

GABRIEL MANZI OLIBONI

**Identificação e perfil de sensibilidade de *Aspergillus*  
spp. presente no ar atmosférico**

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

São Paulo

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Oliboni, Gabriel Manzi

Identificação e perfil de sensibilidade de *Aspergillus* spp. presente no ar atmosférico / Gabriel Manzi Oliboni - 2022.

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, 2022.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública

Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

1. *Aspergillus*. 2. Testes de sensibilidade microbiana. 3. Amostras de ar. 4. Resistência cruzada. 5. Identificação molecular.

SES/CCD/CD - 446/2022

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, Paulo Roberto Oliboni, Angela de Campos Manzi Oliboni e Laura Manzi Oliboni por ter me dado todo o suporte necessário para a realização deste trabalho, assim como à Gabrielle Brok Quevedo, por estar ao meu lado em todos os momentos, assim como, ter me ajudado em diversas etapas.

À minha orientadora, Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, que além de me guiar nessa jornada, me aconselhou e me guiou também na vida.

Agradeço ao Lucas Xavier Bonfietti, diretor do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pela ajuda e suporte na realização do trabalho, especialmente no teste de sensibilidade a antifúngicos.

Juliana P. F. Takahashi, pela ajuda em todas as fases do trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do Núcleo de Micologia, assim como do Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz, especialmente à Dra. Juliana Mariotti Guerra.

Ao mestre Carlos Passinho Campos, pela ajuda na identificação dos isolados, tanto na parte taxonômica, quanto no sequenciamento genético. À toda equipe do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP) pelo apoio e ajuda na realização do projeto.

À Profa. Dra. Claudete Rodrigues de Paula, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e à Dra. Maria José Silveira, Diretora Técnica da Controlbio Assessoria Técnica Microbiológica, Brasil, assim como aos demais funcionários, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Japan International Cooperation Agency (JICA), pelo apoio financeiro necessário para realização do projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

## RESUMO

*Aspergillus* spp. são fungos saprófitos distribuídos mundialmente, sendo agentes de aspergilose, micose causada por via aérea. Em meio ambiente agrícola, fungos podem estar expostos a compostos azólicos usados como agrotóxicos e sofrerem pressão seletiva para surgimento de cepas resistentes. Se inaladas, principalmente, por indivíduos imunossuprimidos, tais cepas podem desencadear infecção refratária a tratamentos com fármacos da mesma classe química, como itraconazol e voriconazol. A busca da resistência ambiental contribui para o desvendamento da epidemiologia molecular da aspergilose. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies de *Aspergillus* e determinar os respectivos perfis de sensibilidade a azóis, fármacos e fungicidas agrícolas, de amostras de regiões de cinco estados do Brasil. Foram estudados 128 isolados de *Aspergillus* spp., provenientes de 114 amostras de ar atmosférico. Os isolados foram classificados em seções e sequenciados para identificação da espécie. As seções mais frequentes foram: *Nigri* (50,8%), *Flavi* (29,7%), *Circumdati* (9,3%), além de *Fumigati*, *Clavati*, *Terrei*, *Restricti* e *Nidulantes*. Valores altos de concentração inibitória mínima (MIC), situados acima dos pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) que caracterizam isolados não-selvagens para itraconazol e posaconazol, foram observados para um isolado da seção *Nigri*, identificado como *Aspergillus welwitschiae*. Para seção *Restricti* (n=2), apesar de não haver ECOFF, os valores de MIC foram mais elevados para posaconazol, voriconazol, itraconazol, anfotericina B e para o fungicida agrícola difenoconazol, quando comparados às demais seções. Para isolados das seções *Flavi*, *Circumdati* e *Clavati*, foram encontrados valores altos de MIC dos agrotóxicos tebuconazol e metconazol. Não foi constatada ocorrência de resistência cruzada a mais de um fármaco azólico. Conclui-se que no ar atmosférico das cidades de Itu, São Paulo, Azenha e Porto Alegre existem isolados não selvagens, com

provável mecanismo de resistência subjacente. Estudos complementares a este, utilizando métodos de sequenciamento gênico são necessários para elucidar possíveis mecanismos de resistência. Este é o primeiro estudo no Brasil a demonstrar isolados de ar atmosférico urbano não selvagens a azóis, com possíveis mecanismos de resistência ambiental.

**Palavras-chaves:** *Aspergillus* spp.; Resistência cruzada; Testes de sensibilidade aos antifúngicos; identificação molecular; Ar atmosférico

## ABSTRACT

*Aspergillus* spp. are saprophytic fungi distributed worldwide, being agents of aspergillosis, a mycosis caused by the airborne route. In an agricultural environment, fungi may be exposed to azole compounds used as pesticides and undergo selective pressure for the emergence of resistant strains. If inhaled, mainly by immunosuppressed individuals, these strains can trigger an infection that is refractory to treatments with drugs of the same chemical class, such as itraconazole and voriconazole. The search for environmental resistance contributes to the unveiling of the molecular epidemiology of aspergillosis. The aim of this study was to identify *Aspergillus* species and determine the respective profiles of sensitivity to azoles, pharmaceuticals and agricultural fungicides, from samples isolated from regions of five states of Brazil. A total of 128 *Aspergillus* spp. isolates from 114 atmospheric air samples were studied. The isolates were classified into sections and sequenced to identify the species. The most frequent sections were Nigri (50.8%), Flavi (29.7%), Circumdati (9.3%), in addition to Fumigati, Clavati, Terrei, Restricti and Nidulantes. High values of minimum inhibitory concentration (MIC) above the epidemiological cut-off points (ECOFF), characterizing non-wild isolates, for itraconazole and posaconazole, were observed for an isolate from the Nigri section, identified as *Aspergillus welwitschiae*. For the Restricti section (n=2), despite the absence of ECOFF, the MIC were higher for posaconazole, voriconazole, itraconazole, amphotericin B and for agricultural fungicide difenoconazole, when compared to the other sections. For isolates from Flavi, Circumdati, and Clavati sections, high MIC values of the pesticides tebuconazole and metconazole were found. Cross-resistance to more than one azole drug was not found. It is concluded that in the atmospheric air of the cities of Itu, São Paulo, Azenha, and Porto Alegre there are non-wild isolates with the possibility of presenting resistance mechanisms. Complementary studies to this one, using gene sequencing methods, are necessary to elucidate the underlying possible resistance mechanism of mutation. This is the first study

in Brazil to demonstrate non-wild isolates from urban atmospheric air, harboring possible mechanisms of environmental resistance

**Keywords:** *Aspergillus* spp.; Cross-resistance; Antifungal sensitivity tests; molecular identification; atmospheric air

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: *American type culture collection*

