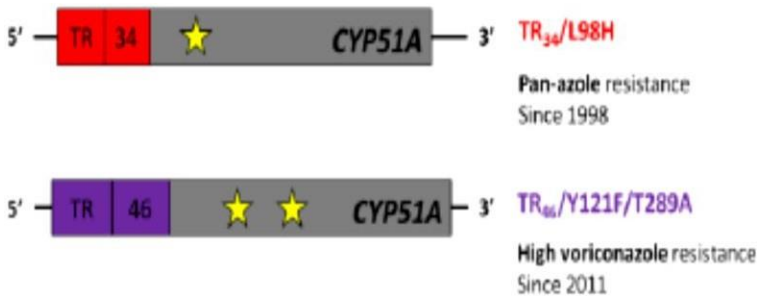


Figura 10. Dois mecanismos de resistência derivados do meio ambiente. Simplificação dos mecanismos de resistência TR34/L98H (acima) e TR46/Y121F/T289A (abaixo). As estrelas indicam mutações no cyp51A que conferem substituições de aminoácidos. TR é uma sequência com diversas cópias na região promotora do gene (Jesen, 2016).

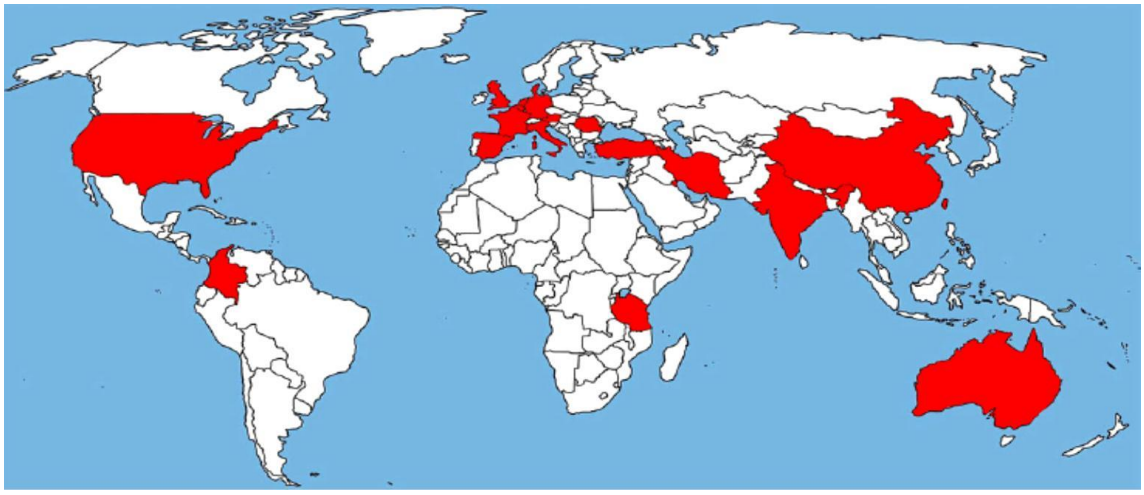


Figura 11. As áreas em vermelho mostram países que relataram o mecanismo de resistência TR34/L98H e TR46/Y121F/T289A em isolados de *A. fumigatus* clínicos ou ambientais (Verweij, 2015).

Para o controle e prevenção de uma doença é necessário entendimento da sua epidemiologia, em particular, das características do agente etiológico. No entanto, apesar de significantes esforços, a epidemiologia molecular global das infecções por *A. fumigatus* permanece pouco compreendida. Um recente estudo analisando 2.026 isolados de *A. fumigatus,* de 13 países em 4 continentes, usando 9 marcadores de microssatélites altamente polimórficos, demonstrou que as amostras pertenciam a 8 agrupamentos (*clusters)*, 7 dos quais mostraram ampla distribuição global, sinais de recombinação genética em determinados *clusters* e evidências de hibridização entre muitos *clusters* foram encontradas. Diferenças genéticas geográficas e ecológicas foram encontradas entre as populações, havendo evidências do fluxo de genes em escalas locais, regionais e globais. As populações suscetíveis e resistentes aos antifúngicos triazólicos mostraram diferenças na estrutura populacional, compatível com a pressão dos antifúngicos, desempenhando um papel significante na adaptação local. Os resultados desse estudo sugerem que as populações globais de *A. fumigatus* são moldadas pela diferença histórica, fluxo de genes contemporâneo, reprodução sexual e seleção local de antifúngicos que está impulsionando a expansão clonal de genótipos resistentes a múltiplos triazóis (Ashu et al., 2017).

Estudos com isolados mutantes de *A. fumigatus* sugerem expansão clonal de um ancestral resistente comum (Abdolrasouli et al., 2015; Van der Linden et al., 2011). A expansão devido à disseminação ambiental do conídio, a partir de diversas fontes, seria facilitada pelo seu pequeno tamanho, capacidade de cobrir milhares de milhas no ar e de se manter viável por longos períodos (Nicolle et al., 2011; Warris et al., 2001; Verweij et al., 2015; Vermeulen et al., 2013; Chowdhary et al., 2013).

Por ser esporo da fase assexuada, o conídio tem alta taxa de multiplicação e este pode ser um fator contribuinte para ocorrência de mutações. Três processos de reprodução são reconhecidos em *A. fumigatus*: assexual, sexual e parasexual (Figura 11-A). Em contraste com a reprodução sexual e assexual que são conhecidas por ocorrer amplamente em muitos micro-organismos, a recombinação parasexual é mais uma estratégia de fungos para gerar diversidade genética do que um modo de reprodução. A consequência desses aspectos do ciclo de vida é um aumento da diversidade genética através da espontaneidade de mutações e reorganização de genótipos, aumentando assim a probabilidade de que a descendência inclua tipos que estão mais bem adaptados a um novo ambiente. Azóis não são mutagênicos ou recombinogênicos por si, mas a exposição aos azóis provoca uma forte pressão seletiva para *A. fumigatus* com resistência. Quando as condições são certas, uma colônia de fungos é iniciada da germinação de um único esporo que da origem a 10^4 conídios (assexuais) (Adams et al., 1998). Consequentemente, após uma semana, uma colônia poderia produzir até 10^9 conídios. Durante cada fase mitótica há uma probabilidade muito pequena de ocorrer uma mutação. No entanto, dado o grande número de divisões mitóticas que ocorrem durante a reprodução assexuada, esporos assexuados fornecem uma grande quantidade de mutações espontâneas, por exemplo, para que novas mutações de resistência sejam selecionadas no ambiente com azóis (Figura 11- B) (Zhang et al., 2015). De modo interessante, foi observado em uma única colônia (técnica da colônia gigante) de *A. fumigatus*, o aparecimento de setores polimórficos, com textura floculenta e cor mais tênue. Nestes

setores foi demonstrado ocorrência de mecanismo de resistência, indicando que houve adaptação (*fitness*) para sobrevivência da cepa. Esse fenômeno foi causado por exposição a fungicida azólico difenoconazol (2 mg/L) em condições experimentais de laboratório (Verweij et al., 2016a).

Isolados na fase teleomorfa, também, podem desenvolver resistência. A reprodução sexual requer 2 cepas parentais de tipos de acasalamento opostos (MAT1 e MAT2) (Casselton & Zolan, 2003). Em *Aspergillus, a*pós fertilização, um corpo frutífero (cleistotécio) é formado e pode conter 10 esporos sexuais originários do mesmo zigoto, geneticamente, diferentes devido a recombinação durante meiose. A variabilidade genética que está presente nas cepas parentais é aumentada através da restruturação desses genótipos. Genes e alelos associados com resistência de baixo nível podem evoluir para um fenótipo mais resistente quando colocados em um conjunto genético distinto (Figura 11-C). A pressão dos azóis, seja contínua ou em altas concentrações do produto, facilitará o surgimento de fenótipos altamente resistentes através de processo de seleção. A reprodução sexual, que até agora tem sido observada apenas em condições específicas de laboratório, pode demorar vários meses ocorrer (Camps et al., 2012; Casselton & Zolan, 2002; Bahbhra et al., 2012).

O estágio sexual é tido como a principal fonte de aumento de variação gênica nos fungos, mas ainda não foi observado em a natureza para *A. fumigatus*, sendo vista apenas em laboratório e sob condições especiais. A recombinação parassexual também contribui para aumentar variação genética através da reorganização de genes, o que pode ocorrer em genótipos diferentes, mas com hifas compatíveis. A fusão de hifas permite que os núcleos se fundam, resultando em uma fase temporariamente diplóide em que pode ocorrer recombinação mitótica, antes de voltar para o estágio haplóide normal (Figura 11-D). Ocorrendo a variação genética, aumenta a possibilidade de produção de genótipos que podem se adaptar melhor a um ambiente de pressão, assim como proposto na teoria da

evolução pela seleção natural (Darwin, 1859; Pontecorvo, 1956; Stromnas and Garber, 1963; Dyer and O'Gorman, 2012).

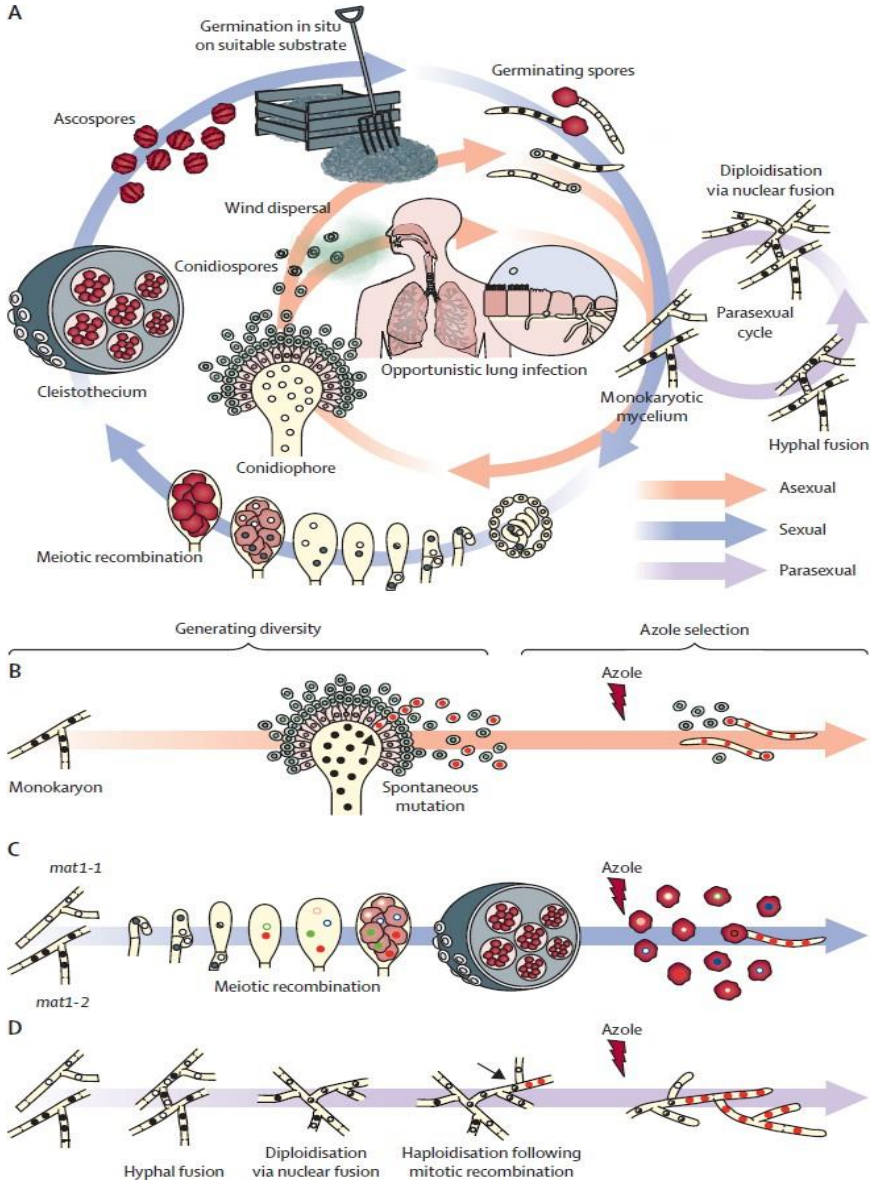


Figura 12. Reprodução de *A. fumigatus* e estratégias para adaptação à exposição aos azóis. Núcleos pretos: sensíveis, núcleos vermelhos: resistentes a azóis; outras cores: variabilidade dos núcleos. (A) Reprodução assexual (linha laranja), reprodução sexual (linha azul) e recombinação parassexual (linha roxa). (B) reprodução assexual aumenta o número de mutações espontaneas por divisão mitótica durante a produção intensa de conídios. (C) reprodução sexual como importante estrátegia para aumentar variabilidade genética através da recombinação meiótica. (D) ciclo parassexual que ocorre pela fusão de núcleos, geneticamente diferentes, mas de hifas compatíveis, permitindo a recombinação gênica no estágio diplóide, resultando no aumento da variabilidade genética (Verweij et al., 2015).

Se a presença de azóis no meio ambiente, pelo uso desses compostos como fungicidas de uso agrícola ou preservativos de madeiras, influencia os estágios de vida de *Aspergillus* spp. (por exemplo, aumentando a frequência de mutação ou a frequência de qualquer dos modos de reprodução) não está claro, mas deverá exercer forte pressão seletiva após surgir fenótipos resistentes (Verweij et al., 2016a).

1.4 Fungicidas Agrícolas Azólicos

Grande número de fungicidas azólicos que, assim como os fármacos azólicos inibem demetilase, são usados na agricultura desde 1970. Os fungicidas azólicos tem ampla gama de aplicações incluindo a proteção de plantas e culturas, a prevenção da deterioração pós-colheita e a preservação de materiais. Os fungicidas são usados globalmente criando um ambiente onde os *A. fumigatus* resistentes aos azóis podem prosperar (Pham et al., 2014; ECDC, 2013; Verweij et al., 2016a).

Mais de 30 moléculas de fungicidas são registradas para pulverização em plantações, mas apenas algumas são intrinsicamente ativas contra *A. fumigatus* (Gisi, 2014; Brent and Hollomon, 2007). Alguns desses fungicidas pertencem a classe dos triazóis e, portanto, possuem uma estrutura molecular (Figura 13) similar a dos antifúngicos clínicos (Snelders et al., 2012). Os fungicidas difenoconazol, tebuconazol e epoxiconazol possuem grande similaridade química com os triazóis clínicos, de alta atividade contra *A. fumigatus*, sendo possíveis candidatos a induzir resistência em *Aspergillus* (Snelders et al., 2009, 2012; Chowdhary et al., 2012).