DFZ: Difenconazol

ECOFF: *epidemiologic cutoff values*

ITZ: Itraconazol

LDL - *Low Density Lipoprotein*

MALDI-TOF MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*

MTZ: Metconazol

MIC - *minimal inhibitory concentration*; concentração inibitória mínima

TBZ: Tebuconazol

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PZC: Posaconazol

UFC: unidades formadoras de colônia

VCZ: Voriconazol

WT: *wild-type*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Macromorfologia de colônias de <i>Aspergillus</i> spp. em ágar batata (7d/30°C).....	16
<b>Figura 2.</b> Aspectos microscópicos de <i>Aspergillus</i> spp. em ágar batata (7d/30°C).....	17
<b>Figura 3.</b> Estruturas reprodutivas assexuadas de <i>Aspergillus</i> , no ápice de conidióforos.....	18
<b>Figura 4.</b> Esquema da classificação de <i>Aspergillus</i> spp., em subgêneros, seções e espécies (número entre parênteses) .....	19
<b>Figura 5.</b> Estrutura molecular da anfotericina B. ....	25
<b>Figura 6.</b> Estrutura molecular de três equinocandinas em uso no Brasil.....	26
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular dos principais triazóis de uso clínico .....	27
<b>Figura 8.</b> Estrutura molecular de três fungicidas triazólicos .....	29
<b>Figura 9.</b> Cidades e estados de origem dos 128 isolados de <i>Aspergillus</i> spp. ....	33
<b>Figura 10.</b> Exemplo da chave de identificação taxonômica utilizada para identificação da seção de <i>Aspergillus</i> . ....	34
<b>Figura 11.</b> Esquema de fluxograma empregado para preparo de um inóculo (isolado A) e sua adição à uma placa contendo antifúngico para o teste de sensibilidade a antifúngicos. ....	40
<b>Figura 12.</b> Placas contendo colônias fúngicas em ágar Sabouraud, incubadas a 30°C por 7 dias. Flechas indicam colônias com características de seções diversas de <i>Aspergillus</i> .....	46
<b>Figura 13.</b> Seções de 128 isolados de <i>Aspergillus</i> obtidos de ar atmosférico de 27 cidades de 5 estados Brasileiros, 2020.....	47
<b>Figura 14.</b> Espécies de 96 isolados de <i>Aspergillus</i> , de acordo com a seção, obtidos de ar atmosférico de 23 cidades de 5 estados do Brasil, em 2020. ....	49
<b>Figura 15.</b> Sensibilidade (MIC; mg/L) de 128 isolados de <i>Aspergillus</i> spp., frente a 3 fármacos triazólicos, anfotericina B e 3 fungicidas triazólicos.....	54
<b>Figura 16.</b> Sensibilidade de 65 isolados da seção <i>Nigri</i> frente a três fármacos triazólicos e à anfotericina B.....	56
<b>Figura 17.</b> Sensibilidade de 65 isolados da seção <i>Nigri</i> frente a tres fungicidas agrícolas .....	56
<b>Figura 18.</b> Sensibilidade de 2 isolados da seção <i>Clavati</i> frente a três fármacos triazólicos e à anfotericina B.....	58
<b>Figura 19.</b> Sensibilidade de 2 isolados da seção <i>Clavati</i> frente a tres fungicidas agrícolas .....	58
<b>Figura 20.</b> Sensibilidade de 2 Isolados da seção <i>Terrei</i> frente a fármacos triazólicos e anfotericina B .....	60

<b>Figura 21.</b> Sensibilidade de 2 Isolados da seção <i>Terrei</i> frente a 3 fungicidas agrícolas .....	60
<b>Figura 22.</b> Sensibilidade de isolado da seção <i>Nidulantes</i> frente a fármacos triazólicos e anfotericina B .....	61
<b>Figura 23.</b> Sensibilidade de isolado da seção <i>Nidulantes</i> frente a tres fungicidas agrícolas .....	62
<b>Figura 24.</b> Sensibilidade de 6 isolados de <i>Aspergillus fumigatus</i> frente aos fármacos triazólicos e anfotericina B.....	63
<b>Figura 25.</b> Sensibilidade de 6 isolados de <i>Aspergillus fumigatus</i> frente a tres fungicidas agrícolas .....	63
<b>Figura 26.</b> Sensibilidade de 38 isolados da seção <i>Flavi</i> frente aos fármacos triazólicos e à anfotericina B .....	65
<b>Figura 27.</b> Sensibilidade de 38 isolados da seção <i>Flavi</i> frente a tres fungicidas agrícolas .....	65
<b>Figura 28.</b> Sensibilidade de 12 isolados da seção <i>Circumdati</i> frente aos fármacos triazólicos e à anfotericina B.....	67
<b>Figura 29.</b> Sensibilidade de 12 isolados da seção <i>Circumdati</i> frente a tres fungicidas agrícolas .....	67
<b>Figura 30.</b> Sensibilidade de dois isolados da seção <i>Restricti</i> frente a tres fármacos triazólicos e à anfotericina B.....	69
<b>Figura 31.</b> Sensibilidade de 2 isolados da seção <i>Restricti</i> frente a tres fungicidas agrícolas .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> <i>Breakpoints</i> (MIC, em mg/L) disponíveis para 5 espécies de <i>Aspergillus</i> , segundo EUCAST .....	41
<b>Tabela 2.</b> Pontos de corte epidemiológicos - <i>ECOFF</i> disponíveis para 5 espécies de <i>Aspergillus</i> , segundo EUCAST .....	42
<b>Tabela 3.</b> Origem e número de placas de Petri positivas para colônias de <i>Aspergillus</i> spp.....	44
<b>Tabela 4.</b> Espécies de 96 isolados de <i>Aspergillus</i> obtidos de ar atmosférico de 23 cidades em 5 estados do Brasil, em 2020.....	48
<b>Tabela 5.</b> Resultados divergentes na identificação de espécie de 20 isolados, segundo dois bancos de dados utilizados (BLAST e Mycobank)..	50
<b>Tabela 6.</b> Seções de 32 isolados sem identificação de espécie, devido a resultados inconclusivos no sequenciamento ou não sequenciados, obtidos de ar atmosférico de 23 cidade de 5 estados do Brasil, 2020.....	51
<b>Tabela 7.</b> Distribuição de valores e intervalo de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de anfotericina B e 6 compostos triazólicos, fármacos e fungicidas agrícolas, frente a 128 isolados de <i>Aspergillus</i> spp., obtidos do ar atmosférico de 27 cidades de 5 estados do Brasil, 2020 .....	53
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de fármacos e fungicidas agrícolas, frente a 65 isolados da seção <i>Nigri</i> .....	55
<b>Tabela 9.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de fármacos e fungicidas, frente a 2 isolados da seção <i>Clavati</i> .....	57
<b>Tabela 10.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> encontrados frente a 2 isolados da seção Terrei .....	59
<b>Tabela 11.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de fármacos e fungicidas frente a um isolado da seção <i>Nidulantes</i> .....	61
<b>Tabela 12.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de fármacos e fungicidas frente a 6 isolados de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	62
<b>Tabela 13.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de fármacos e fungicidas, frente a 38 isolados da seção <i>Flavi</i> .....	64
<b>Tabela 14.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de fármacos e fungicidas para 12 isolados da seção <i>Circumdati</i> .....	66
<b>Tabela 15.</b> Distribuição dos valores de MIC, MIC <sub>50</sub> e MIC <sub>90</sub> de fármacos e fungicidas para dois isolados da seção <i>Restricti</i> .....	68

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	14
1.1 Taxonomia de <i>Aspergillus</i> : seções, séries e espécies	15
1.2 Técnicas moleculares	20
1.3 A doença: aspergilose	20
1.4 Mecanismo de ação dos principais antifúngicos e ocorrência de resistência	23
1.4.1 Poliênicos	24
1.4.2 Equinocandinas	25
1.4.3 Triazóis	26
1.5 Antifúngicos triazólicos como fungicidas de uso agrícola	28
<b>2. Objetivos</b>	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
<b>3. Material e Métodos</b>	32
3.1 Isolados	32
3.2 Isolamento e purificação	33
3.3 Taxonomia e preservação	33
3.4 Identificação Molecular	35
3.4.1 Extração de DNA	35
3.4.2 Amplificação do DNA	35
3.4.3 Reação de sequenciamento	36
3.5 Teste de sensibilidade	38
3.5.1 Procedimentos	38
3.5.2 Interpretação dos resultados de MIC	40
3.5.2.1 Classificação segundo pontos de corte clínico-breakpoint	40
3.5.2.2 Classificação segundo pontos de corte epidemiológicos-ECOFF	41
3.6 Análise estatística	43
<b>4. Resultados</b>	44

4.1 Seções e espécies	46
4.2 Sensibilidade a antifúngicos	52
<b>5. Discussão</b>	70
<b>6. Conclusões</b>	79
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	80
<b>Apêndice 1</b>	88

## 1. Introdução

*Aspergillus* é um fungo pertencente à família Aspergillaceae, ordem Eurotiales, classe Eurotiomycetes e filo Ascomycota (Houbraken *et al.* 2014; Kocsubé *et al.*, 2016). O gênero é dividido em seis subgêneros: *Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Aspergillus*, *Cremeri* e *Polypaecilum*, que englobam 27 seções e 446 espécies (Houbraken *et al.*, 2020).

As espécies possuem diversas propriedades fisiológicas diferentes e são, predominantemente, saprófitas, ou seja, degradam matéria orgânica. *Aspergillus* pode ser encontrado em diversos locais, como observado em um trabalho realizado na Holanda por Schoustra *et al.* (2019) que demonstraram recuperação de *Aspergillus fumigatus*, a partir de materiais diversos, como: milho, trigo, lascas de madeira, bulbos de flores, lixo doméstico, resto de frutas, restos de folhas e grama. Esses materiais apresentavam-se contaminados com fungicidas triazólicos agrícolas e provinham de distintas localizações. *Aspergillus fumigatus* destaca-se como patógeno oportunista, podendo causar formas clínicas de aspergilose em seres humanos, imunocomprometidos ou não, e em outros animais (Abarca *et al.* 2004; Frisvad *et al.*, 2019; Houbraken *et al.* 2014).

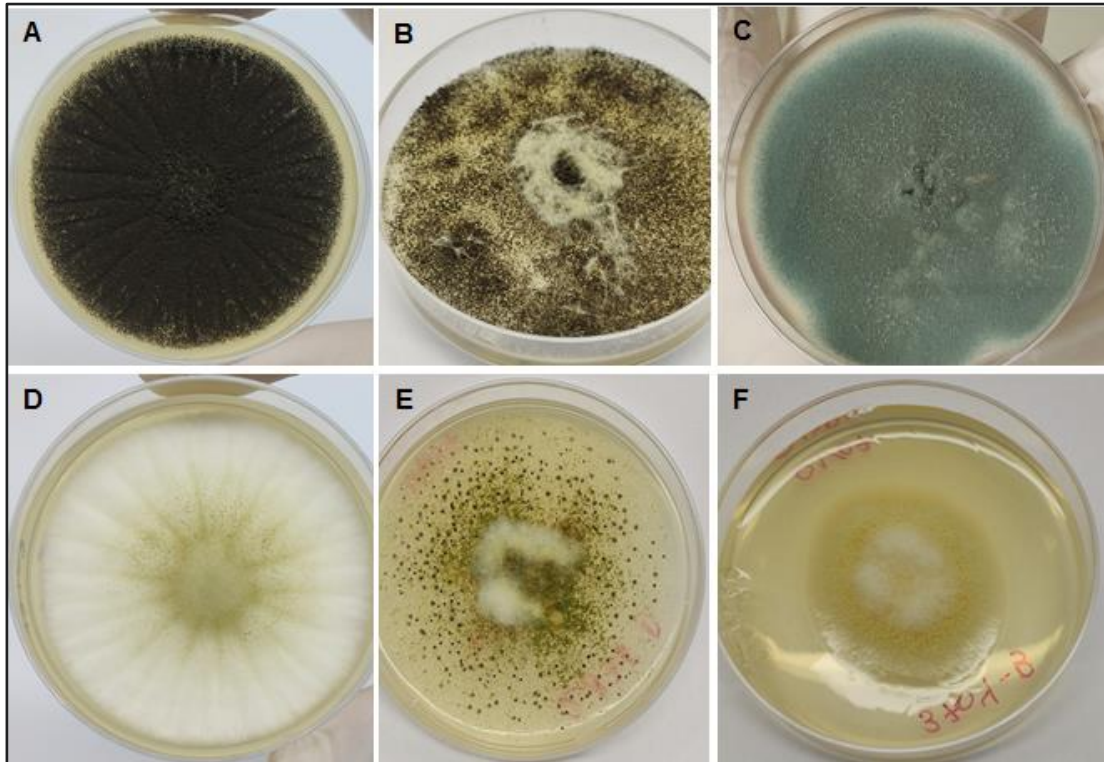
Godeau *et al.* (2019) isolaram *Aspergillus* spp. de diversos vasos de plantas, situados dentro de um hospital, assim como, canteiros de flores externos, ar interno de corredores e poeira de equipamentos da unidade de terapia intensiva do serviço de hematologia. O estudo demonstrou que pacientes convivem, rotineiramente, com esporos desse gênero, desde que, as estruturas de dispersão e reprodução assexuada, os conídios, podem ser encontrados em hospitais, no ar interno e nas proximidades (Abad *et al.* 2010; Tekaiia & Latgé, 2005; Bhabhra *et al.* 2005; Houbraken *et al.* 2014).

As espécies de *Aspergillus* estão distribuídas, mundialmente, e apresentam grande impacto econômico e social (Houbraken *et al.* 2020). Algumas espécies são termotolerantes como, por exemplo, *Aspergillus fumigatus* que pode crescer até 53° Celsius, e outras são psicrotolerantes, resistindo à baixas temperaturas. Essas características, dentre outras, fazem

com que determinadas espécies possuam grande importância biotecnológica, na indústria de alimentos. *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*, por exemplo, são utilizados na indústria alimentícia para a produção de molho shoyu, saquê e outros produtos. *Aspergillus terreus* é utilizado na indústria farmacêutica para a produção de Lovastatina, um medicamento que auxilia na redução de colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*). *Aspergillus* da seção *Nigri* são conhecidos como decompositores de alimentos, produtores de ácidos orgânicos e algumas espécies são produtoras de ocratoxina A e outros metabólitos com potencial toxigênico, assim como, espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* que produzem micotoxinas, como as aflatoxinas (Bhabhra *et al.* 2005; Houbraken *et al.* 2014).

#### 1.1 Taxonomia de *Aspergillus*: seções, séries e espécies

*Aspergillus* é caracterizado pelo rápido crescimento em meios de cultura, não possuindo nenhuma exigência específica para se reproduzir. As colônias variam quanto à textura, dependendo da espécie, podendo ser pulverulenta ou algodonosa e apresentar cores diversas em tons de verde, amarelo, marrom, cinza e preto (Figura 1). As hifas são hialinas e septadas e a morfologia do conidióforo é bem característica com uma vesícula apical rodeada de células conidiogênicas denominadas fiálides (Figura 2). Em algumas espécies, há uma camada de células, métulas, antes das fiálides. Vesículas que apresentam métulas (Figura 2,3) são denominadas bisseriadas (de Hoog *et al.* 2000; Klich 2002; Klich 2006; de Moraes *et al.* 2009).

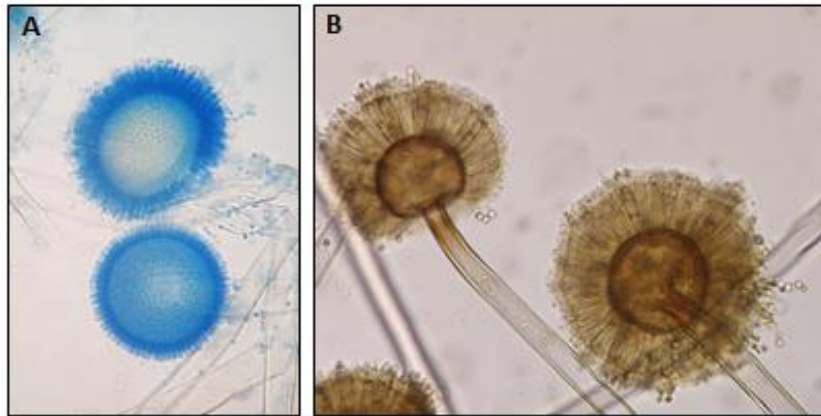


**Figura 1.** Macromorfologia de colônias de *Aspergillus* spp. em ágar batata (7d/30°C)

A- Cor preta e textura pulverulenta, B- cor preta e textura algodouosa, C- cor verde escura e textura pulverulenta, D- cor verde claro e textura algodouosa, E- cor verde claro e textura algodouosa, com estruturas globosas escuras de reprodução sexuada (cleistotécios), F- cor amarela e textura algodouosa.

Fonte: Acervo pessoal





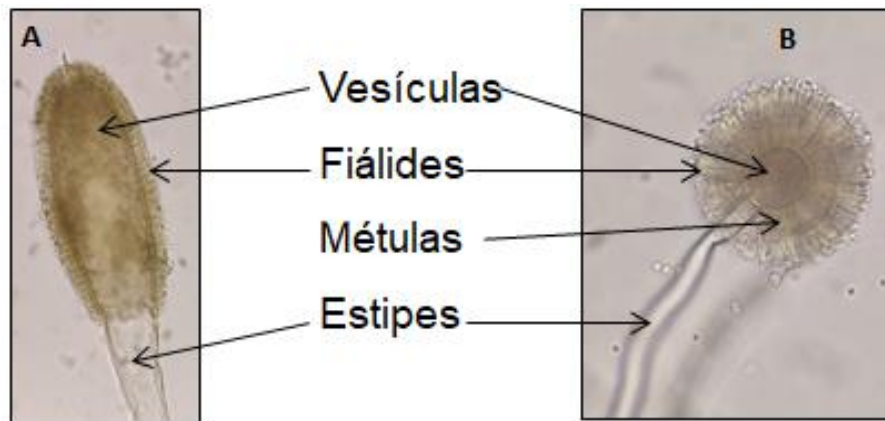
**Figura 2.** Aspectos microscópicos de *Aspergillus* spp. em ágar batata (7d/ 30°C)

A- Vesículas coradas com lactofenol azul de algodão, B- Vesículas bisseriadas sem coloração e com pigmentação castanha devido à presença de melanina (x400)

Fonte: Acervo pessoal

Devido à semelhança das estruturas microscópicas que algumas espécies compartilham entre si, foram propostos agrupamentos de espécies com as mesmas características em conjuntos denominados seções (Klich 2006). As seções de *Aspergillus* são: *Restricti*, *Aspergillus*, *Aenei*, *Bispori*, *Cavernicolarum*, *Ochraceorosei*, *Nidulantes*, *Raperorum*, *Silvatici*, *Sparsi*, *Usti*, *Candidi*, *Circumdati*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Janorum*, *Nigri*, *Petersoniorum*, *Robusti*, *Tannerorum*, *Terrei*, *Cervini*, *Clavati*, *Fumigati*, *Cremei*, *Polypaecilum* e *Vargarum* (Figura 4). Cada seção, ainda, pode ser dividida em 75 Series (Houbraken *et al.* 2020).