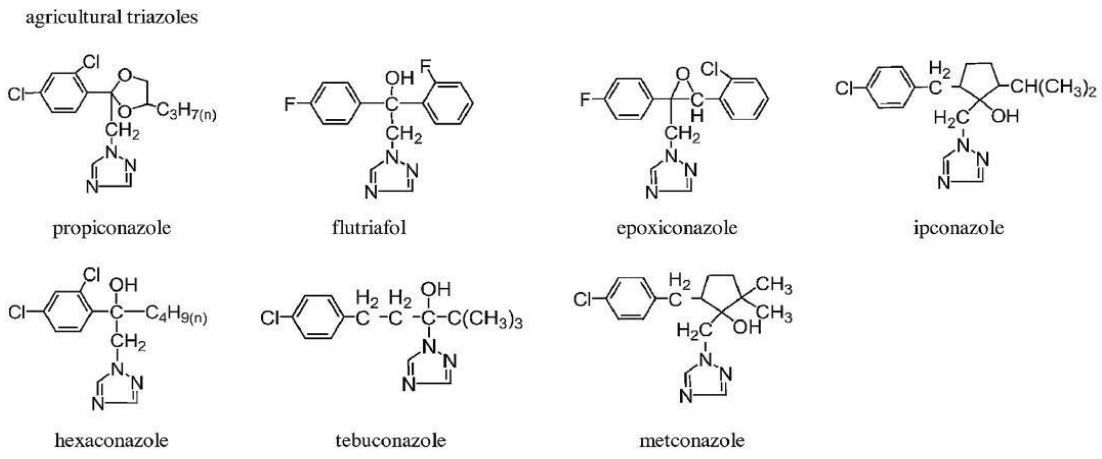


Figura 13. Estrutura molecular de fungicidas triazólicos utilizados na agricultura (Ren et al., 2016).

Existe a hipótese de que isolados de *A. fumigatus* presentes no solo desenvolvam resistência devido ao uso de fungicidas azólicos utilizados contra fitopatógenos e proteção de colheitas (Verweij et al., 2016b).

Muitos estudos realizados demonstram aumento na frequência de resistência aos azóis em *A. fumigatus*. Isolados de *A. fumigatus* contendo mutações demonstraram resistência aos antifúngicos *in vivo* e comprovadas *in vitro* (Verweij et al., 2015; Howard et al., 2013; Gregson et al., 2013; Lepak et al., 2013; Seyedmousavi et al., 2015). Estudos realizados na Espanha e no Reino Unido indicaram aumento na frequência de resistência aos triazóis e demonstraram mutações no gene *cyp*51, em casos sob terapias com azóis. Por outro lado, estudos em Países Baixos demonstraram aumento de resistência aos triazóis em *A. fumigatus* tanto em isolados de pacientes em tratamento com azóis, como em pacientes sem tratamento, assim como isolados do meio ambiente (Figura 14). A maioria do isolados resistentes carregava um único mecanismo de resistência TR34/L98H sugerindo que essa mutação era derivada do meio ambiente e envolvida com pressão seletiva de fungícidas utilizados na agricultura. As alterações genéticas que codificam esse mecanismo de resistência parecem se disseminar para outros países europeus, China, Oriente Médio, Austrália, África, India, bem como detectados em pacientes (ECDC, 2013).

As diferenças nos tipos e quantidades de fungicidas azólicos aplicados em cada região ou país podem atuar como pressões seletivas distintas e gerar diferentes frequências de isolados resistentes a triazóis. Esta hipótese foi apoiada por evidência de que isolados resistentes agrupados por origem geográfica eram altamente diferenciados geneticamente. A segunda possibilidade é que, quando expostos aos azóis, os isolados de mesmo *cluster* são mais prováveis de desenvolver a resistência aos azóis, do que aqueles de outros *clusters*. Se assim for, deve se tomar cuidado no uso dos fármacos azólicos para tratamento de infecções causadas por isolados de determinados *clusters*. Outra possibilidade é que alguns *clusters* são mais suscetíveis do que outros para aquisição de genes resistentes aos azóis, durante o processo de reprodução sexuada e recombinações gênicas. A ocorrência de recombinação dentro e entre populações genéticas de *A. fumigatus* pode ter implicações significativas na iniciação e disseminação de isolados resistentes capazes de provocar surtos de aspergilose (Ashu et al., 2017).

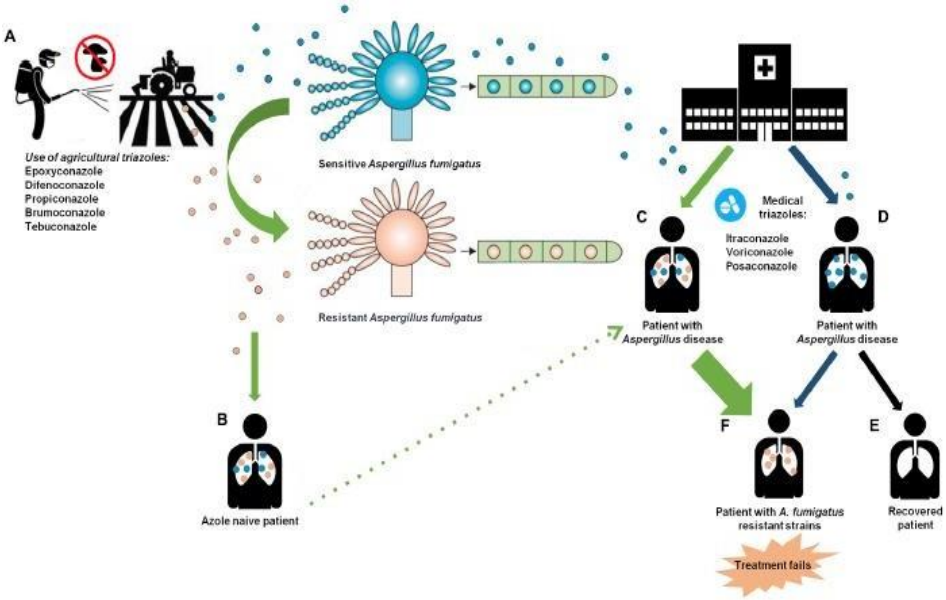


Figura 14. Rotas ambientais e clínicas do desenvolvimento da resistência a azóis em infecções por seção Fumigati. (A) exposição de conidios aos compostos azólicos na agricultura que pode induzir mutações em conídios resultando fenótipo resistente. (B) Paciente de aspergilose não tratada, após a inalação de conidios resistentes e sensíveis. (C) Paciente tratado com triazóis de uso clínico sob pressão iatrogênica, que leva à seleção de cepas resistentes. (D) Paciente infectado por cepa sensivel que recebe terapia de longo prazo com triazóis. (E) Paciente que recebeu terapia e evoluiu para cura, sem desenvolver resistência (seta preta). (F) Paciente com cepa resistente selecionada após terapia azólica (seta azul) ou por uso de azol na agricultura (seta verde). Isso induz falha no manejo clínico da doença (Verweij et al., 2009A; Berger et al., 2017).

Isolados resistentes de *A. fumigatus* podem, obviamente, sobreviver em ambientes naturais, têm potencial para ampla dispersão e podem se adaptar ao meio do mesmo modo como isolados de tipo selvagem. A diversidade genética observada em isolados TR34/L98H foi atribuída a possíveis acasalamentos sexuais em populações naturais, o que se opõe à natureza clonal, como foi observado na Índia (Chowdary et al., 2012). Além disso, tais isolados podem ter um ciclo sexual *in vitro* e cruzar com isolados de diferentes origens genéticas (Camps et al., 2012).

Os estudos que se concentram na genética evolutiva da origem da resistência ambiental de *Aspergillus* tendem a esclarecer o papel dos

fungicidas, ou de outros fatores, que desempenham papel fundamental no desenvolvimento da resistência aos azóis no meio ambiente.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar se a origem ambiental de mecanismos de resistência aos triazóis, em isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* é modulada pela exposição à fungicida agrícola.

2.2 Objetivos específicos

- Proceder à exposição mensal a 1 fungicida azólico, em modelo de horta experimental, 2 isolados clínicos e 2 isolados ambientais de *A. fumigatus* ambos selvagens e não mutantes para gene *cyp*51A;
- Monitorar valores de MIC de compostos azólicos fungicidas (difenoconazol, tebuconazol e metconazol) e fármacos (itraconazol, voriconazol e posaconazol), nos isolados expostos ao fungicida;
- Avaliar o aparecimento de resistência por mutações no gene *cyp*51A em isolados selecionados e determinar sua similaridade genética, por microssatélite, com os isolados inoculados no solo, e
- Correlacionar alteração de MIC de itraconazol, voriconazol ou posaconazol a ocorrência de mutações nos isolados expostos.

3. Material e Métodos

3.1 Local de trabalho

O presente trabalho foi realizado no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (Lemdi) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp) e em uma área agrícola do município de Rio Claro. No período de março de 2018 a dezembro de 2019.

3.2 Cepas utilizadas no estudo

Foram utilizadas 4 cepas de *A. fumigatus*, sendo 2 clínicos (Af1 e Af2) de casos de aspergilose invasiva e 2 ambientais (Af3 e Af4) de ar atmosférico, mantidos na coleção de culturas do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Estes isolados foram, previamente, identificados como *A. fumigatus* pelo sequenciamneto do gene *β*-tubulina e sequenciados no gene *cyp*51A, caracterizando-os como isolados selvagens para itraconazol (MIC $\leq$ 1 mg/L) e não mutantes. Estas cepas foram usadas para inoculação do solo utilizado nas hortas experimentais e denominadas para fins deste estudo como ―originais‖.

3.3 Exposição das 4 cepas originais a fungicida e recuperação das cepas expostas

A exposição a compostos azólicos (fungicidas) dos 4 isolados de *A. fumigatus* foi avaliada em protótipo de cultivo de cebolinha em um modelo de

horta experimental, localizada em área agrícola no Município de Rio Claro (Figura15). O período planejado de experimento com as hortas simuladas foi de 12 meses, sendo que, foram realizadas 11 pulverizações e 11 recuperações.

3.3.1 Preparo do solo com inóculo fúngico

Dos 4 isolados foram obtidas culturas em placas de ágar batata, sob 35°C durante 7 dias, que foram lavadas em solução de NaCl (0,85%), para coleta de conídios e suspensão de 3 x 10^7 UFC/mL. Uma porção de solo coletado de horta orgânica foi autoclavado e distribuido igualmente nos 8 vasos utilizados como horta experimental, com uma muda de *Allium schoenoprasum* (cebolinha) plantada em cada um dos vasos. Foram realizados com palitos de madeira esterelizados 4 furos, com profundidade aproximada de 15 cm, em pontos distintos do solo de cada vaso, em cada um dos furos foi inoculado a suspensão de conídios de *A.fumigatus.*

3.3.2 Disposição da horta experimental e exposição ao fungicida

A horta foi elaborada dentro de uma estufa de vegetação, dividida em duas áreas isoladas, sendo uma com 4 vasos-controle inoculados com as 4 cepas (Af1, Af2, Af3, Af4) com *A. fumigatus* e outra área com 4 vasos inoculados com as mesmas cepas de *A. fumigatus,* mas pulverizadas posteriormente com fungicida difenoconazol (Figura16).

Solução de fungicida foi aplicada, mensalmente, durante 12 meses de acordo com as recomendações do fabricante em volume de 100 mL/m^2 na concentração de 0,167% de difenoconazol em solução de aditivo conservante, atenuador de espuma, tensoativo não iônico, umectante, espessante e solvente.

Figura 15. Estufa construída em área agrícola do município de Rio Claro contendo hortas experimentais de cebolinha (Fonte: arquivo pessoal).

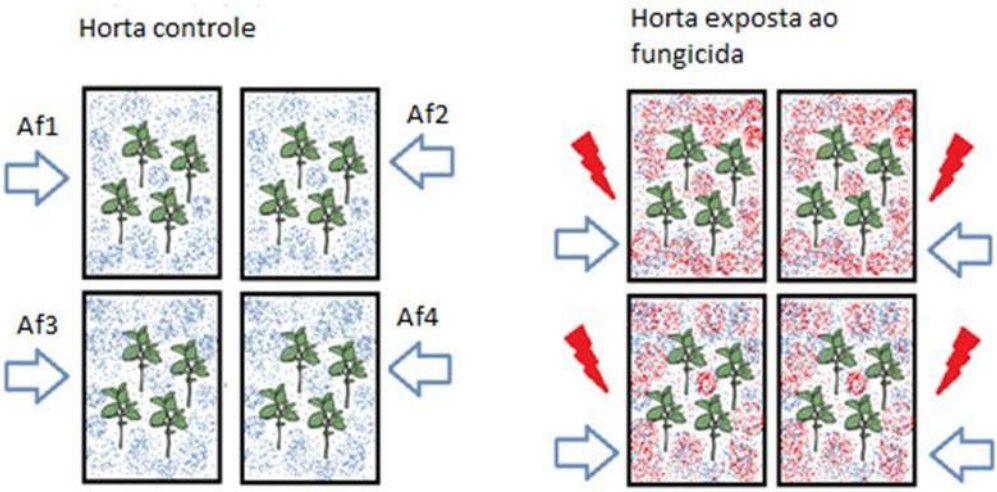


Figura 16. Esquema de disposição da área controle e da área exposta ao fungicida difenoconazol na horta experimental de cebolinhas. Setas azuis indicam o inóculo das 4 cepas (Af1, Af2, Af3, Af4), setas vermelhas indicam a pulverização do fungicida (Fonte: arquivo pessoal)

3.3.3 Coleta e processamento das amostras de solo

Amostras de solo foram coletadas de cada vaso das duas áreas da horta experimental, mensalmente, e imediatamente antes da pulverização. A amostragem foi de 5 g de solo, diluído em solução salina estéril. Após sedimentação natural, 50 µL do sobrenadante de cada amostra foram submetidos a plaqueamento em ágar batata (30º C por até 7 dias), para re-isolamento de colônias. Para cada sobrenadante foi utilizada uma placa de ágar batata (Figura 17). De todas as colônias, até 5 delas, com características de *A. fumigatus*, foram reisoladas e purificadas.

Comprovada a identidade micromorfológica por exame com lactofenol entre lâmina e lamínula dos isolados recuperados do solo, estes foram submetidos à determinação de MIC para fármacos e fungicidas.

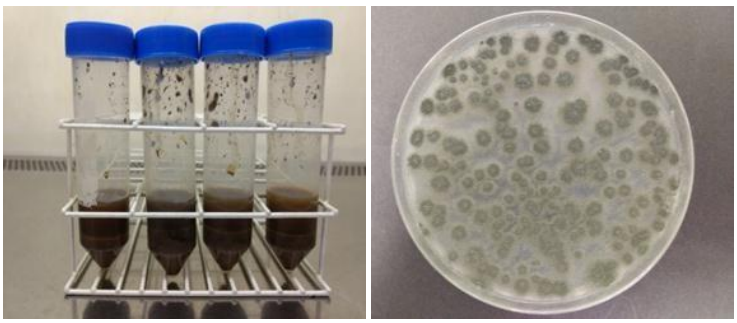


Figura 17. Suspensão das amostras de solo em salina estéril e colônias de *A. fumigatus* recuperadas em ágar batata (Fonte: arquivo pessoal).

3.4 Determinação de MIC

Os MICs de 3 fármacos triazólicos- voriconazol, posaconazol e itraconazol- e de 3 fungicidas agrícolas- difenoconazol, tebuconazol e metaconazol- foram determinados, frente a cada um dos 4 isolados. Os 4 isolados, antes de serem inoculados no solo, e isolados recuperados do solo foram submetidos à determinação de MIC para todos os triazólicos. As cepas recuperadas do solo, mensalmente, foram representadas por até 5 colônias obtidas na placa de ágar batata. Esta fase foi realizada no Núcleo de Micologia do IAL-SP.

A base para os experimentos de MIC foi o método de referência norte-americano preconizado pelo CLSI no documento M38-A2, com base na microdiluição em placas de 96 orifícios. Foram utilizadas placas de microtitulação comerciais (EIKEN, Japão) para itraconazol e voriconazol. Para os fungicidas foram executados os procedimentos segundo documento M38-A2 (CLSI, 2012). Os fungicidas tebuconazol, metconazol, difenoconazol (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemanha), adquiridos sob forma de pó p.a., com a informação do grau de pureza, foram submetidos às diluições seriadas à razão 2 para obtenção de 10 concentrações (0,03 mg/L a 16 mg/L).

Cada isolado, em suspensões de 0,4 a 5 x 10^4 UFC/mL em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) sem bicarbonato de sódio e com glutamina, foi colocado nas placas contendo os antifúngicos. As placas foram incubadas à 35ºC por 24 h. A leitura de inibição foi realizada por análise da turbidez de cada orifício-teste contendo antifúngico e inóculo. A inibição de 100%, do crescimento (verificado "a olho-nú"), em comparação com o orifício contendo controle positivo sem antifúngico, foi o ponto final da leitura indicando o MIC. Cepas/padrão *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle de todos os antifúngicos. Os testes foram realizados em duplicata em algumas cepas para confirmar os valores mais altos de MIC.

3.4.1 Análise de resultados de suscetibilidade de antifúngicos

Os valores de MIC de cada par triazol-cepa foram compilados, de modo a permitir o monitoramento de alteração de seu valor durante os 12 meses de exposição.

3.4.2 Triagem de fenótipos resistentes das amostras de solo

Foi realizado triagem das amostras de solo da 5º à 11º coleta para isolar *A. fumigatus* com MIC para itraconazol igual ou maior que (2 mg/L). Para isso 5 g de cada amostra de solo foram suspensos em salina e 100 µL do sobrenadante foram semeados em placas de petri contendo ágar Mueller Hinton suplementado com 2 mg/L de itraconazol. Cepas de *A. fumigatus*, com MIC de itraconazol >2 mg/L, da coleção de cultura do IAL foram utilizadas como controle positivo. Cada placa foi incubada por 48h a 35 ºC.

3.5 Métodos moleculares

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os 4 isolados originais foram, inicialmente, identificados em espécie por sequenciamento do gene *β*-tubulina e não mutantes por sequenciamento do gene *cyp*51A. Com os genes *β*-tubulina sequenciados foi realizado comparação ao banco de dados de referência do GenBank.

A identificação molecular dos isolados do solo foi realizada pelo sequenciamento do gene da *β*-tubulina, seguida de comparação com as sequências depositadas no GenBank.

As cepas selecionadas após exposição a fungicida e avaliação do MIC foram avaliadas quanto à presença de alterações gênicas na região do gene *cyp*51A. A metodologia utilizada para sequenciamento serve para avaliar a presença de mutações na região promotora e codificadora do gene em questão. Foram realizadas 2 reações de sequenciamento de 2 cepas, sendo uma inoculada (Af2) e sua correspondente recuperada do solo na quinta coleta.

Para confirmar a similaridade molecular das cepas originais inoculadas no solo com os isolados recuperados foi utilizado a técnica de microssatélite segundo protocolo adaptado de Valk e colaboradores (2005) que é baseada no sequenciamento de 9 fragmentos de DNA.

Para tais reações, os seguintes procedimentos foram executados:

3.5.1 Extração de DNA genômico

Foram utilizadas colônias com crescimento de 72 h em ágar batata para remoção de conídios com *swab* e suspensão dos conídios em PBS (tampão fosfato salino) em crio-tubo contendo *beads* cerâmicas seguido de processamento no equipamento *Magnalyzer* a velocidade de 5.000 rpm em 3 ciclos de 90 segundos, centrifugação por 2 minutos a 10.000 g e retirada do sobrenadante para ser processado com o QIAamp® DNA Mini Kit (QIAgen), segundo as recomendações do fabricante.

3.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação do DNA extraído foi realizada por PCR convencional utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene da *β*-tubulina, *cyp*51A e para 9 fragmentos gênicos para a técnica de microssatélite.

As sequências de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento de DNA para identificação molecular de

Aspergillus spp foram: *β*-tubulina 2A GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT e *β*-tubulina 2B ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (Glass & Donaldson, 1995).

A amplificação do *cyp*51A foi realizada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores:

CYP51A Foward (5‘-GGCTGGAGATACTATGGCTTTC-3‘)

CYP51A Reverse (5‘- GTATAATACACCTATTCCGATCACACC-3‘)

A amplificação dos 9 fragmentos de DNA para microssatélites foi realizada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores:

Straf-2A F: AAGGGTTATGGCCATTAGGG
R: GACCTCCAGGCAAAATGAGA
Straf-2B F: TATTGGATCTGCTCCCAAGC
R: GAGATCATGCCCAAGGATGT
Straf-2C F: TCGGAGTAGTTGCAGGAAGG
R: AACGCGTCCTAGAATGTTGC
Straf-3A F: GCTTCGTAGAGCGGAATCAC
R: GTACCGCTGCAAAGGACAGT
Straf-3B F: CAACTTGGTGTCAGCGAAGA
R: GAGGTACCACAACACAGCACA
Straf-3C F: GGTTACATGGCTTGGAGCAT
R: GTACACAAAGGGTGGGATGG
Straf-4A F: TTGTTGGCCGCTTTTACTTC
R: GACCCAGCGCCTATAAATCA
Straf-4B F: CGTAGTGACCTGAGCCTTCA
R: GGAAGGCTGTACCGTCAATCT
Straf-4C F: CATATTGGGAAACCCACTCG
R: ACCAACCCATCCAATTCGTAA

As PCRs foram realizadas em um tubo de 200 µL, contendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI EUA), 1,25 µL de cada iniciador a 10 mM, 8 µL de água milli-Q e 2 µL de DNA para um volume final de 25 µL. As reações foram realizadas no termociclador *ProFlex PCR*

System (*Applied Biosystems*), os parâmetros da reação estão descritos nos Quadros 1 a 3.

Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	
Anelamento	58	30 s	40
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	1 min	1
Refrigeração	4	∞	

Quadro 1. Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação de DNA da região da *β*-tubulina 2A/2B de *A. fumigatus*

Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min	1
Desnaturação	94	30 s	
Anelamento	50	30 s	35
Extensão	68	4 min	
Extensão final	68	5 min	1
Refrigeração	4	∞	

Quadro 2. Parâmetros utilizados na reação de PCR para amplificação do gene cyp51A de *A. fumigatus*

Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	3 min	1
Desnaturação	95	15 s	
Anelamento	57	15 s	35
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	1 min	1
Refrigeração	4	∞	

Quadro 3. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento dos 9 fragmentos de DNA para analise de microssatélite de *A. fumigatus*.

3.5.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR da *β*-tubulina, *cyp*51A e microssatélites foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a 100V por 25 minutos. Para a corrida foi utilizado 1 µL *Novel Juice* (*GeneDirex*) para cada 3 µL de amostra e como referência de peso molecular foi utilizado 5 µL de *DNA Ladder* mais 2 µL de *Novel Juice*. Os fragmentos foram visualizados em iluminação ultravioleta através do equipamento transluminador Amersham imager 600 da GE Healthcare.

3.5.5 Reação de sequenciamento

Os produtos resultantes da PCR da *β*-tubulina, *cyp*51A e microssatélites foram purificados enzimaticamente com a utilização do reagente *ExoSap-IT express* (*ThermoFisher Scientific*) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os produtos da PCR foram sequenciados com a utilização dos iniciadores *forward* e *reverse* utilizando o *Big DyeTM Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)* de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, foram preparadas reações contendo 1 µL de *Big Dye Terminator*, 1 µL de tampão, 1 µL do iniciador *forward* ou *reverse* (cada *primer* em tubo diferente) a 1,6 mM, 2 µL do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10 µL. A reação de sequenciamento foi realizada no termociclador Pro Flex PCR System da Applied Biosystems. Os parâmetros da reação de sequenciamento estão descritos nos Quadros 4 a 6.

Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	10 s	
Anelamento	55	5 s	30
Extensão	60	4 min	
Refrigeração	4	∞	

Quadro 4. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene β-tubulina

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

Quadro 5. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento do gene cyp51A de *A. fumigatus.*

Parâmetro	Temperatura (ºC)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	3 min	1
Desnaturação	95	15 s	
Anelamento	57	15 s	35
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	1 min	1
Refrigeração	4	∞	

Quadro 6. Parâmetros utilizados na reação de sequenciamento dos 9 fragmentos de DNA para analise de microssatélite de *A. fumigatus*.

3.5.6 Precipitação e lavagem do DNA com etanol

Após a reação de sequenciamento, os produtos das reações de sequenciamneto da *β*-tubulina, *cyp*51A e microssatélites passaram por precipitação e lavagem com etanol. Na primeira etapa, em cada amostra, foram adicionados 2,5 µL de EDTA (125mM) e 30 µL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 3000 g, a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 30 µL de etanol 70% às amostras que foram então centrifugadas a 3000 g, a temperatura de 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras passaram por secagem a vácuo. Após a precipitação e lavagem com etanol, foram acrescentados 10 µL de formamida HI-DI às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, as

amostras foram colocadas em gelo durante 2 minutos e aplicadas na placa de sequenciamento e levadas ao sequenciador.

3.5.7 Análise de resultados de sequenciamento

A análise das sequências obtidas da *β*-tubulina foi realizada no programa *Sequencher 5.2.4.* e as mesmas foram comparadas com as sequências disponíveis no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information website* (Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov), com a utilização do *Basic Local Aligment Search Tool (BLAST)* e no *MycoBank* pertencente ao CBS-KNAW (*Fungal Biodiversity Center*, Utrecht, The Netherlands) (Disponível em: http://www.mycobank.org/).

A análise das sequências obtidas do *cyp*51A foi realizada no programa Sequencher 5.2.4. e Mega 7, as sequências obtidas foram comparadas com a sequência do isolado suscetível *wild type*, disponível no GeneBank (número de acesso AF338659) e com a sequência de isolado não exposto ao fungicida.

A análise das sequências obtidas de microssatélites foi realizada no programa Sequencher 5.2.4. e Mega 7 as sequências obtidas foram comparadas quanto ao numero de repetições específicas de nucleotídeos (*short tandem repeats*) em cada fragmento de acordo com protocolo adaptado de Valk e colaboradores (2005). A construção do dendrograma baseado na análise de microssátelite foi realizada pelo programa disponível em (http://genomes.urv.cat/UPGMA/).

4. Resultados

No período de 2018 a 2019 foram realizadas 11 exposições mensais e 11 coletas de amostra de solo de cada um dos 8 vasos.

4. 1 Recuperação dos isolados do solo

Um total de 88 amostras de solo foram coletadas e 290 colônias foram recuperadas e mantidas em meio de cultura.

Nas primeiras coletas o crescimento de colônias de *A. fumigatus eram* mais abundantes. A presença de colônias de outras espécies de fungos não *A. fumigatus* aumentou durante o período de experimento, dificultando e diminuindo o isolamento de colônias de *A. fumigatus,* por amostra de solo.

Após processamento do solo, foram recuperadas até 5 colônias com características de *A. fumigatus,* de cada placa de ágar batata (Figura 18).

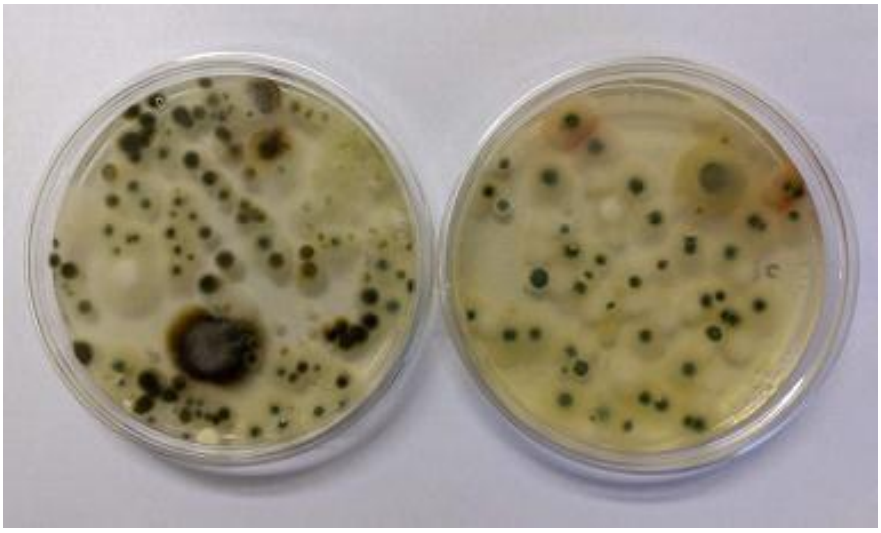


Figura 18. Placas de ágar dextrose batata com colônias fúngicas recuperadas de amostras de solo. Crescimento de colônias: esquerda colônias-controle não expostas e direita colônias expostas a difenoconazol (Fonte: arquivo pessoal).

4.2 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos clínicos e fungicidas agrícolas

As 4 cepas originais foram submetidas ao teste de MIC tanto para os fungicidas azólicos (difenoconazol, tebuconazol, metconazol), quanto para os antifúngicos clínicos (itraconazol, voriconazol, posaconazol), totalizando 24 testes (Tabela 3). Até o 11º mês de experimento foram recuperadas colônias com aspecto morfológico de *A. fumigatus* das hortas controle e das hortas expostas ao fungicida, totalizando 145 colônias controle e 144 colônias expostas ao fungicida. Todas essas colônias foram submetidas ao teste de MIC dos triazóis (Tabela 4 a 7).