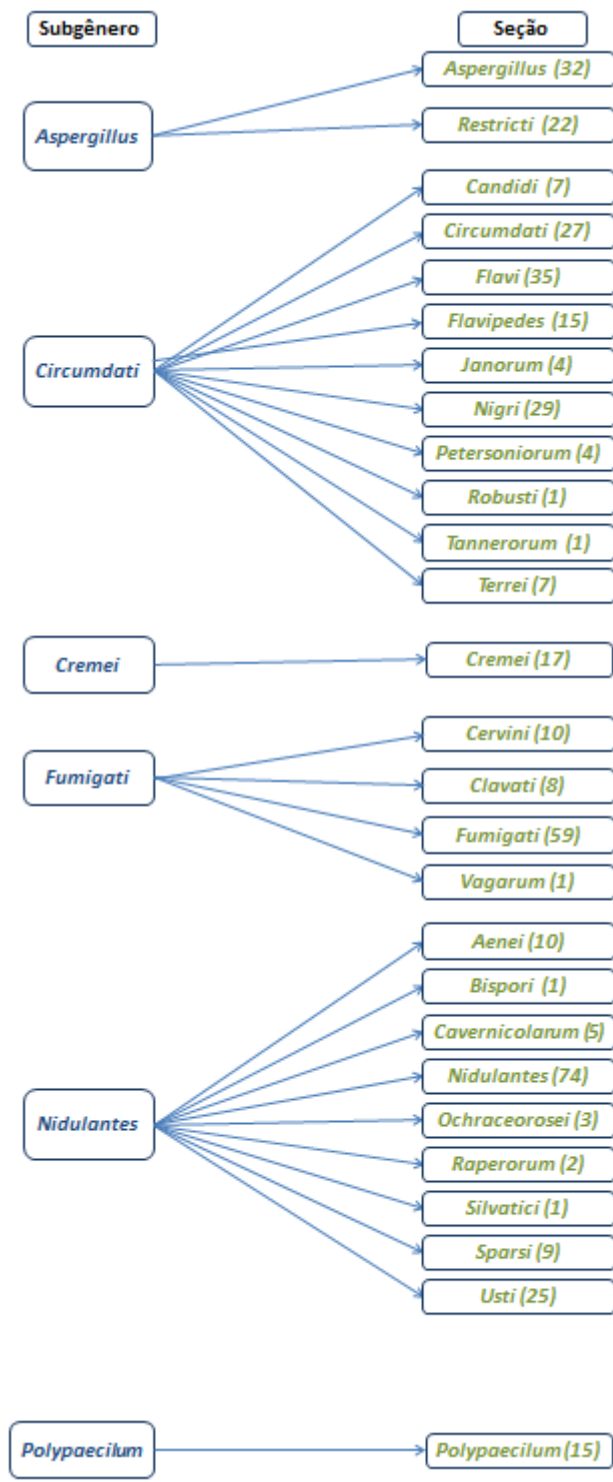
As seções são formadas segundo as características morfológicas das espécies, enquanto as séries são determinadas pelas suas propriedades fisiológicas. Assim, as séries agrupam as espécies de acordo com seus caracteres funcionais, sendo úteis quando a identificação tem como base fenótipos com características, como: velocidade de crescimento, produção de exsudatos, expressão de proteínas, produção de enzimas, entre outras (Houbraken *et al.* 2020).



**Figura 3.** Estruturas reprodutivas assexuadas de *Aspergillus*, no ápice de conidióforos.

A- Vesícula em forma clavada e fiálides unisseriadas; B- Vesícula em forma oval, métulas e fiálides (x 400)

Fonte: Acervo pessoal, adaptado de Klich 2002



**Figura 4.** Esquema da classificação de *Aspergillus* spp., em subgêneros, seções e espécies (número entre parênteses)

Fonte: Adaptado de Houbraken *et al.* 2020

## 1.2 Técnicas moleculares

A identificação fenotípica e morfológica de *Aspergillus*, ainda que seja adequada, assim como ocorre para outros fungos, para classificar o gênero, e de modo presuntivo a seção, não é suficiente para determinar a espécie.

Para classificação da espécie utiliza-se técnicas moleculares, como sequenciamento genético, para o qual, no caso de *Aspergillus*, os genes mais utilizados e com os melhores graus de identificação são:  $\beta$ -tubulina, calmodulina e *RPB2* (RNA polimerase II). Usa-se, também, combinação de dois, ou mais genes, para identificação mais precisa (Houbraken *et al* 2014; Samson *et al.* 2011). Com o sequenciamento de mais de um gene, também é possível a elaboração de uma árvore filogenética para ajudar a compreender a relação entre um grupo de isolados (Steenwyk *et al.* 2019; Houbraken *et al.* 2014; Houbraken *et al.*, 2020).

Métodos com base em análise proteômica são, também, aplicados para determinação de espécies. Em particular, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) está sendo utilizado, com ótimos resultados, para identificação de espécies em bibliotecas customizadas (Moloney *et al.* 2016; Teutschbein *et al.* 2010).

## 1.3 A doença: aspergilose

A ampla disseminação ambiental de conídios de *Aspergillus*, tanto em ar ambiente externo como interno, expõe indivíduos à inalação desses propágulos, frequentemente. O isolamento de *Aspergillus* spp., a partir de amostras de trato respiratório de indivíduos imunocompetentes, deve ser considerado, em regra, uma colonização. A exposição aérea diária ocorre em concentrações entre 1 a 100 conídios por m<sup>3</sup>, porém, esses valores podem chegar a concentrações altíssimas, de 10<sup>8</sup> conídios por m<sup>3</sup> em alguns locais. Um fato relevante é o diâmetro dos conídios, os quais dependem da espécie, mas que pode ser de tamanho suficiente para penetrar até os

alvéolos (2,5 µm) ou apenas atingir os brônquios (10 µm). Ainda assim, apenas uma minoria de indivíduos expostos irá desenvolver a doença e as formas invasivas ocorrem em pacientes com o sistema imunológico, extremamente fragilizado (Kosmidis & Denning, 2015; Latgé & Chamilos, 2020). As espécies mais comumente reportadas em descritas em casos de aspergilose humana são: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* e, também, são as espécies mais frequentemente encontradas em na natureza, seguidas de *A. nidulans*, *A. ustus* e *A. restrictus* (Klich 2006; Paulussen *et al.* 2017; Mousavi *et al.* 2016)

A aspergilose é uma das doenças fúngicas oportunistas mais frequentes, no mundo inteiro. Fatores como virulência da linhagem fúngica, volume de conídios inalados, estado imune do hospedeiro e sua função pulmonar, definem como a doença irá se manifestar, variando desde reações alérgicas até infecções invasivas (Paulussen *et al.* 2017). As manifestações clínicas podem ser resumidas em: reações alérgicas leves, como rinite e sinusite, asma brônquica grave e letal, aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergilose pulmonar crônica e fibrótica, aspergiloma e aspergilose pulmonar invasiva (Sales 2009; Denning *et al.* 2016; Latgé & Chamilos, 2020; Mousavi *et al.* 2016).

Fatores como transplantes de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênicas, ou transplantes de órgãos sólidos (fígado, rim, pâncreas, coração, pulmão, intestinos), doenças pulmonares prévias ou subjacentes são fatores críticos para o desenvolvimento de formas graves da aspergilose. Aspergilose pode se tornar invasiva em pacientes com o sistema imunológico extremamente fragilizado. Os fatores de risco para aspergilose pulmonar crônica e aspergilose invasiva são diversos, mas se destacam aqueles que diminuem a ação do sistema imunológico, como neutropenia prolongada, imunodeficiências herdadas ou adquiridas e uso de corticosteroides sistêmicos (Baddley, 2011; Patterson *et al.* 2016; Takazono *et al.* 2018).