Os resultados dos testes não indicaram mudança significativa no valor de MIC, após exposição aos fungicidas, mas o total de isolados em cada valor de MIC foram diferentes entre a horta exposta ao fungicida e a horta controle (Figura 19 a 24). Com base nos resultados de MIC foram selecionadas 36 cepas recuperadas para as quais foi observado aumento numérico, mas não significativo, de MIC para um ou mais triazóis avaliados, em relação à cepa correspondente inoculada.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de fungicidas e fármacos azólicos frente às 4 cepas originais utilizadas para inoculação no solo de horta experimental

Cepas	ITZ	VCZ	PCZ	MTZ	TBZ	DFZ
Af1	0,5	1	0,25	0,25	2	1
Af2	0,5	1	0,06	0,5	2	1
Af3	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,5
Af4	1	1	0,5	0,25	2	1

ITZ, itraconazol; VCZ, voriconazol; PCZ, posaconazol; MTZ, metconazol; TBZ, tebuconazol; DFZ, difenoconazol

Tabela 4. Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente aos isolados recuperados do solo da horta não exposta (controle) ao fungicida até 11º mês de experimento

	MIC (mg/L)										
Azol	**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**Total**
ITZ	0	0	12	18	2	71	27	15	0	0	145
VCZ	0	0	0	16	60	67	1	0	0	0	144
PCZ	0	0	3	24	72	11	2	0	0	0	111
MTZ	0	0	4	45	66	26	0	0	0	0	141
TBZ	0	0	0	0	0	8	40	83	12	0	142
DFZ	0	0	0	1	8	50	71	7	7	0	144
Total	0	0	19	104	208	232	140	105	19	0	827

ITZ, itraconazol; VCZ, voriconazol; PCZ, posaconazol; MTZ, metconazol; TBZ, tebuconazol; DFZ, difenoconazol

Tabela 5. Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente aos isolados recuperados do solo da horta expostas ao fungicida difenoconazol, recuperadas até 11º mes de experimento.

	MIC (mg/L)										
Azol	**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**Total**
ITZ	0	0	13	19	6	40	39	27	0	0	144
VCZ	0	0	0	11	50	59	10	0	0	0	130
PCZ	0	0	1	21	44	25	9	0	0	0	99
MTZ	0	0	3	48	60	28	0	0	0	0	139
TBZ	0	0	0	0	1	26	31	46	36	0	140
DFZ	0	0	0	0	1	24	69	16	10	0	120
Total	0	0	17	99	162	202	157	89	46		772

ITZ, itraconazol; VCZ, voriconazol; PCZ, posaconazol; MTZ, metconazol; TBZ, tebuconazol; DFZ, difenoconazol

Tabela 6. Intervalo de valores de concentração inibitória mínima (MIC), MIC_{50} e MIC_{90} e distribuição de MIC de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente ao total, em (%), de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta controle.

Azol	**MIC (mg/L)**			**Nº (%) de isolados com MIC (mg/L) de:**									
	Intervalo	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**
ITZ	0,06 - 2	0,5	1	0%	0%	8,3%	12,4%	1,4%	49,0%	18,6%	10,3%	0%	0%
VCZ	0,12 - 1	0,25	0,5	0%	0%	0%	11,1%	41,7%	46,5%	0,7%	0%	0%	0%
PCZ	0,06 - 1	0,25	0,25	0%	0%	2,7%	21,6%	64,9%	9,9%	0,9%	0%	0%	0%
MTZ	0,06 - 0,5	0,25	0,5	0%	0%	2,8%	31,9%	46,8%	18,4%	0%	0%	0%	0%
TBZ	0,5 - 4	2	2	0%	0%	0%	0%	0%	4,9%	28,2%	58,5%	8,5%	0%
DFZ	0,12 - 4	1	1	0%	0%	0%	0,7%	5,6%	34,7%	49,3%	4,9%	4,9%	0%

MIC_{50} e MIC_{90}, valores de MIC capazes de inibir 50% e 90% dos isolados testados.

Tabela 7. Intervalo de valores de concentração inibitória mínima (MIC), MIC_{50} e MIC_{90} e distribuição de MIC de 3 antifúngicos clínicos e 3 fungicidas agrícolas frente ao total, em (%), de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta exposta.

Azol	**MIC (mg/L)**			**Nº (%) de isolados com MIC (mg/L) de:**									
	Intervalo	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**
ITZ	0,06 - 2	0,5	2	0%	0%	9,0%	13,2%	4,2%	27,8%	27,1%	18,8%	0%	0%
VCZ	0,12 - 1	0,5	0,5	0%	0%	0%	8,5%	38,5%	45,4%	7,7%	0%	0%	0%
PCZ	0,06 - 1	0,25	0,5	0%	0%	1,0%	21,2%	44,4%	25,3%	8,1%	0%	0%	0%
MTZ	0,06 - 0,5	0,25	0,5	0%	0%	2,2%	34,5%	43,2%	20,1%	0%	0%	0%	0%
TBZ	0,25 - 4	2	4	0%	0%	0%	0%	0,7%	18,6%	22,1%	32,9%	25,7%	0%
DFZ	0,25 - 4	1	2	0%	0%	0%	0%	0,8%	20,0%	57,5%	13,3%	8,3%	0%

MIC_{50} e MIC_{90}, valores de MIC capazes de inibir 50% e 90% dos isolados testados.

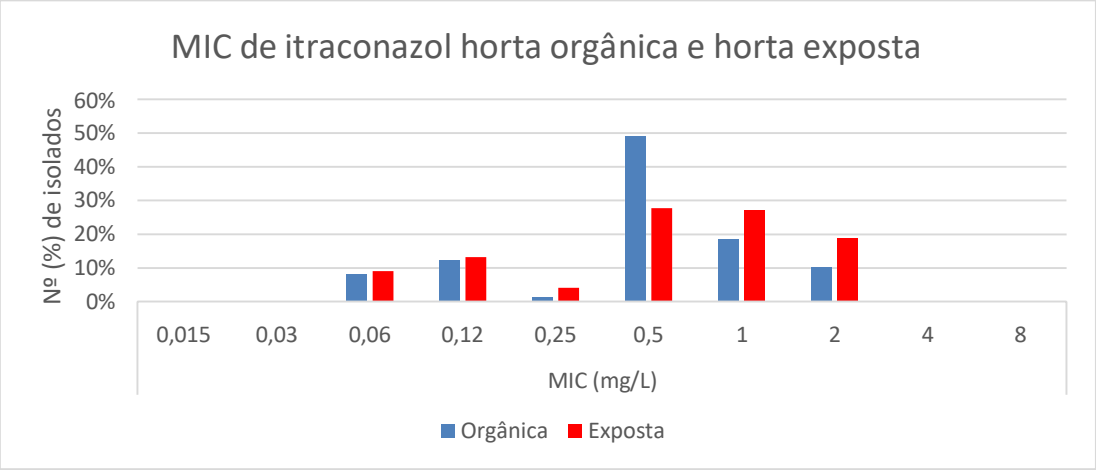


Figura 19. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de itraconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol.

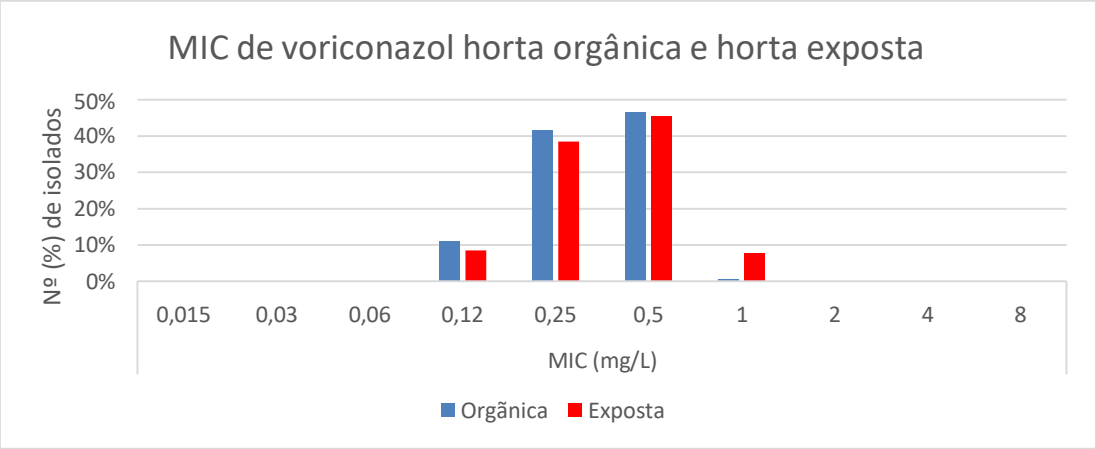


Figura 20. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de voriconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol.

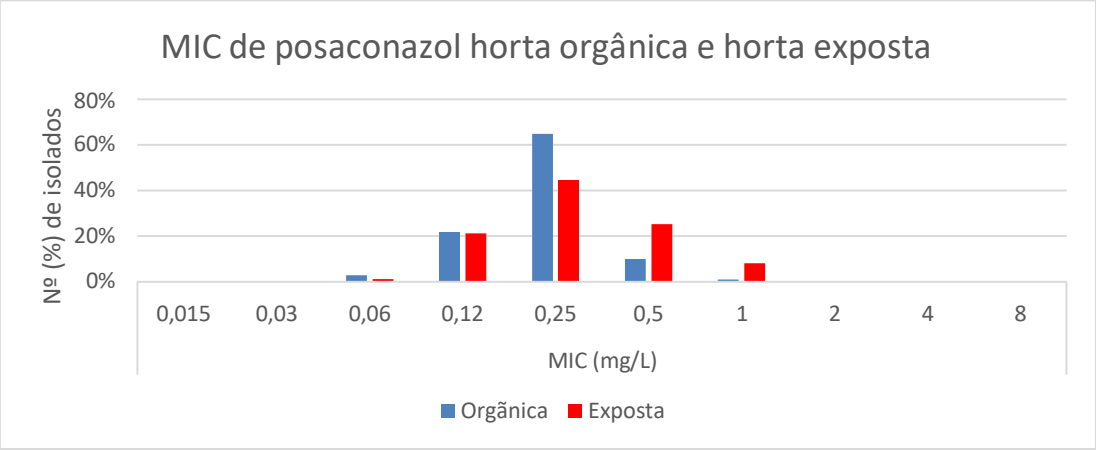


Figura 21. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de posaconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol.

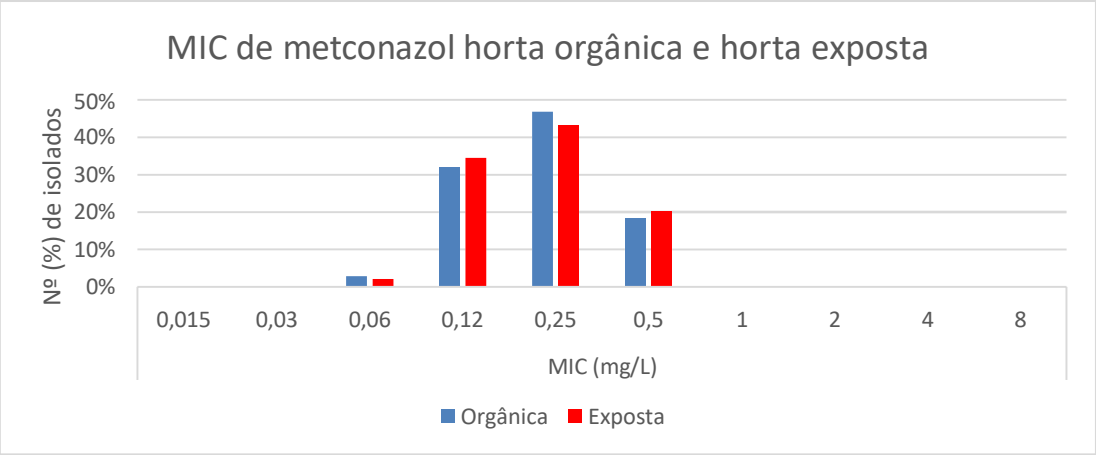


Figura 22. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de metconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol.

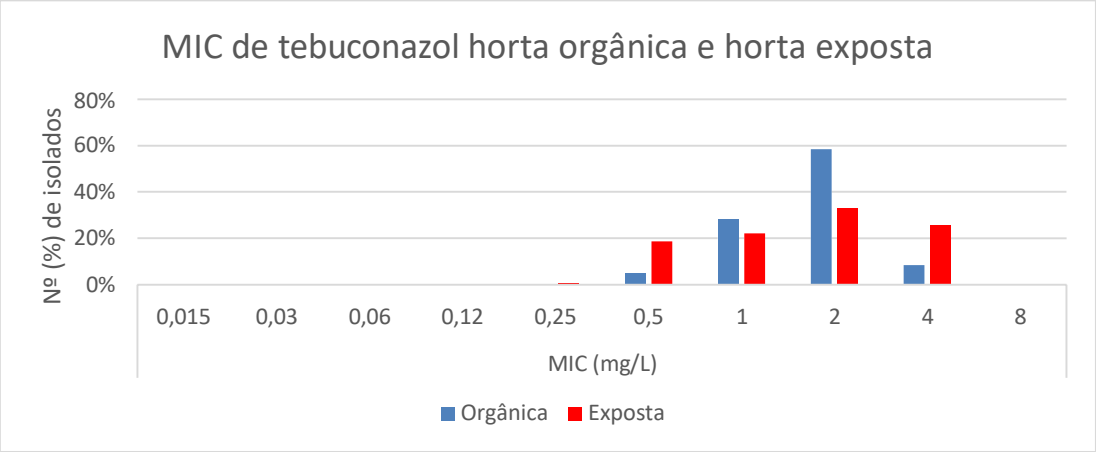


Figura 23. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de tebuconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol.

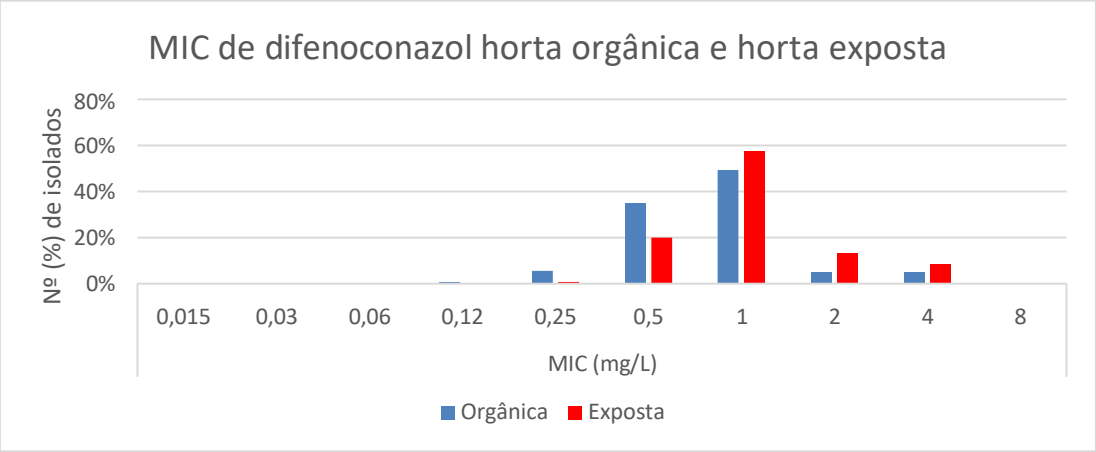


Figura 24. Gráfico referente aos valores de concentração inibitória miníma (MIC) de difenoconazol frente o total de isolados de *A. fumigatus* recuperados da horta orgânica (controle) e da horta exposta ao fungicida a base de difenoconazol.

4.3 Triagem de fenótipos resistentes das amostras de solo

A leitura do teste de triagem foi realizada após 48h de incubação das placas a 35ºC. Não ocorreu crescimento de colônias de *A. fumigatus* nas placas semeadas com as suspensões de solo. As placas semeadas com *A. fumigatus* com MIC >2 mg/L para itraconazol, utilizadas como controle, apresentaram crescimento positivo (Figura 25).

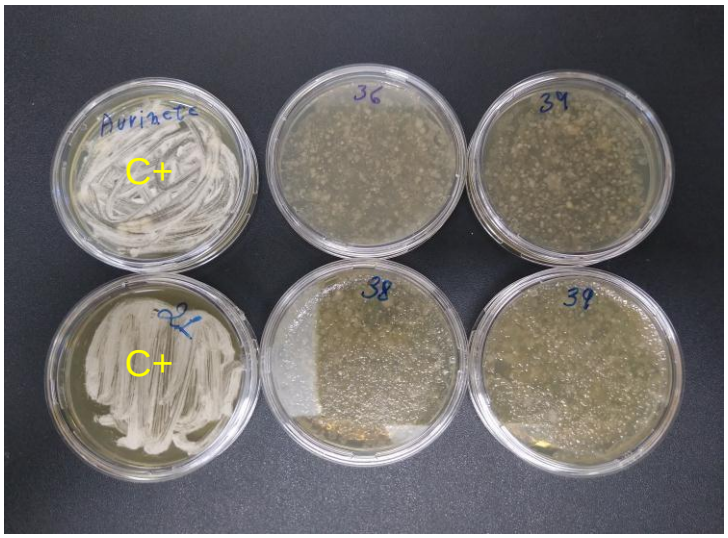


Figura 25. Placas de Petri com Ágar Mueller Hinton suplementados com 2mg/L de itraconazol, utilizadas para triagem de fenótipos resistentes das amostras de solo. C+, controle positivo de crescimento; demais placas: não houve recuperação de colônias a partir de amostras de solo. (Fonte: arquivo pessoal).

4.4 Sequenciamento gênico

Foram selecionadas 36 cepas recuperadas do solo, mais as 4 cepas originais, para extração de DNA, confirmação de espécie, análise molecular de mecanismo de resistência e microssatélite.

4.4.1 Sequenciamento da *β*-tubulina

A análise do sequenciamento da *β*-tubulina foi feita pelo programa Sequencher a comparação dos resultados com as sequências disponíveis no GenBank confirmou que todos os isolados analisados eram *A. fumigatus* (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado da comparação do sequenciamento da β-tubulina com o banco de dados do GenBank.

Amostra	gen/esp	Similaridade	Identidade	Pares de base
Af1	*A. fumigatus*	99%	99,81%	536
Af2	*A. fumigatus*	100%	100%	547
Af3	*A. fumigatus*	100%	99,82%	557
Af4	*A. fumigatus*	100%	100%	561
5	*A. fumigatus*	100%	100%	549
6	*A. fumigatus*	100%	100%	558
7	*A. fumigatus*	99%	100%	557
8	*A. fumigatus*	100%	99,82%	550
9	*A. fumigatus*	100%	99,82%	543
10	*A. fumigatus*	100%	100%	535
11	*A. fumigatus*	100%	100%	537
12	*A. fumigatus*	100%	100%	525
13	*A. fumigatus*	100%	100%	540
14	*A. fumigatus*	100%	100%	537
15	*A. fumigatus*	100%	100%	536
16	*A. fumigatus*	100%	100%	539
17	*A. fumigatus*	99%	99,82%	556
18	*A. fumigatus*	100%	100%	534
19	*A. fumigatus*	100%	100%	478
20	*A. fumigatus*	100%	99,81%	537
21	*A. fumigatus*	100%	99,81%	537
22	*A. fumigatus*	100%	99,43%	528
23	*A. fumigatus*	100%	100%	532
24	*A. fumigatus*	100%	100%	537
25	*A. fumigatus*	100%	100%	538
26	*A. fumigatus*	99%	100%	539
27	*A. fumigatus*	100%	100%	539
28	*A. fumigatus*	100%	100%	537
29	*A. fumigatus*	100%	100%	537
30	*A. fumigatus*	100%	100%	538
31	*A. fumigatus*	100%	99,63%	529
32	*A. fumigatus*	100%	100%	538
33	*A. fumigatus*	100%	100%	553
34	*A. fumigatus*	100%	100%	550
35	*A. fumigatus*	100%	100%	551
36	*A. fumigatus*	100%	100%	537
37	*A. fumigatus*	100%	100%	538
38	*A. fumigatus*	100%	100%	544
39	*A. fumigatus*	100%	99,81%	540
+40	*A. fumigatus*	100%	100%	542

4.4.2 Sequenciamento de gene *cyp*51A

A análise do sequenciamento da região do gene *cyp*51A das cepas selecionadas não indicaram nenhuma mutação ou diferença entre a cepa Af2 e o isolado 6 recuperado do vaso onde a cepa Af2 foi inoculada.

4.4.3 Análise de microssatélites

A análise de microssatélite foi realizada para as 4 cepas originais e para 10 isolados recuperados do solo. Os resultados indicaram similaridade entre as cepas originais e 8 isolados do solo, 2 isolados do solo apresentaram diferença significativa em relação as cepas originais (Tabela 9 a 11).

Tabela 9. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af1 e três isolados recuperados do solo.

		Número de *repeats*			
	Unidade de *repeat*	Af 1	Isolado 17	Isolado 5	Isolado 7
Fragmento 2A	GA	18	18	18	18
Fragmento 2B	AG	12	12	12	12
Fragmento 2C	CA	18	18	18	18
Fragmento 3A	TCT	33	33	33	33
Fragmento 3B	AAG	23	23	23	23
Fragmento 3C	TAG	25	25	25	25
Fragmento 4A	TTCT	17	17	17	17
Fragmento 4B	CTAT	9	9	9	9
Fragmento 4C	ATGT	5	5	7	7

Tabela 10. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af2 e três isolados recuperados do solo.

		Número de *repeats*			
	Unidade de *repeat*	Af 2	Isolado 6	Isolado 3	Isolado 4
Fragmento 2A	GA	18	18	18	18
Fragmento 2B	AG	12	12	12	12
Fragmento 2C	CA	13	13	13	13
Fragmento 3A	TCT	29	29	29	29
Fragmento 3B	AAG	10	10	10	10
Fragmento 3C	TAG	14	14	14	14
Fragmento 4A	TTCT	9	9	9	9
Fragmento 4B	CTAT	9	9	9	9
Fragmento 4C	ATGT	8	10	10	10

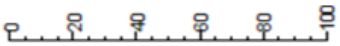
Tabela 11. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af3 e um isolado recuperado do solo.

		Número de repeats	
	Unidade de *repeat*	Af 3	Isolado 37
Fragmento 2A	GA	18	18
Fragmento 2B	AG	12	12
Fragmento 2C	CA	13	14
Fragmento 3A	TCT	26	26
Fragmento 3B	AAG	18	18
Fragmento 3C	TAG	20	20
Fragmento 4A	TTCT	8	8
Fragmento 4B	CTAT	10	10
Fragmento 4C	ATGT	8	10

Tabela 12. Comparação do número de *short tandem repeats* em fragmentos sequenciados para análise de microssatélite da cepa original Af4 e um isolado recuperado do solo.

		Número de *repeats*	
	Unidade de *repeat*	Af 4	Isolado 39
Fragmento 2A	GA	22	22
Fragmento 2B	AG	19	19
Fragmento 2C	CA	14	13
Fragmento 3A	TCT	42	42
Fragmento 3B	AAG	16	16
Fragmento 3C	TAG	17	17
Fragmento 4A	TTCT	10	10
Fragmento 4B	CTAT	9	9
Fragmento 4C	ATGT	7	7

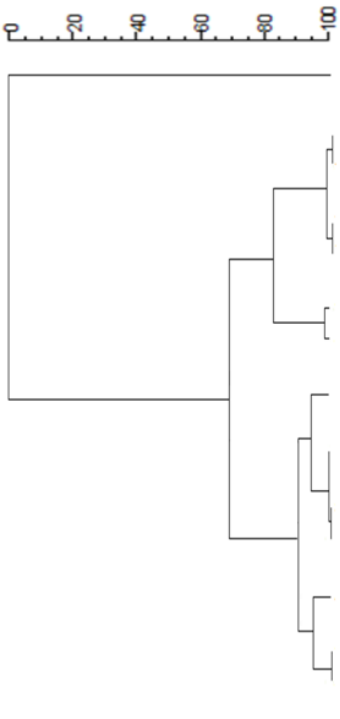
A análise de microssatélites permitiu a construção de um dendograma que possibilita a visualização dos grupos formados pelas diferenças e semelhanças gênicas entre os isolados do solo e as cepas originais utilizadas como inóculo. Os resultados indicam que dois isolados são diferentes das cepas originais (isolado1 e isolado 2), ambos possuem diferenças significativas, sendo que o isolado 1 é o mais distante geneticamente das outras cepas avaliadas (Figura 26).



Cepas	Origem/Coleta	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C
isolado 1	11º coleta	11	14	10	14	24	5	8	5	5
isolado 17	5º coleta	18	12	18	33	23	25	17	9	5
Af 1	clínica	18	12	18	33	23	25	17	9	5
isolado 7	11º coleta	18	12	18	33	23	25	17	9	7
isolado 5	11º coleta	18	12	18	33	23	25	17	9	7
isolado 37	3º coleta	18	12	14	26	18	20	8	10	10
Af 3	ambiental	18	12	13	26	18	20	8	10	8
isolado 4	11º coleta	18	12	18	29	10	14	9	9	10
Af 2	clínica	18	12	13	29	10	14	9	9	8
isolado 3	11º coleta	18	12	13	29	10	14	9	9	10
isolado 6	5º coleta	18	12	13	29	10	14	9	9	10
isolado 2	11º coleta	18	12	13	30	16	14	9	8	5
isolado 39	3º coleta	22	19	13	42	16	17	10	9	7
Af 4	ambiental	22	19	14	42	16	17	10	9	7

Figura 26. Dendograma da análise de microssátelites das 4 cepas originais e 10 isolados recuperados do solo (Fonte: arquivo pessoal).

Com o resultado da análise de microssatélites e os valores de MIC foi possível a comparação da variação de MIC das cepas originais e dos isolados do solo. A variação em algumas cepas chegou a duas diluições, mas não foram suficientes para caracterizar os isolados como resistentes. O isolado 6 apresentou a maior variação de MIC, mas o sequenciamneto do gene *cyp*51A do isolado 6 não apresentou nenhuma mutação ou qualquer alteração em relação ao *cyp*51A da cepa original sensível (Figura 27).



Cepas	Origem/Coleta	MIC (mg/L) ITZ	VCZ	PZC	MTZ	TBZ	DFZ
isolado 1	11º coleta	1	1	0,5	0,5	4	1
isolado 17	5º coleta	1	0,5	0,25	0,12	4	2
Af 1	clínica	0,5	1	0,25	0,25	2	1
isolado 7	11º coleta	1	1	0,5	0,5	4	1
isolado 5	11º coleta	1	0,5	0,5	4	1	1
isolado 37	3º coleta	2	0,25	0,25	0,25	4	1
Af 3	ambiental	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,5
isolado 4	11º coleta	1	0,5	1	0,5	4	1
Af 2	clínica	0,5	1	0,25	0,5	2	1
isolado 3	11º coleta	1	1	0,25	0,5	4	1
isolado 6	5º coleta	2	0,5	0,25	0,5	4	4
isolado 2	11º coleta	2	0,5	0,5	0,5	4	0,5
isolado 39	3º coleta	2	0,25	0,25	0,25	2	1
Af 4	ambiental	1	1	0,5	0,25	2	1

Figura 27. Dendograma da análise de microssátelites e valores de MIC das 4 cepas originais e de 10 isolados recuperados do solo (Fonte: arquivo pessoal).

5. Discussão

Acredita-se que as mutações de resistência se desenvolvam quando o isolado é exposto a compostos azólicos, não apenas fármacos, mas qualquer composto dessa natureza (Chowdhary et al, 2014a). Duas rotas de desenvolvimento de resistência, portanto, são possíveis: pacientes em tratamento prolongado com antifúngico azólico e a aplicação de compostos azólicos no meio ambiente (Snelders et al., 2008; Camps et al., 2012a).

Isolados ambientais de *A. fumigatus* já foram descritos como submetidos à pressão seletiva de tais compostos agrícolas (Verweij et al., 2013; Snelders et al., 2012). Embora as características das referidas rotas sejam diferentes, os requisitos fundamentais para qualquer rota de desenvolvimento de resistências a azóis é a mesma: qualquer configuração que reúna ativamente reprodução de *Aspergillus* e compostos azólicos tem um risco de desenvolvimento e pressão seletiva de mutação que confira resistência aos compostos azólicos (Camps et al, 2012; Howard et al, 2013).

Isolados de *A. fumigatus* de ambiente hospitalar e de pacientes com aspergilose invasiva foram comparados por testes de suscetibilidade, investigação dos mecanismos de resistência e testes moleculares de identificação e apresentaram resistência cruzada para: voriconazol, posaconazol, metconazol e tebuconazol e apresentaram mecanismos de resistência aos azóis. Alguns isolados ficaram, geneticamente, agrupados demonstrando que os pacientes podem ter sido colonizados com isolados resistentes do meio ambiente (Snelders et al., 2009).