Em cenários com pacientes com infecções graves pelo vírus influenza, a progressão da aspergilose nos pulmões comprometidos ocorre

rapidamente, podendo evoluir, inclusive, naqueles imunocompetentes (Crum-Ciafone *et al.* 2016). O efeito imunomodulatório que o vírus causa no paciente é semelhante ao da doença granulomatosa crônica que, por si só, está associada à invasão pulmonar e desenvolvimento de aspergilose (Verweij *et al.* 2020).

A pandemia de 2019 ocasionada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (covid-19) causou extrema preocupação no mundo sobre as possíveis coinfeções com outros microrganismos, como fungos. A coinfeção com *Aspergillus* spp. pode gerar rápida progressão de aspergilose pulmonar para invasão tecidual em casos de covid-19 com síndrome respiratória aguda grave (Arastehfar *et al.* 2020; Verweij *et al.* 2020). O dano ao epitélio pulmonar, assim como, o processo inflamatório resultante da infecção viral, são fatores predisponentes ao desenvolvimento da aspergilose e, ainda, o uso de corticosteróides no tratamento da covid-19 também favorece a coinfeção (Verweij *et al.* 2020).

A doença pode apresentar várias manifestações clínicas acometendo tanto o trato respiratório, variando de rinites e sinusites à uma infecção crônica aguda grave podendo evoluir para invasão tecidual. *Aspergillus* spp. pode, raramente, causar infecções cutâneas, osteomielite, endocardite e otomicose (Richardson & Warnock, 2003).

Aspergilose broncopulmonar alérgica é uma forma de aspergilose decorrente da hipersensibilidade aos conídios dos *Aspergillus* spp., principalmente conídios *Aspergillus fumigatus*. Pacientes com asma ou fibrose cística podem apresentar complicações derivadas dessa forma de aspergilose (Agarwal *et al.* 2013).

A aspergilose pulmonar crônica assim como a colonização de cavidade pulmonar pode ocorrer em pacientes sem nenhuma imunodeficiência aparente, mas com comprometimento pulmonar subjacente decorrente de outra doença, como tuberculose, doença pulmonar obstrutiva crônica ou infecção por micobactérias não tuberculosas. O envelhecimento de hifas, fibrina e matriz celular pode resultar em um conglomerado redondo

denominado aspergiloma, também conhecido como, “bola fúngica” (Kosmidis & Dennig, 2015).

A aspergilose invasiva acomete principalmente pacientes que apresentam imunodeficiências como neutropenia prolongada, doenças hematológicas e comorbidade como: diabetes, disfunção renal ou hepática, e, pacientes transplantados, ou estão em uso de medicamentos esteroidais, inibidores de TNF- $\alpha$  ou em tratamento com algum quimioterápico (Baddley, 2011; Sales, 2009). A doença é de rápida progressão e disseminação pelas vias hematogênicas podendo causar infarto, trombose, necrose e hemorragias (Richardson & Warnock, 2003). Dentre as espécies do gênero, *Aspergillus fumigatus* é a espécie mais frequentemente isolada e associada com aspergilose invasiva. O tamanho dos conídios contribui para que isto seja possível, uma vez que seu diâmetro varia de 2 a 3  $\mu\text{m}$ , permitindo que alcancem os alvéolos pulmonares (Latgé 1999; Mousavi *et al.* 2016).

O tratamento da aspergilose deve ser realizado o mais, precocemente, possível devido ao rápido potencial de progressão da doença. Para o tratamento das formas clínicas de aspergilose usa-se fármacos antifúngicos que agem na membrana ou na parede celular dos conídios e hifas (Sales, 2009)

#### 1.4 Mecanismo de ação dos principais antifúngicos e ocorrência de resistência

Os antifúngicos mais utilizados, mundialmente, para o tratamento de infecções fúngicas invasivas pertencem a três classes químicas: poliênicos, triazóis e equinocandinas. No entanto, a todos já foram descritos casos de falência terapêutica, sendo muitos deles causados por cepas que apresentaram resistência *in vitro*. A resistência é demonstrada por testes que avaliam diversas concentrações de cada fármaco frente a um inóculo padronizado da cepa infectante. O resultado é fornecido em termos de concentração inibitória mínima (*minimal inhibitory concentration*- MIC) do

fármaco e a metodologia de referência é por microdiluição em meio líquido (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2013; Arendrup *et al.* 2020).

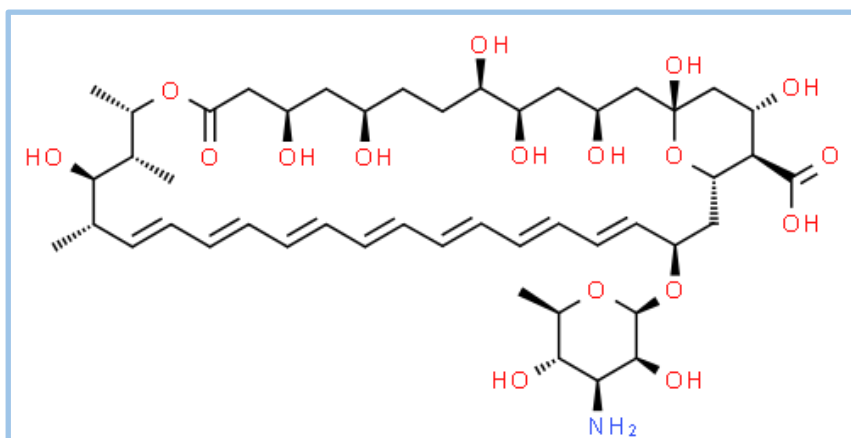
#### 1.4.1 Poliênicos

Os antifúngicos poliênicos representam a classe mais antiga de antifúngicos, introduzida em 1950, e é amplamente utilizada até os dias atuais como antifúngicos de uso tópico, como nistatina, ou uso sistêmico, contra infecções fúngicas progressivas e potencialmente fatais (Gallis *et al.* 1990; Cavassin *et al.* 2021). O antifúngico sistêmico mais característico dessa classe é a anfotericina B (Figura 5). Os mecanismos de ação da anfotericina B são constantemente estudados e revisados, entretanto, há um amplo consenso através das evidências, que são dois mecanismos: I. a formação de poros na membrana citoplasmática do fungo, através da ligação da porção hidrofílica da molécula do antifúngico com o ergosterol. A formação de poros desestabiliza o equilíbrio de íons no interior da célula, com o extravasamento de eletrólitos, levando à morte celular (Holz, 1974; Cavassin *et al.* 2021). Devido a semelhança entre a molécula de ergosterol, presente nas células fúngicas, e a de colesterol, presente nas células de mamíferos, o antifúngico pode se ligar ao colesterol, apresentando forte toxicidade para as células humanas. Para minimizar esses efeitos, formulações lipídicas menos tóxicas foram criadas (Cavassin *et al.* 2021, Galis *et al.* 1990). II. Dano oxidativo. A anfotericina B produz um estresse oxidativo produzindo forte dano, levando à morte celular, por mecanismos não totalmente desvendados.

A aquisição de resistência a antifúngicos poliênicos é baixa, mas pode, eventualmente, ocorrer devido a alguns fatores, como: modificação do posicionamento do ergosterol na membrana dificultando o encontro do fármaco com o alvo, mudanças conformacionais no ergosterol diminuindo a afinidade dos polienos ou, ainda, alterações na relação esterol/fosfolipídeos. Isolados clínicos de leveduras resistentes à anfotericina B apresentam mutações nos genes *erg2* e *erg3*, ligados a modificações na qualidade e



quantidade de lipídios da membrana fúngica (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2013; Galis *et al.* 1990; Cavassin *et al.* 2021).