No presente estudo foram utilizadas 4 cepas de *A. fumigatus*, sensíveis aos compostos azólicos, que foram inoculadas no solo e expostas durante 11 meses, em modelo de horta experimental, à pulverização mensal do fungicida difenoconazol. Foi realizado o cultivo de cebolinha (*Allium schoenoprasum*) na horta experimental por ser um vegetal de alta disponibilidade, fácil cultivo em estufas e crescer o ano todo. Foi utilizado o fungicida a base de difenoconazol por ser um dos triazóis com semelhança quimica aos antifúngicos clínicos, ser de fácil acesso para uso doméstico,

possuir uma meia vida de aproximadamente 55 dias no solo (Wang et al., 2008) e ser utilizado na região agrícola de Rio Claro, onde o experimento foi realizado.

Amostras de solo coletadas mensalmente permitiram a recuperação e isolamento de colônias de *A. fumigatus* para serem submetidas a análises morfológicas e moleculares para confirmação de espécie, análise de microssatélites para comparação da similaridade genética com as cepas originais utilizadas como inóculo, testes de suscetibilidade aos fármacos e fungicidas triazólicos para determinação de MIC e identificação de fenótipos resistentes para seleção de cepas a serem submetidas a busca de mutações no gene cyp51A.

Todos 289 isolados recuperados do solo foram identificados como *A. fumigatus* pelas suas características macromorfológicas e micromorfológicas e submetidos aos testes de suscetibilidade aos compostos azólicos. A utilização de técnicas de biologia molecular de sequenciamento de DNA para confirmação de espécie foi necessária pois é possível ocorrer a identificação incorreta, pois existem espécies diferentes com características macromorfológicas e micromorfológicas iguais (Khare et al., 2014).

A triagem em placas de Petri suplementadas com 2ug/ml de itraconazol foi realizada para aumentar as chances de isolar fenótipos resistentes de *A. fumigatus* das amostras de solo coletadas, mas não foi possível recuperar nenhum isolado de *A. fumigatus* das placas.

Os testes de suscetibilidade aos antifungicos clínicos e fungicidas agrícolas foram realizados primeiramente com as cepas originais para determinar o perfil de cada uma. A busca da resistência foi feita pela pesquisa de alterações nos valores de MIC pela metodologia de microdiluição (CLSI, M38-A2) os valores de MIC tanto para cepas expostas ao fungicida quanto para as cepas não expostas variaram de (0,06 – 2 mg/L) para o itraconazol, (0,012–1 mg/L) para o voriconazol, (0,06–1 mg/L) para o posaconazol, (0,06–0,5 mg/L) para o metconazol, (0,25–4 mg/L) para o tebuconazol e (0,25–4 mg/L) para o difenoconazol. As variações de MIC

encontradas dos fármacos e fungicidas nos isolados recuperados do solo exposto ao fungicida e nos isolados da horta controle, não caracterizam fenótipos de resistência, mas de acordo com os pontos de corte epidemiológico (ECV), propostos pelo documento M59 (CLSI, 2018), 27 isolados da horta exposta ao fungicida foram classificados como não selvagens (*non-wild type*) para o itraconazol, da horta não exposta ao fungicida 15 isolados foram classificados como não selvagens para o itraconazol. Para o voriconazol nenhum isolado ficou acima do ECV estabelecido pelo CLSI, 10 isolados da horta exposta ao fungicida ficaram com MIC igual ao ECV (1mg/L) e da horta não exposta ao fungicida apenas 1 isolado ficou com MIC igual ao ECV (1mg/L) caracterizando-os como selvagens, o CLSI não estabeleceu ECVs de *A. fumigatus* para o posaconazol.

Em estudos realizados com a metodologia de microdiluição em caldo relatam isolados de *A. fumigatus* com MICs elevados frente aos azólicos: VCZ: 2-5µg/mL, ITZ ≥16µg/mL e PCZ: 0,5-1µg/mL. O aumento dos MICs foi investigado por sequenciamento do gene *cyp*51A e foi encontrado uma substituição de aminoácidos no códon (L98H), junto com uma repetição no gene promotor que é responsável pelo fenótipo de resistência aos azólicos. (Verweij et al., 2007). Outro estudo com isolados *A. fumigatus* resistentes a todos os azólicos, os valores de MIC para os farmácos azólicos foram de ≥8µg/mL para ITC; ≥8µg/mL para VCZ e 1µg/mL para PCZ (Moore et al., 2017). Estes estudos demonstram que as mutações encontradas em isolados ambientais e clínicos de *A. fumigatus,* TR34/L98H eTR46/Y121F/T289A apresentam MICs com mais de duas diluições de diferença do ECVs propostos pelo CLSI para classificar uma cepa como *wild type.*

Populações de *A. fumigatus* podem evoluir rapidamente e se distanciar geneticamente em pouco tempo (Araujo et al., 2010). A análise de microssatélites realizada no estudo, com cepas selecionadas de acordo com as alterações nos valores de MICs, permitiu relacionar as cepas recuperadas do solo com as cepas originais utilizadas como inóculo, garantindo que a

comparação dos valores de MIC, antes e depois da exposição ao fungicida, estava sendo feita com isolados descendentes das cepas originais inoculadas no solo.

Apesar dos valores de MIC não serem significativos ao ponto de indicar que os isolados, do presente estudo fossem resistentes, um dos isolados recuperados do solo exposto ao fungicida foi selecionado, porque apresentou menor susceptibilidade, e foi submetido ao sequenciamento de DNA do gene *cyp*51A e sua região promotora, nenhuma mutação foi encontrada. As alterações de MIC encontradas ao longo das 11 pulverizações do fungicida podem estar ligadas a outros mecanismos de resistência não relacionados ao *cyp*51A como o aumento de expressão de bombas de efluxo, incorporação de colesterol exógeno e super expressão do gene *cyp*51B, estima-se que 10% dos casos de resistência aos azólicos não sejam mediados por mutações no gene *cyp*51A (Paul et al., 2013, Xiong et al., 2005, Buied et al., 2013).

Os intervalos de MICs dos antifúngicos clínicos e dos fungicidas agrícolas frente aos isolados da horta exposta e da horta não exposta ao fungicida difenoconazol não apresentaram diferenças significativas, mas a horta exposta ao fungicida apresentou uma quantidade maior de isolados com menor susceptibilidade, sugerindo que a exposição ao fungicida pode ter afetado a população de *A. fumigatus*, alterando o perfil de susceptibilidade do total de isolados expostos frente aos antifúngicos clínicos e aos fungicidas agrícolas avaliados neste trabalho. Na literatura alguns trabalhos avaliam o impacto da exposição de *A. fumigatus* aos fungicidas triazólicos e indicam que o fenômeno de resistência pode estar ligado a diversos fatores como o tipo de exposição, tipo de fungicida e concentração do fungicida. Zhang e colaboradores (2017) isolaram *A. fumigatus* resistentes aos azóis de montes de compostagem contendo resíduos de fungicidas e de montes de compostagem sem resíduos de fungicidas, a proporção de resistência foi diferente entre os dois compostos, com 91% (41/45 colônias) com resistência no composto contendo azóis em comparação com apenas 2% (1/50) no composto sem azol. Em outro

trabalho Cui e colaboradores (2018) avaliaram se a exposição ao tebuconazol, em meio liquido e solo, poderia induzir a resistência em *A. fumigatus* por mutações no gene *cyp*51A. Os resultados indicaram que a resistência com mutações TR46/Y121F/T289A pode ser induzida por tebuconazol em meio líquido, e no solo tratado com tebuconazol foram isolados cepas resistentes, mas sem mutações no *cyp*51A, sendo que em alguns isolados a resistência foi causada por superexpressão de bombas de efluxo AtrF e AfuMDR1 e dos genes *cyp*51A e *cyp*51B. A indução de resistência em *A. fumigatus* após a exposição ao fungicida tetraconazol, também, já foi estudada e isolados se tornaram resistentes ao fungicida. No entanto, não apresentaram resistência aos antifúngicos ITZ, VCZ e PCZ e nenhuma mutação foi detectada no gene *cyp*51A. Por outro lado, testes de expressão gênica indicaram que os isolados resistentes ao tetraconazol expressavam mais os genes *cyp*51A e *cyp*51B do que os isolados suscetíveis (Kano et al., 2016). Cao e colaboradores (2019) realizarm um estudo para testar se a resistência em *A. fumigatus* e mutações no *cyp*51A poderiam ser induzidas por propiconazol em meio líquido e solo. Os resultados indicaram que o propiconazol pode induzir resistência pela alteração pontual G138S no *cyp*51A e por superexpressão do *cyp*51A, AfuMDR3 e AfuMDR4. Sendo que o surgimento de isolados resistentes no solo tratado com propiconazol foi muito maior quando utilizado dosagens maiores do que a recomendada.

Os resultados destes trabalhos confirmam que as diferenças de perfil de susceptibilidade de *A. fumigatus*, após a exposição aos fungicidas azólicos, podem ocorrer por outros mecanismos de resistência que não estão ligados a repetições em *tandem* na região promotora do gene *cyp*51A, e nem a mutações na região codificadora do gene, esses mecanismos de resistência são importantes e podem ser avaliados para uma melhor compreensão do fenômeno de resistência e comportamento do *A. fumigatus* ao ser exposto aos fungicidas azólicos. Outros fatores como o tipo de fungicida, concentração do princípio ativo e origem genética da cepa de *A.*

fumigatus são variáveis importantes que podem ser fundamentais para a pressão seletiva de fenótipos resistentes.

O presente estudo possuiu algumas limitações, pois não foi possível avaliar outros mecanismos de resistência não ligados ao gene *cyp*51A e também existe a possibilidade de que algum *A. fumigatus* resistente possa ter surgido, mas não foi recuperado das amostras de solo pela metodologia utilizada.

6. Conclusão

Ao longo de um ano, 11 pulverizações e recuperações mensais dos 4 isolados a partir de amostras de solo permitiram monitorar possível emergência de resistência aos triazólicos: difenoconazol, metconazol, tebuconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. A busca da resistência foi feita pela pesquisa de mutações gênicas que não foi encontrada. A determinação de MIC, tanto de fungicidas quanto de fármacos triazólicos, frente a isolados, expostos e recuperados até o 11º mês não apresentou variações significantes. A triagem de fenótipos resistentes com placas de ágar Mueller Hinton com 2 mg/L de itraconazol não selecionou nenhuma colônia de *A. fumigatus.*

O gene *cyp*51A sequenciado para um dos isolados, com maiores valores de MIC, não apresentou mutações, indicando que as variações de MIC encontradas não estão relacionadas a mutações no *cyp*51A. Por técnica de microssatélite, os isolados recuperados do solo foram similares as cepas semeadas. Conclui-se que a pulverização de difenoconazol não resultou em alteração significativa de MIC de triazóis nas cepas expostas indicando que não houve seleção de fenótipos resistentes. Outra possibilidade é que, de fato, o tempo de exposição, ou volume/concentração de fungicida não foram suficientes para pressão seletiva de resistência fúngica.

7. Referências Bibliográficas

Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol. 2010; 27: 155–182.

Abdolrasouli A, Rhodes J, Beale MA, Hagen F, Rogers TR, Chowdhary A, Meis JF, Armstrong-James D, Fisher MC. Genomic context of azole resistance mutations in *Aspergillus fumigatus* determined using whole-genome sequencing. MBio. 2015; 6, e00536.

Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62**:** 35–54.

Alanio A. and Bretagne S. Challenges in microbiological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections (version 1; referees: 2 approved) F1000 Research 2017; 6(F1000 Faculty Rev):157 (doi: 10.12688/f1000research.10216.1)

Anastasi A, Varese GC, Marchisio VF. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. Mycologia. 2005; 97: 33–44.

Albarrag AM, Anderson MJ, Howard SJ, Robson GD, Warn PA, Sanglard D, et al. Interrogation of related clinical pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains: G138C, Y431C, and G434C single nucleotide poly morphismsin *cyp51A*, up regulation of *cyp51A*, and integration and activation of transpos on *Aft1* in the *cyp51A* promoter. Antimicrob. Agents Chemother 2011; 55,5113–5121. doi:10.1128/AAC.00517-11

Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, and Rodriguez-Tudela J. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence based identification. Antimicrob.Agents Chemother. 2008; 52, 1244 –1251.doi:10.1128/AAC.00942-07

Alastruey-Izquierdo A, Melhem MSC, Bonfietti LX, et al. Susceptibility test for fungi: Clinical and Laboratorial correlations in Medical Mycology. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2015; 19:57-64

Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, and Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. Mycopathologia. 2014; 178, 427–433. doi:10.1007/s11046-014-9775-z

Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Garcia-Effron G, Lopez JF, Grimalt JO, Cuenca-Estrella J M, et al. (2008b). Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. Steroids 73,339 –347.doi: 10.1016/j.steroids. 2007; 11.005

Alvarez-Moreno C, Lavergne RA, Hagen F, Morio F, Meis JF, & Le Pape P. (2017). Azole-resistant Aspergillus fumigatus harboring TR 34/L98H, TR 46/Y121F/T289A and TR 53 mutations related to flower fields in Colombia. *Scientific reports*, *7*, 45631.

Araujo R, Amorim A, Gusmao L. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. Med Mycol. 2010;48(6):832-8.

Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.2. 2020;23.

Ashu EE, Hagen F, Chowdhary A, Meis JF, Xu J. Global population genetic analysis of *Aspergillus fumigatus.* MSphere. 2017; 2: e00019-17. https://doi.org/10.1128/mSphere.00019-17.

Astvad KM, Jensen RH, Hassan TM, Mathiasen EG, Thomsen GM, Pedersen UG, Christensen M, Hilberg O, Arendrup MC. First detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naive patients in Denmark despite negative findings in the environment. Antimicrob. Agents Chemother. 2014; 58, 5096–5101.

Azevedo MM, Ramos IF, Cruz LC, et al. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. J Agric Food Chem. 2015; 63(34):7463−8

Azzola A, Passweg JR, Habicht JM, Bubendorf L, Tamm M, Gratwohl A, Eich G. Use of lung resection and voriconazole for successful treatment of invasive pulmonary *Aspergillus ustus* infection. J. Clin. Microbiol. 2004; 42, 4805–4808.

Baddley JW, Stephens JM, Gao X, Ji X, Schlamm HT, Tarallo M. Aspergillosis in Intensive Care Unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes, BMC Infectious Diseases. 2013; 13(29).

Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, Ito JI, Balajee SA, Pappas PG, Moser SA. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the transplant-associated infection surveillance network. J. Clin. Microbiol. 2009, 47, 3271–3275.

Balajee S, Houbraken J, Verweij P, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, Samson R. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Studies in Mycology. 2007; 59, pp. 39-46

Bastos VR, Santos DW, Padovan AC, Melo AS, Mazzolin Mde A, Camargo LF, Colombo AL. Early invasive pulmonary aspergillosis in a kidney

transplant recipient caused by *Aspergillus* lentulus: First brazilian report. Mycopathologia. 2015; 179, 299–305.

Bayry J, Aimanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latge´ JP. Hydrophobins-unique fungal proteins. PLoS Pathog. 2012; 8: e1002700. doi:10.1371/ journal. ppat.1002700.

Becher R, and Wirsel SGR. Fungal cytochrome P450 Sterol 14a-Demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012; 95,825–840. doi:10.1007/s00253-012-4195-9

Beever RE, Dempsey GP. Function of rodlets on the surface of fungal spores. Nature. 1978; 272: 608–610.

Beisswenger C, Hess C, Bals R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon-b signalling in respiratory epithelial cells, European Respiratory Journal. 2012; 39, pp. 411–418.

Berger S, El Chazli Y, Babu AF and Coste AT. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? Front. Microbiol. 2017; 8:1024. doi: 10.3389/fmicb.2017.01024

Bhabhra R. e Askew DS. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus, Med Mycol. 2005; 43(1), pp. 87-93.

Bhabhra R, Miley MD, Mylonakis E, et al. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. Infect Immun. 2004; 72: 4731–40.

Brent K. & Hollomon D. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Fungicide Resistance Action Committee. 2007; 2nd edition.

Brakhage AA, Langfelder K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. Annu Rev Microbiol. 2002; 56: 433–455.

Brakhage AA, Liebmann B. *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. Med Mycol. 2005; 43: S75–82.

Buied A, Moore CB, Denning DW, and Bowyer P. High-level expression of cyp51B in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. J. Antimicrob. Chemother.2013; 68, 512–514. doi:10.1093/jac/dks451

Burns C, Geraghty R, Neville C, Murphy A, Kavanagh K, et al. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol. 2005; 42: 319–327.

Camps SM, Dutilh BE, Arendrup MC et al. Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing. PLoS ONE. 2012; 7(11), e50034.

Camps SM, van der Linden JW, Li Y, et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:10–6.

Cao D, Yao S, Zhang H, Wang S, Jin X, Lin D, et al. Mutation in cyp51A and high expression of efflux pump gene of *Aspergillus fumigatus* induced by propiconazole in liquid medium and soil. Environ Pollut. 2020 Jan 1; 256:113385.

Casselton L, Zolan M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. Nat Rev Genet 2002; 3: 683–97.

Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes, Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2010; 66, pp. 457–465.

Chang H, Ashu E, Sharma C, Kathuria S, Chowdhary A, Xu J. Diversity and origins of indian multi-triazole resistant strains of *Aspergillus fumigatus*. Mycoses. 2016; 59, 450–466.

Chen Y, Wang H, Lu Z, Li P, Zhang Q, Jia T, Zhao J, Tian S, Han X, Chen F, et al. Emergence of TR46/Y121F/T289A in an *Aspergillus fumigatus* isolate from a Chinese patient. Antimicrob. Agents Chemother. 2015; 59, 7148–7150.

Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Sharma C, Sundar G, Singh PK, Meis JF, et al. Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant Aspergillus fumigatus strains carrying the TR34/L98H mutations in the cyp51A gene in India. 2012; *PLoS One*, *7*(12), e52871.

Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. PLoS Pathog. 2013; 9, e1003633.

Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, Meis JF. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. Future Microbiol. 2014; 9:697–711.

Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, Hagen F, Meis JF. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. J. Antimicrob. Chemother. 2014; 69, 555–557.

Cohen J, Postma DS, Douma WR, Vonk JM, De Boer AH, et al. Particle size matters: diagnostics and treatment of small airways involvement in asthma. Eur Respir J. 2011; 37: 532–540.

Coleman JJ, Mylonakis E. Efflux in fungi: la pièce de résistance. PLoS Pathog. 2009; 5(6), e1000486.

Collier L, Balows A, Sussman M. Microbiology and Microbial infections. 1998; 9th edn. New York: Arnold Publisher.

Cui N, He Y, Yao S, Zhang H, Ren J, Fang H, et al. Tebuconazole induces triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* in liquid medium and soil. Sci Total Environ. 2019 Jan; 648:1237–43.

Dagenais T, Keller N. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. Clinical Microbiology Reviews. 2009; 22:3, pp. 447-465

Darwin C. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. 1859; 1st ed. John Murray, Albemarle Street, London.

Denning DW, Bowyer P. Voriconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Should we be concerned? Clin. Infect. Dis. 2013; 57, 521–523.

Denning DW, Perlin DS. Azole resistance in *Aspergillus*: A growing public health menace. Future Microbiol.2011; 6, 1229–1232.

Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. Bull. World Health Organ. 2011; 89, 864–872.

de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4112-20.

Dyer PS, O‘Gorman CM. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. FEMMS Microbiol Rev. 2012; 36: 165–92.

Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, & Rodriguez-Tudela JL. A new Aspergillus fumigatus resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007; *51*(6), 1897-1904.

European Centre for Disease Control (ECDC). Technical report: risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species, 2013.

Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Triazoles and Six *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document). J Clin Microbiol. 2010; 48(9):3251–7

Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. J. Cell Sci. 2006; 119(Pt 6), 973–976.

Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 2007; 41, 401–427.

Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, Vehreschild MJ, Wisplinghoff H, Kronke M, Hamprecht A. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. Isolates from german cystic fibrosis patients. J. Antimicrob. Chemother. 2014; 69, 1533–1536.

Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, et al. The cdr1B efflux transporter is associated with Non-cyp51a-mediated

itracon azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. J. Antimicrob. Chemother. 2013; 68,1486–1496. doi:10.1093/jac/dkt075

Frisvad JC & Larsen TO. Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and Other Pathogenic Species in *Aspergillus Section Fumigati.* Frontiers in Microbiology. 2016; Vol.6.:1485. doi: 10.3389/fmicb.2015.01485

Frisvad JC, Samson RA. Chemotaxonomy and morphology of *Aspergillus fumigatus* and related taxa. In: Samson RA, Pitt JI, editors. Modern concepts in Penicillium and *Aspergillus* classification. New York: Plenum Press. 1990; pp. 201–208.

Fortún J, Meije Y, Fresco G, et al. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamento. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2012; 4, p. 201-208.

Fuhren J, Voskuil WS, Boel CH, Haas PJ, Hagen F, Meis JF, Kusters JG, High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from high-risk patients. J. Antimicrob. Chemother. 2015; 70, 2894–2898.

Gavier-Widen D, Duff J P, Meredith A. *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe.* Oxford: Wiley-Blackwell.2012.

Gibbons JG, Beauvais A, Beau R, McGary KL, Latge´ JP, et al. Global transcriptome changes underlying colony growth in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell. 2012; 11: 68–78.

Gisi U. Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: a critical review. Pest, Manag, Sci. 2014; 70**,** 352–64.

Glass NL, Donaldson GC. Development of premier sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology. 1995; 61: 1323–1330.

Goncalves SS, Souza, AC, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL, Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in Candida and *Aspergillus*. Mycoses 2016.

Goncalves SS, Stchigel AM, Cano J, Guarro J, Colombo AL. In vitro antifungal susceptibility of clinically relevant species belonging to *Aspergillus* section flavi. Antimicrob. Agents Chemother. 2013; 57,1944–1947.

Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA, Chandrasekar PH, Fox B, Kaizer H, Powderly WG, et al. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. New England Journal of Medicine. 1992; 326(13), 845-851.

Gregson L, Goodwin J, Johnson A, McEntee L, Moore CB, Richardson M, Hope WW, Howard SJ, In vitro susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to isavuconazole: Correlation with itraconazole, voriconazole, and posaconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 2013; 57, 5778–5780.

Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Differences and Similarities Amongst Pathogenic *Aspergillus* Species. In: Comarú Pasqualotto A, editor. Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention. Dordrecht: Springer Netherlands. 2009; p.7–32.

Guinea J, Recio S, Peláez T, et al. Clinical Isolates of *Aspergillus* Species Remain Fully Susceptible to Voriconazole in the Post-Voriconazole Era. Antimicrob Agents and Chemother. 2008; 52(9):3444–6

Hajjeh RA, Warnock DW. Counterpoint: Invasive Aspergillosis and the Environment - Rethinking Our Approach to Prevention. Clin Infect Dis. 2001; 33(9):1549–52

Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, Lee YJ, Makizumi Y, Akutsu K, et al. Tandem repeat of a transcriptional enhancer up stream of the sterol 14a-demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. Appl.Environ. Microbiol. 2000; 66,3421–3426.doi:10.1128/AEM.66.8.3421-3426.

de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of Aspergillus fumigatus isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; *43*(8), 4112-4120.

Harrison E, Stalhberger T, Whelan R, *et al. Aspergillus* DNA contamination in blood collection tubes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 67(4): 392–4.

Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Goldman G.H. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. Front. Microbiol. 2016; 7: 1382.doi:10.3389/fmicb.2016.01382

Hong SB, Go SJ, Shin HD, et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia. 2005; 97: 1316–1329.

Hoog GS de, Gerrits van den Ende AH. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. Mycoses. 1998; 41: 183–189.

Herbrecht R, Natarajan-Ame S, Letscher-Bru V, Canuet M. Invasive pulmonary aspergillosis, Semin Respir Crit Care Med. 2004; 25(2), pp.191-202.

Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang X-C, Meijer M, et al. Classification of Aspergillus, Penicillium, Talaromyces and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Stud Mycol. 2020.

Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Advances in Applied Microbiology. 2014; Vol. 86, p. 199-249.

Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC. Rasamsonia, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic Talaromyces and Geosmithia species. Antonie van Leeuwenhoek. 2012; 101: 403–421.

Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. Emerg. Infect. Dis. 2009; 15, 1068–1076.

Howard SJ, Arendrup MC, Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: Epidemiology and detection. Med. Mycol. 2011, 49, S90–S95.

Howard SJ, Pasqualotto AC, Anderson MJ, et al. Major variations in *Aspergillus fumigatus* arising within aspergillomas in chronic pulmonary aspergillosis. Mycoses 2013; 56:434–41.

Ingham CJ, Kalisman O, Finkelshtein A, Ben-Jacob E. Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium Paenibacillus vortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108: 19731– 19736.

Jensen HL. The fungus flora of the soil. Soil Science. 1931; 31: 123–158.

Jiang Z, Wang Y, Jiang Y, Xu Y, Meng B. Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to *Aspergillus nidulans* resulting in spinal cord compression: Case report and literature review. Journal of International Medical Research. 2013; Vol.41, n. 2, p. 502-510.

Kano R, Sobukawa H, Murayama SY, Hirose D, Tanaka Y, Kosuge Y, et al. In vitro resistance of *Aspergillus fumigatus* to azole farm fungicide. J Infect Chemother. 2016;22(3):133-6.

Kontoyiannis DP, Boktour H, Hanna HA, Torres R, Hachem and Raad II, "Itraconazole added to a lipid formulation of amphotericin B does not improve outcome of primary treatment of invasive aspergillosis." Cancer. 2005; 103(11): 2334-7.

Koss T, Bagheri B, Zeana C, Romagnoli MF, Grossman ME, Amphotericin B-resistant *Aspergillus* flavus infection successfully treated with caspofungin, a novel antifungal agent. J. Am. Acad. Dermatol. 2002; 46, 945–947.

Krijgsheld P, Bleichrodt R, Van Veluw G, Wang F, Müller W, Dijksterhuis J, Wösten H. Development in *Aspergillus*. Studies in Mycology. 2013; 74:1, pp. 1-29

Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH, *Aspergillus flavus*: An emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. Mycoses. 2009; 52, 206–222.

Krishnan-Natesan S, Wu W, Cutright JL, and Chandrasekar PH. *In vitro - in vivo* correlation of voriconazole resistance due to G448S mutation (cyp51A Gene) in *Aspergillus fumigatus*. Diagn.Microbiol.Infect.Dis. 2012; 74, 272–277. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.030

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992; 823 p

Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? PLoS Pathog. 2013; 9(12): e1003743. doi: 10.1371/journal.ppat.1003743

Lamoth, F. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. Front. Microbiol. 2016; 7, 683.

Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen ME, Samson RA, and Frisvad JC. Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species insection *Fumigati*. Med. Mycol. 2007; 45,225–232. doi:10.1080/13693780601185939

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clinical Microbiology Reviews. 1999; 12:2, pp. 310–350

Latgé JP, Steinbach W. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. France: ASM Press, 2009.

Lass-Florl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, Freund M, Kropshofer G, Dierich MP, Nachbaur D. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. Br. J. Haematol. 2005; 131, 201–207.

Lass-Florl C, Perkhofer S. In vitro susceptibility-testing in *Aspergillus* species. Mycoses. 2008; 51, 437–446.

Lavergne RA, Morio F, Favennec L, Dominique S, Meis JF, Gargala G, Verweij PE, Le Pape P. First description of azole-resistant *Aspergillus*

fumigatus due to TR46/Y121F/T289A mutation in france. Antimicrob. Agents Chemother. 2015; 59, 4331–4335.

Lazzarini C, Esposto MC, Prigitano A, Cogliati M, De Lorenzis G, Tortorano AM. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates from an italian culture collection. Antimicrob. Agents Chemother. 2015; 60, 682–685.

Lepak AJ, Marchillo K, Vanhecker J, Andes DR. Isavuconazole (BAL4815) pharmacodynamic target determination in an in vivo murine model of invasive pulmonary aspergillosis against wild-type and CYP51 mutant isolates of *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2013; 57, 6284–6289.

Le Pape P, Lavergne RA, Morio F, Alvarez-Moreno C. Multiple fungicide-driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, colombia, 2015. Emerg. Infect. Dis. 2016; 22, 156–157.

Lelièvre L, Groh M, Angebault C, Maherault AC, Didier E, and Bougnoux, M.E.). Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. Med. Mal. Infect. 2013; 43,139–145. doi: 10.1016/j.medmal.2013.02.010

Lescar J, Meyer I, Akshita K, Srinivasaraghavan K, Verma C, Palous M, et al. *Aspergillus fumigatus* harboring the sole Y121F mutation shows decreased susceptibility to voriconazole but maintained susceptibility to itraconazole and posaconazole. J. Antimicrob. Chemother. 2014; 69,3244–3247. doi: 10.1093/jac/dku316

Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerse II subunit. Molecular Biology and Evolution. 1999; 16: 1799–1808.

Lockhart SR, Beer K, Toda M. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*: What You Need To Know. Clin Microbiol Newsl. 2020 Jan 1;42(1):1–6.

Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, et al.: Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). Clin Microbiol Infect. 2011; 17(12): 1882–9.