**Figura 5.** Estrutura molecular da anfotericina B.

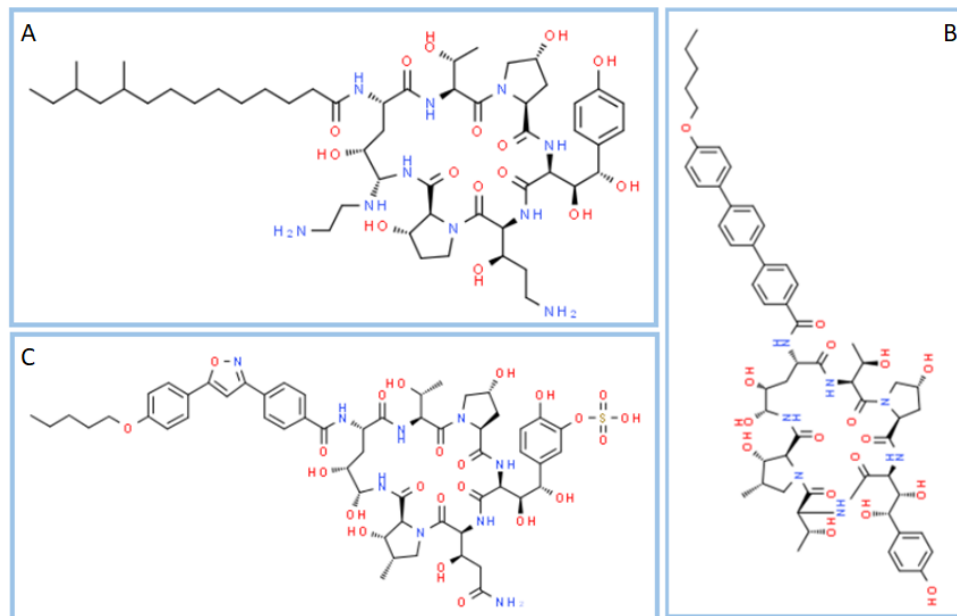
Fonte: <http://www.chemspider.com>

#### 1.4.2 Equinocandinas

As equinocandinas são antifúngicos que possuem um alvo terapêutico diferente do ergosterol. São inibidores da enzima responsável pela síntese do polissacarídeo (1,3) - $\beta$ -D-glucana, composto essencial na estrutura da parede celular. (Fera *et al.* 2009, Deresinski & Stevens, 2003).

Estes fármacos promovem efeito fungistático em cepas de *Aspergillus* e ação fungicida para algumas espécies de *Candida*. Estão licenciadas no Brasil: caspofungina, micafungina e anidulafungina (Figura 6). Micafungina ou caspofungina são utilizadas em terapias de resgate em casos de aspergilose (Sales 2009; Fera *et al.* 2009).

A resistência às equinocandinas pode estar associada a mutações no gene *FKS1* e *FKS2* em espécies do gênero *Candida*, que codifica a enzima glucano sintetase para formação do polissacarídeo. A deleção do gene *FKS1* ocasiona a diminuição de (1,3) - $\beta$ -D-glucana e o aumento de quitina e manana na parede celular. Já a deleção do *FKS2* não gera defeito na parede celular, porém a deleção dos dois genes não é viável (Fera *et al.* 2009).



**Figura 6.** Estrutura molecular de três equinocandinas em uso no Brasil

A- Caspofungina; B- Anidulafungina; C- Micafungina.

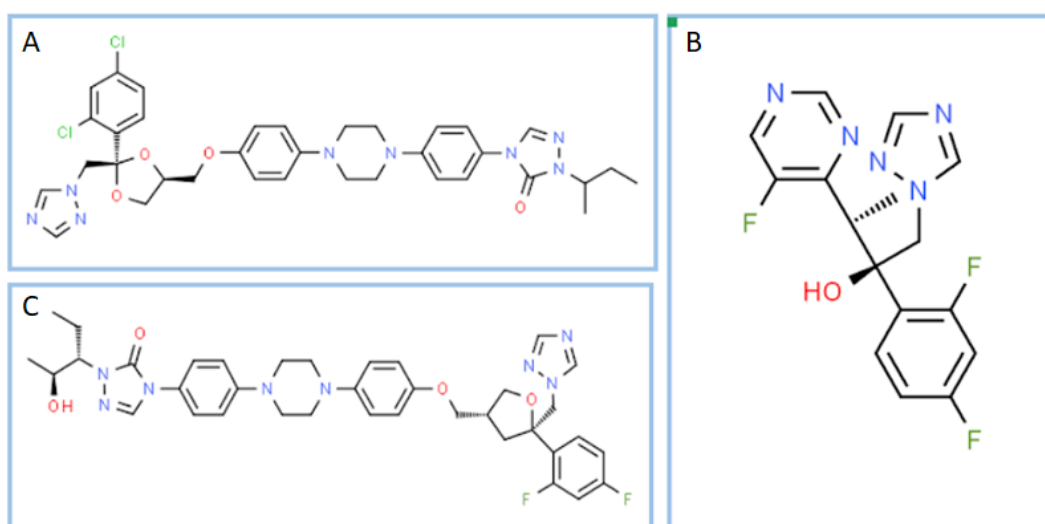
Fonte: <http://www.chemspider.com>

#### 1.4.3 Triazóis

Os fármacos triazóis são compostos sintéticos que apresentam três átomos de nitrogênio e dois de carbono no anel triazólico. Atuam no processo de biosíntese do ergosterol, composto presente na membrana fúngica. Ao bloquear a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, o ergosterol não é sintetizado e os precursores intermediários se acumulam na superfície celular fúngica, resultando na diminuição do crescimento do fungo. Os genes homólogos que codificam essa enzima no gênero de *Aspergillus* spp. são *Cyp51A* e *Cyp51B*, já nas leveduras o gene é *ERG11* (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2013; Fera *et al.* 2009). Esses fármacos são menos tóxicos do que os polienos, porém, com maior possibilidade de enfrentarem resistência fúngica. Voriconazol é o fármaco de primeira escolha para casos de aspergilose, podendo ser administrado tanto via oral, quanto intravenosa. Em casos graves, principalmente, da forma invasiva da doença é utilizada a anfotericina B (Sales, 2009; Kosmidis & Denning, 2015). Em casos de

intolerância ou refratariedade se utiliza o posaconazol, ou itraconazol, ou mesmo formulações lipídicas de anfotericina B (Figura 7).

A duração do tratamento ainda não é definida (pode variar de 6-12 semanas) e deve ser realizado o constante monitoramento dos sinais e sintomas da doença. Em casos de aspergiloma (bola fúngica), a cirurgia deve ser considerada e avaliada (Walsh *et al.* 2008). O tratamento primário de infecções causadas por *A. terreus* deve ser com um composto triazólico, devido à resistência intrínseca que essa espécie pode apresentar à anfotericina B (Sales, 2009).



**Figura 7.** Estrutura molecular dos principais triazóis de uso clínico  
A- Itraconazol; B- Voriconazol; C- Posaconazol.

Fonte: <http://www.chemspider.com>

Os mecanismos de resistência a triazóis são variados e incluem modificações no gene *Cyp51*, que codifica a enzima 14- $\alpha$ -demetilase. Pacientes com um isolado que apresenta uma mutação no gene *Cyp51* apresentam uma alta probabilidade de falha terapêutica (Schoustra *et al.* 2019). As mutações observadas em isolados clínicos de *Aspergillus* spp. resistentes aos azóis podem ser em pela troca de aminoácidos específicos ou a inserção de repetições na região promotora do gene *cyp51A* (Latgé 1999; Alastruey-Izquierdo *et al.* 2015; Jeanvoine *et al.* 2020; Lestrade *et al.* 2019; Lockhart *et al.* 2020). Ainda, a superexpressão do gene *Cyp51A* com

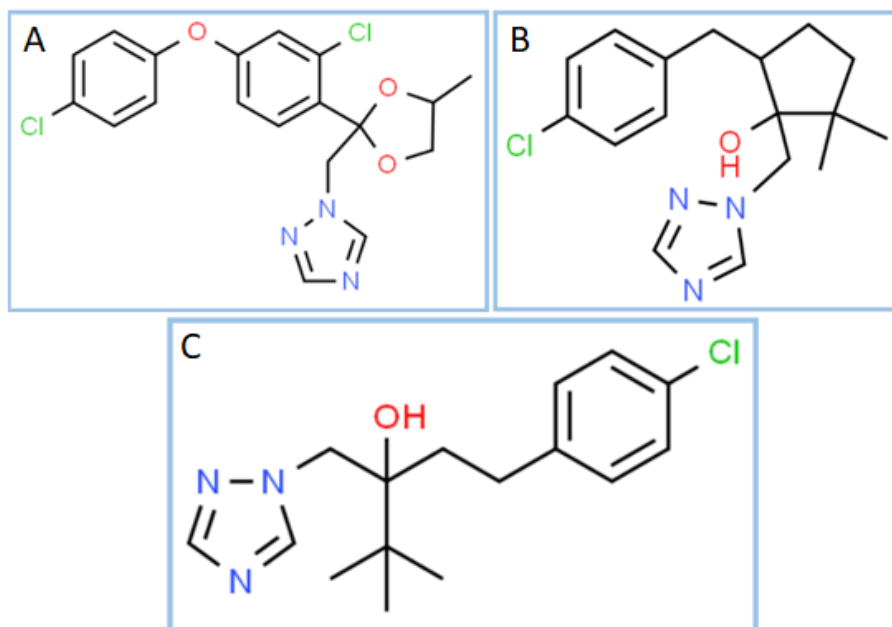
ou sem mutações únicas na região promotora constitui um segundo mecanismo importante na aquisição de resistência aos antifúngicos azólicos (Jeanvoine *et al.* 2020). Ainda, há relatos de cepas resistentes pela presença de uma via alternativa para biossíntese do ergosterol ou superexpressão de bombas de efluxo do fármaco intracitoplasmático (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2013; Lestrade *et al.* 2018; Lestrade *et al.* 2019; Lockhart *et al.* 2020).