López-Medrano F, Fernández-Ruiz M, Silva JT, *et al.*: Clinical Presentation and Determinants of Mortality of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Kidney Transplant Recipients: A Multinational Cohort Study. *Am J Transplant.* 2016; 16(11): 3220–34.

Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, Mendrick CA, Li X, Loebenberg D, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a singlea mino acid in the cytochrome P450 14 a-demethylase. Antimicrob.Agents Chemother. 2003; 47, 577–581.doi:10.1128/AAC.47.2.577-581.

Marr KA, Seidel K, Slavin MA, Bowden RA, Schoch HG, Flowers ME, Boeckh M. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. Blood. 2000; 96(6), 2055-2061.

Martel CM, Parker JE, Warrilow AGS, Rolley NJ, Kelly SL, and Kelly DE. Complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* ERG11/CYP51 (sterol14a-demethylase) doxycycline regulated mutant and screening of the azole sensitivity of *Aspergillus fumigatus* isoenzymes CYP51A and CYP51B. Antimicrob.Agents Chemother. 2010;54,4920– 4923.doi:10.1128/AAC.00349-10

Martins JEC, Melo NT, Heins-Vaccari EM. *Atlas de Microbiologia Média,* Copyright, Editora Manole Ltda. 2005; pp. 39-45.

Masclaux F, Gu_eho E, Hoog GS de et al. Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (Xylohypha) species inferred from partial LS rRNA sequences. Medical Mycology. 1995; 33: 327–338.

McDonagh A, Fedorova ND, Crabtree J, Yu Y, Kim S, et al. Subtelomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. PLoS Pathog 4. 2008; e1000154. doi: 10.1371/journal.ppat.1000154.

Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14- sterol demethylase-related genes (CYP51A and CYP51B) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. J. Clin. Microbiol. 2001; 39, 2431–2438.

Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of CYP51A alterations. Antimicrob. Agents Chemother. 2007; 51,1897–1904.

Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, and Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14a – sterol demethylase (*cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance *in vitro* to azole antifungal drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48, 2747–2750.doi:10.1128/AAC.48.7.2747-2750.2004

Millon L, Grenouillet F, Crouzet J, et al. False-positive *Aspergillus* real-time PCR assay due to a nutritional supplement in a bone marrow transplant recipient with GVH disease. Med Mycol. 2010; 48(4): 661–4.

Minami PS. Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico Das Micoses, Copyright, Editora Manole Brasil. 2003; pp. 47-50.

Moore CB, Novak-Frazer L, Muldoon E, Dunn KW, Masania R, Richardson MD, et al. First isolation of the pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus cyp51A* TR46/Y121F/T289A mutant in a UK patient. Int J Antimicrob Agents. 2017;49(4):512-4.

Moye-Rowley WS. Multiple mechanisms contribute to the development of clinically significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Front. Microbiol. 2015; 6, 70.

Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, Leatherbarrow H, Mellado E, Arendrup MC. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: A laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. J. Clin. Microbiol. 2011; 49, 2243–2251.

Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46, 556–557.

Mosquera J, Warn PA, Morrissey J, Moore CB, Gil-Lamaignere C, Denning DW. Susceptibility testing of *Aspergillus flavus*: inoculum dependence with itraconazole and lack of correlation between susceptibility to amphotericin B in vitro and outcome in vivo. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45, 1456–1462.

Murray PR, Rossenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia: Médica, 5º edição, Elsevier Editora Ltda. 2006; pp. 770-773.

Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SA, Delmas G, Oza U, Lolans K, Dudley MN, Mann PA, Perlin DS. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47, 1719–1726.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, Approved standard M38-A. 2002.

Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PT, Colombo AL. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: Prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. J. Clin. Microbiol. 2014; 52, 3633–3640.

Neofytos D, Treadway S, Ostrander D, Alonso CD, Dierberg KL, Nussenblatt V, Marr KA. Epidemiology, outcomes, and mortality of invasive mold infections among transplant recipients: a 10-year, single-center experience. Transplant Infections Disease. 2013; 15(3), 233-242.

Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Marr K. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. Clinical Infectious Diseases. 2009; 48(3), 265-273.

Nicolle MC, Benet T, Vanhems P. Aspergillosis: Nosocomial or community-acquired? Med. Mycol. 2011; 49, S24–S29.

Nierman WC, May G, Kim HS, Anderson MJ, Chen D, et al. What the *Aspergillus* genomes have told us. Med Mycol 43. 2005; Suppl 1: S3–5.

Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2005; 438: 1151 – 6.

Nucci M, Anaissie E. Emerging fungi. Infect Dis Clin North Am. 2006; Sep; 20(3): 563-579

O‘ Gorman CM, Fuller HT, and Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2009; 457, 471–474. doi:10.1038/nature07528

Oliveira M, Caramalho R. *Aspergillus fumigatus*: a mere bioaerosol or a powerful biohazard? NACC Bioloxia. 2014; 21: 57–64.

Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Martino B, Specchia G, Pastore D, Stanzani M, Cattaneo C, Fanci R, et al. Invasive aspergillosis in patients with acute myeloid leukemia: A seifem-2008 registry study. Haematologica 2010; 95, 644–650.

Panackal AA, Li H, Kontoyiannis DP, et al. Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis 2010; 50:1588–97.

Pasqualotto A. Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention. Springer. 2010; pp. 1- 1027. ISBN 978-90-481-2408-4

Paul S, Diekema D, Moye-Rowley WS. Contributions of *Aspergillus fumigatus* ATP-binding cassette transporter proteins to drug resistance and virulence. Eukaryotic Cell. 2013; 12,1619–1628.doi:10.1128/EC.00171-13

Paul S, Klutts JS, Moye-Rowleya WS. Analysis of promoter function in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot.Cell. 2012; 11,1167–1177. doi: 10.1128/EC.00174-12

Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JF, Lockhart SR. Passive surveillance for azole resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. Emerg Infect Dis 2014; 20:1498–503.

Patterson, Thomas F, et al. "Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America." Clinical Infectious Diseases. 2016; *63.4*: e1-e60.

Pelaez T, Monteiro MC, Garcia-Rubio R, Bouza E, Gomez-Lopez A, Mellado E. First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to CYP51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naive patient in spain. New Microbes New Infect. 2015. 6, 33–34.

Peláez T, Álvarez-Pérez S, Mellado E, et al. Invasive aspergillosis caused by cryptic *Aspergillus* species: a report of two consecutive episodes in a patient with leukaemia. J Med Microbiol. 2012; 62(Pt3):474–478

Peterson SW, Vega FE, Posada F, et al. *Penicillium* coffeae, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. Mycologia. 2005; 97: 659–666.

Pringle A, Baker DM, Platt JL, Wares JP, Latg é, JP & Taylor JW. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. Evolution. 2005; 59: 1886 – 99.

Pontecorvo G. The parasexual cycle in fungi. Annu Rev Microbiol 1956; 10: 393–400.

Qiao J, Liu W, Li, R. Antifungal Resistance Mechanisms of *Aspergillus.* Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2008; 49(3):157-63

Ren J, Jin X, Zhang Q, Zheng Y, Lin D, and Yu Y. (2017). Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. J. Hazard. Mater. 2016; 326, 54–60.

Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection Diagnosis and Management, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd. 2003.

Saballs-Radresa P, Lopez-Colomes J. Gimeno-Cobos and H. Knobel. "(Invasive aspergillosis: treatment)." Rev Iberoam Micol. 2000; 17(3): S93-6.

Samarakoon P, Soubani AO. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. Chron Respir Dis. 2008; 5(1):19-27.

Samson RA, Hong SB, and Frisvad JC. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. Med. Mycol. 2006; 44, S133–S144. doi: 10.1080/13693780600913224

Samson RA, Hong SB, Peterson SW, Frisvad JC, and Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. Stud. Mycol. 2007; 59, 147–203. doi:10.3114/sim.2007.59.14

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaasen CH. W, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus* Stud. Mycol.2014; 78:141-173. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004

Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal- Resistant Fungal Pathogens. Front Med. 2016; 3:11

SAST - Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of

Clinical Microbiology and Infectious Diseases, (2007). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.

Scaglione F. Evoluzione dei farmaci - Antmivotici, Italy: Elsevier. 2009.

Seyedmousavi S, Bruggemann RJ, Meis JF, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Pharmacodynamics of isavuconazole in an *Aspergillus fumigatus* mouse infection model. Antimicrob. Agents Chemother. 2015; 59, 2855–2866.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2011; 75, 213–267.

Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med. 2008; 5: e219.

Snelders, E. *et al.* Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medica triazoles. Appl. Environ. Microbiol. 2009; **75,** 4053–7, doi: 10.1128/AEM.00231-09.

Snelders E, Karawajczyk A, Verhoeven RJA, Venselaar H, Schaftenaar G, Verweij PE, et al. The structure-function relationship of the *Aspergillus fumigatus cyp51A* L98H conversion by site-directed mutagenesis: the mechanism of L98H azole resistance. Fungal Genet. Biol 2011; 48,1062–1070. doi: 10.1016/j.fgb.2011.08.002

Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A, et al. Triazole fungicides can induce crossresistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. PLoS One. 2012; 7: e31801.

Snelders, E, Camps SMT, Karawajczyk A, Rijs AJMM, Zoll J, Verweij PE, et al. Genotype-phenotype complexity of the TR46/Y121F/T289A *cyp51A* azole resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet .Biol. 2015; 82,129–135. doi:10.1016/j.fgb.2015.06.001

Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche H. U, Horn DL, Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. Journal of Infection. 2012; *65*(5), 453-464.

Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild MJ, Cornely OA, Buchheidt D, Spiess B, et al. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in hsct recipients in germany. J. Antimicrob. Chemother. 2015; 70, 1522–1526.

Stromnas O, Garber ED. Heterocaryosis and the parasexual cycle in *Aspergillus fumigatus*. Genetics. 1963; 48: 653–62.

Sugui JA, Losada L, Wang W, Varga J, Ngamskulrungroj P, et al. Identification and characterization of *Aspergillus fumigatus* ‗supermater‘ pair. mBio. 2011; 2: e00234–11. doi:10.1128/mBio.00234-11.

Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Zarember KA, Nardone G, et al. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. Eukaryot Cell. 2007; 6: 1562–1569.

Swilaiman SS, O‘ Gorman CM, Balajee SA, and Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. Eukaryotic Cell. 2013; 12, 962–969. doi:10.1128/EC.00040-13

Tamiya H, Ochiai E, Kikuchi K, Yahiro M, Toyotome T, Watanabe A, et al. Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *A. lentulus*, *A. udagawae*, and *A.*

viridinutans. Journal of Infection and Chemotherapy. 2015; 21,385–391. doi: 10.1016/j.jiac.2015.01.005

Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, et al. Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2012; 56, 4870–4875.

Tekaia F, Latge´ J-P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? Curr Opin Microbiol. 2005; 8: 385–392.

Tsai HF, Wheeler MH, Chang YC, Kwon-Chung KJ. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. J Bacteriol. 1999; 181: 6469–6477.

Van Der Linden JW, Camps SMT, Kampinga GA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. Clinical Infectious Diseases. 2013; 57(4), p. 513-520.

Van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, Chryssanthou E, Mellado E, Kidd SE, Tortorano AM, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Emerg. Infect. Dis. 2015; 21, 1041–1044.

Van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJ, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ, Kuijper EJ, Van Tiel FH, Melchers WJ, Verweij PE. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, the netherlands, 2007–2009. Emerg. Infect. Dis. 2011; 17, 1846–1854.

Van Ingen J, van der Lee HA, Rijs TA, Zoll J, Leenstra T, Melchers WJ, Verweij PE. Azole, polyene and echinocandin mic distributions for wild-type,

TR34/L98H AND TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in The Netherlands. J. Antimicrob. Chemother. 2015; 70, 178–181.

Vergidis P, Razonable RR, Wheat LJ, et al.: Reduction in false-positive *Aspergillus* serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the United States. J Clin Microbiol. 2014; 52(6): 2199–201.

Vermeulen E, Lagrou K, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A growing public health concern. Curr. Opin. Infect. Dis. 2013; 26, 493–500.

Verweij PE, et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2016a; 62(3): p. 362-8.

Verweij PE, Zhang J, Debets AJ, et al. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. Lancet Infect Dis. 2016b; 16(11): e251–e260.

Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, Arendrup MC Bruggemann RJ, Chowdhary, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. Drug Resist. Updat. 2015; 21–22, 30–40.

Verweij PE, Kema GH, Zwaan B, Melchers WJ. Triazole fungicides and the selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic mould *Aspergillus fumigatus*. Pest Manag Sci. 2013; 69:165–70.

Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect. Dis. 2009; 9, 789–795.

Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJG. Azole-resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints. Drug Resist Updat. 2009; 12(6):141–7

Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. N Engl J Med. 356. United States. 2007. p. 1481-3.

Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2008; 46(3):327-60. http://dx.doi.org/10.1086/525258

Wang ZH, Yang T, Qin DM, Gong Y, Ji Y. Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage and soil. Chin Chem Lett. 2008 Aug;19(8):969–72.

Warrilow AGS, Parker JE, Price CL, Nes WD, Kelly SL, and Kelly DE. (2. *In vitro* biochemical study of CYP51-mediated azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2015; 59, 7771–7778. doi: 10.1128/AAC.01806-15

Warris A, Voss A, Verweij PE. Hospital sources of *Aspergillus*: New routes of transmission? Rev. Iberoam. Micol. 2001; 18, 156–162.

Warris A. Azole-resistant aspergillosis. Journal of Infection ou JI. 2015; 71:121-125. Jun;71 Suppl1: S121-5.

Wasylnka JA, Simmer MI, Moore MM. Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. Microbiology. 2001; 147: 869– 877.

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

Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Thorax. 2015; 70(3):270-7. http://dx.doi.org/10.1136/ thoraxjnl-2014-206291

Xiong Q, Hassan SA, Wilson WK *et al.* Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother*.* 2005; 49(2), 518–524.

Zhang J, Snelders E, Zwaan BJ, Schoustra SE, Meis JF, van Dijk K, et al. A Novel Environmental Azole Resistance Mutation in *Aspergillus fumigatus* and a Possible Role of Sexual Reproduction in Its Emergence. Chiller T, editor. mBio. 2017 Jul 5;8(3): e00791-17, /mbio/8/3/e00791-17.atom.

Zhang J, Debets AJ, Verweij PE, Melchers WJ, Zwaan BJ, Schoustra SE. Asexual sporulation facilitates adaptation: The emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Evolution*.* 2015; 69: 2573–86.

Zoller Z, Valente C, Baker K. e Klepser M. E. Development, clinical utility, and place in therapy of posaconazole for prevention and treatment of invasive fungal infections*,* Drug Design, Development and Therapy. 2010; 4, pp. 299–311.