As mutações mais relevantes em *Aspergillus*, sob o ponto de vista clínico, são aquelas que induzem resistência aos fármacos triazólicos. Como a classe de fármacos tem o mesmo mecanismo de ação, em regra, uma cepa que desenvolveu resistência a um triazol, será também resistente a outros, fenômeno denominado resistência cruzada. De outro modo, são mais raros os casos de multirresistência, em que uma cepa é insensível a mais de uma classe de fármacos. A resistência cruzada tendo sido demonstrada, *in vitro* e *in vivo*, entre os antifúngicos triazóis de uso clínico e de uso agrícola, que são estruturalmente semelhantes (Qiao *et al.* 2008; Verweij *et al.* 2009; Ishida 2015; Beer *et al.* 2018). Pode haver processo de seleção de cepas resistentes a fungicidas triazólicos que pertencem à classe dos fármacos e, caso tais cepas sejam inaladas e produzam infecção, há o risco de micose refratária a tratamentos de primeira escolha, como voriconazol (Brauer *et al.* 2019; Azevedo *et al.* 2015).

### 1.5 Antifúngicos triazólicos como fungicidas de uso agrícola

Compostos triazólicos são, amplamente, utilizados também, como fungicidas em plantações para eliminação de fungos fitopatógenos e preservação da qualidade de produtos agrícolas. No Brasil, difenoconazol, metconazol e tebuconazol (Figura 8) são os fungicidas sistêmicos majoritários no comércio. O amplo emprego de tais agrotóxicos, em culturas de hortaliças entre outras, resulta em aumento de produção, mas pode gerar impacto ambiental, desde que, sua pulverização pode se difundir no ambiente, contaminando plantas, solos e ar com partículas que atingem fungos não fitopatógenos, que habitam o solo, como os do gênero

*Aspergillus*. Conídios e hifas presentes no solo exposto a fungicidas triazólicos podem expressar os mecanismos de resistência, como descrito anteriormente (Azevedo *et al.* 2015).



**Figura 8.** Estrutura molecular de três fungicidas triazólicos

A-Difenoconazol; B-Metconazol; C-Tebuconazol.

Fonte: <http://www.chemspider.com>

Conforme descrito, conídios de *Aspergillus* são inalados, diariamente, por indivíduos que podem apresentar uma, ou mais, condições predisponentes para desenvolvimento de aspergilose. As cepas ambientais, pertencentes às distintas espécies, possuem resistência a antifúngicos em graus distintos, em decorrência de sua herança genética que reflete a história de exposição prévia a antifúngicos, dentre os principais fatores (Azevedo *et al.* 2015).

No Brasil são poucos os estudos que descrevem as espécies prevalentes em amostras de ar atmosférico exterior (Távora *et al.* 2003; Mezzari *et al.* 2002; Mezzari *et al.* 2003; Xavier *et al.* 2007) e nenhum deles apresenta os resultados com base em metodologia molecular ou proteômica.

Ainda, nenhum dado existe sobre a ocorrência de resistência em isolados do ar, empregando métodos de referência para essa determinação. Portanto, há várias lacunas sobre a frequência de fenótipos resistentes aos antifúngicos e suas espécies em regiões brasileiras, como no estado de São Paulo. Tal conhecimento pode contribuir para a compreensão da dinâmica de transmissão da aspergilose e levantar hipóteses sobre a dimensão e origem da resistência antifúngica em casos da doença.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Identificar as espécies e avaliar o perfil de susceptibilidade a antifúngicos de agentes de aspergilose, dispersos em meio ambiente, em regiões de 5 estados do Brasil, contribuindo para a epidemiologia do agente.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar presença de *Aspergillus* em amostras de ar atmosférico;
- Determinar frequência de espécies crípticas de *Aspergillus*, e
- Avaliar ocorrência de fenóticos de resistência a compostos triazólicos, seu uso clínico e agrícola, e à anfotericina B.

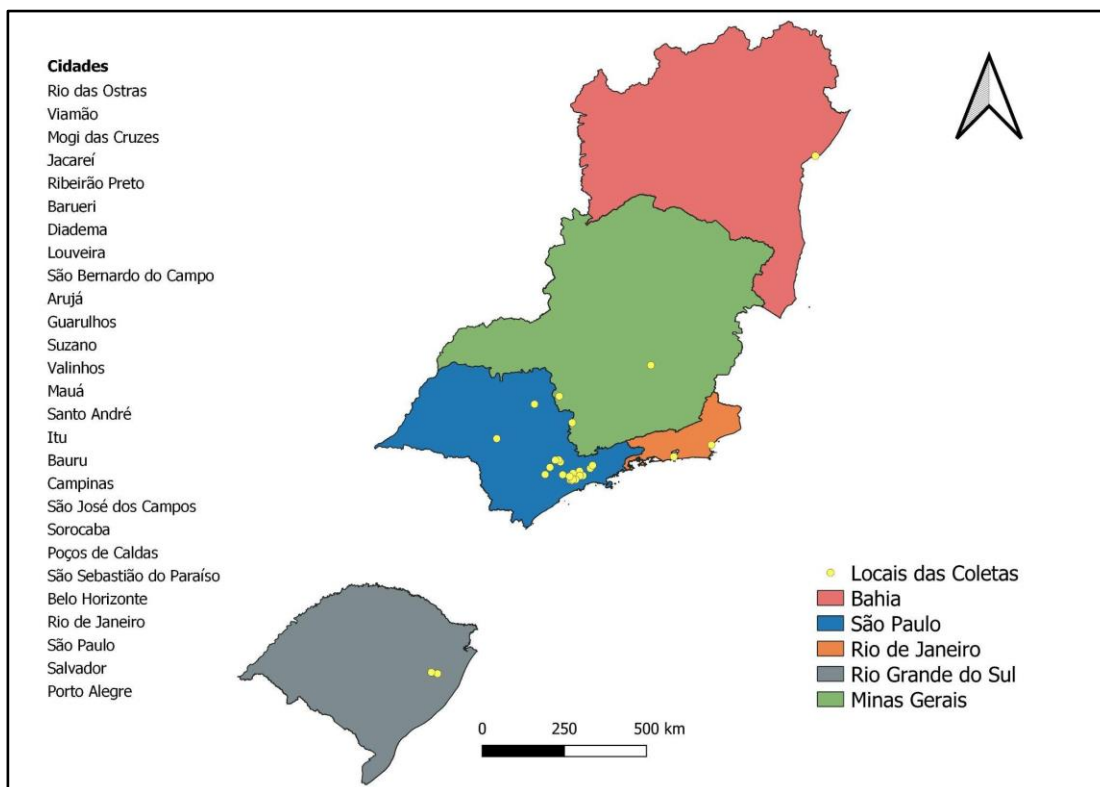
### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Isolados

Cento e vinte e oito isolados de *Aspergillus* spp., provenientes de empresa especializada no ramo de análise ambiental (Controlbio Assessoria Técnica Microbiológica, Brasil) foram objeto do estudo. Os isolados foram obtidos em placas de Petri contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol (7 dias/ 30°C), por impactação de 20 L, de ar atmosférico de ambientes internos e externos, no equipamento Andersen (E-6 Impactador Bioaerosol Tipo Andersen, Brasil), no período de janeiro a março de 2020. Os isolados foram obtidos de 114 amostras de ar de 5 estados: Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Rio Grande do Sul (Figura 9), sendo a maioria de ambientes internos (89%; 102/114).

Os isolados foram recebidos no Núcleo de Micologia, do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, para purificação das colônias de *Aspergillus* spp., identificação fenotípica, teste de sensibilidade a compostos triazólicos e extração de DNA das colônias de *Aspergillus* para posterior identificação molecular da espécie.





**Figura 9.** Cidades e estados de origem dos 128 isolados de *Aspergillus* spp.

### 3.2 Isolamento e purificação

Cada colônia com características morfológicas de *Aspergillus* spp. foi retirada da placa e identificada por análise micromorfológica, sob microscópio ótico comum, aumento de 400x, com corante de lactofenol azul de algodão. As colônias com características de *Aspergillus* spp. foram repicadas para placas contendo ágar batata (Acumedia/Neogen, EUA) a 30°C por 7 dias e, posteriormente, analisadas macroscopicamente e microscopicamente, e quando necessário foram repicadas novamente até obtenção de colônias puras. Assim que as amostras foram purificadas, seguiu-se com as identificações taxonômicas e identificação molecular.

### 3.3 Taxonomia e preservação

A taxonomia foi realizada de acordo com o livro "*Identification of common Aspergillus species - Maren A. Klich, 2002*", sendo o livro mais

completo disponível com dados morfológicos das colônias, do crescimento, das estruturas microscópicas em diferentes temperaturas e vários meios de cultura.

Para essa análise, foram utilizados dois meios de cultura principais, agar Czapek e ágar Malte. Com o crescimento, foram observadas as estruturas a olho nu e no microscópio, sendo as seguintes características analisadas: Cor do conídio, das vesículas. Diâmetro da colônia (após 7 dias de crescimento) inoculada a 3 pontos equidistantes na placa de petri com ágar, cor do micélio, produção de exsudatos, produção de cleistotécios, já microscopicamente, foram analisados o grau de camadas de células entre a vesícula e as fiálides (unisseriados e bisseriados), formato da vesícula, formato do conídio, cor e textura, assim como cor e textura da estipe e células de hülle. A chave de identificação dicotômica de acordo com Klich, 2002 foi utilizada para a definição de seção e não espécie, segue um exemplo na Figura 10.

1. Predominante bisseriado.....	2
1. Predominante unisseriado .....	43
2. Diâmetro da colônia maior que 45 mm em ágar malte .....	3
2. Diâmetro da colônia menor que 45 mm em ágar malte .....	22
3. Tons de verde a verde azulado de conídios em czapek .....	4
3. Conídios de outros tons (não verde) em czapek .....	11
4. A maior Vesícula menor que 20 um de largura, estipes marrom com o tempo .....	5
4. A maior Vesícula maior que 25 um de largura, estipes continuam sem coloração .....	7
5. Diâmetro da colônia menor que 35 mm em czapek a 37°C, sem cleistotécio -> <i>A. caespitosus</i>	
5. Diâmetro da colônia maior que 50 mm em czapek a 37°C, cleistotécio presente .....	6

\* Atualmente, a definição de espécie necessita sequenciamento então já que *Aspergillus caespitosus* é da seção Nidulantes, foi considerado apenas a seção.

**Figura 10.** Exemplo da chave de identificação taxonômica utilizada para identificação da seção de *Aspergillus*.

Fonte: Adaptado de Klich 2002

A seguir, foram armazenadas sob temperatura ambiente em água destilada (método de Castellani) e congelada em glicerol 10% em freezer - 20, e repicadas em tubos contendo ágar Sabouraud sem cloranfenicol para a determinação de MIC dos compostos triazólicos clínicos e fungicidas agrícolas. Também, foram enviadas para o núcleo de coleção de microrganismos do Instituto Adolfo Lutz, para serem liofilizadas e depositadas na biblioteca do Instituto.

### 3.4 Identificação Molecular

A identificação de espécie de cada colônia foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP) após a extração de DNA no Núcleo de Micologia, do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

#### 3.4.1 Extração de DNA

Colônias desenvolvidas em ágar malte, com crescimento de 48 horas, para *Aspergillus* spp. da seção Nigri, e crescimento de 3 a 5 dias, para as demais seções foram submetidas à extração de DNA. A remoção dos conídios foi feita com raspagem da superfície de cada colônia, utilizando-se *swab* estéril, os quais foram suspensos em 2 mL de solução salina 0,85% estéril com *beads* de vidro estéreis contidos em criotubo. Cada criotubo foi homogeneizado por 2 minutos em vortex e depois processado com o *kit* Biogene (Bioclin, Brasil) de extração de DNA/RNA. As instruções do fabricante foram seguidas, com pequenas modificações, quanto à: quantidade de proteinase K (Kit Biogene, Bioclin) (20 µL/ amostra) e ao tempo de incubação (1 hora a 56°C).

#### 3.4.2 Amplificação do DNA

Amplificação do DNA extraído foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, utilizando-se os *primers* específicos para o gene da *β-tubulina* e para o gene da *calmodulina*, quando o resultado do sequenciamento não foi satisfatório.

As sequências de bases dos iniciadores foram para *β-tubulina* bt2a: GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT e para *β-tubulina* bt2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (Glass *et al.* 1995).

Para o sequenciamento do gene da *calmodulina*, os *primers* utilizados foram *cmd5*: CCGAGTACAAGGAGGCCTT e *cmd6*: GGCTATCTCCAGTATTGCACC (Hong *et al.* 2006).

As PCRs foram realizadas em tubos de 200 µL, contendo 12,5 µL de PCR Master Mix (Gotaq® Green Master Mix, Promega), 1,25 µL de cada *primer* a 10 nM, 8 µL de água milli-Q e 2 µL de DNA, para um volume final de 25µL. A solução do *mix* contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampões em concentrações ótimas para amplificação do DNA por PCR. A solução contém, ainda, dois corantes que permitem monitorar o curso da eletroforese e possui densidade suficiente para que o produto da PCR seja aplicado, diretamente, no gel. Em seguida, foi realizada reação de PCR, com sistema comercial (Invitrogen, Califórnia, EUA) utilizando os *primers* da *β-tubulina*: bt2a e bt2b e da *calmodulina*: cmd5 e cmd6, no seguinte protocolo:

1 X 95°C 2 minutos  
40 X 95°C 30 segundos  
40 X 58°C 30 segundos  
40 X 72°C 1 segundos  
1 X 72°C 1 minuto  
4°C Infinito

#### 3.4.3 Reação de sequenciamento

Após o PCR foi feito um gel de agarose a 1,5%, com 4 mm de espessura, com 0,5 uL de *loading juice* com 5 uL de amostra e 4 uL de escala 1 Kb Plus (Invitrogen, EUA) para observação de bandas de DNA.

Os amplicons foram purificados com ExoSAP-IT Express (ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo o seguinte protocolo:

ExoSAP-IT Express 2 $\mu$ L

Amostra (PCR) 5 $\mu$ L

e processados no termociclador, conforme segue:

1 X 37°C 4 minutos

1 X 80°C 60 segundos

4°C Infinito

Os produtos da PCR foram sequenciados utilizando-se o BigDye TM Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, foram preparadas soluções para cada *primer forward* ou *reverse*, em tubos diferentes:

Água 5,0  $\mu$ L

Big Dye® 1,0  $\mu$ L

Tampão 1  $\mu$ L

*Primers* 1,6  $\mu$ M 1,0  $\mu$ L

Amostra 2  $\mu$ L

As amostras foram precipitadas e lavadas com etanol, em duas etapas. Na primeira etapa, em cada amostra, foram adicionados 2,5  $\mu$ L de EDTA (125mM) e 30  $\mu$ L de etanol 70% e segunda etapa com etanol a 100%. As amostras foram centrifugadas a 4000 rotações por minuto (rpm), à temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 30  $\mu$ L de etanol 70% ao sedimento que foram ressuspenso e, então, centrifugados novamente à 4000 rpm, em 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  $\mu$ L de formamida HI-DI às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, colocadas em gelo durante 2 minutos e aplicadas na placa de sequenciamento e levadas ao

sequenciador SeqStudio *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, EUA).

As sequências foram observadas no programa Chromas 2.6.6 e editadas usando o programa BioEdit 7.2.5. Os dados foram analisados em dois bancos de dados, o National Center for Biotechnology Information (NCBI) com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pertencente ao Genbank (disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o CBS-KNAW (Fungal Biodiversity Center, Utrecht, The Netherlands) - MycoBank (Disponível em: <http://www.mycobank.org/>).

### 3.5 Teste de sensibilidade

#### 3.5.1 Procedimentos

A base para a realização do teste de sensibilidade a antifúngicos foi o documento da *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST): EUCAST antifungal *MIC method for moulds* E. Def 9.3.2, para estabelecer o MIC dos antifúngicos (Disponível em [www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

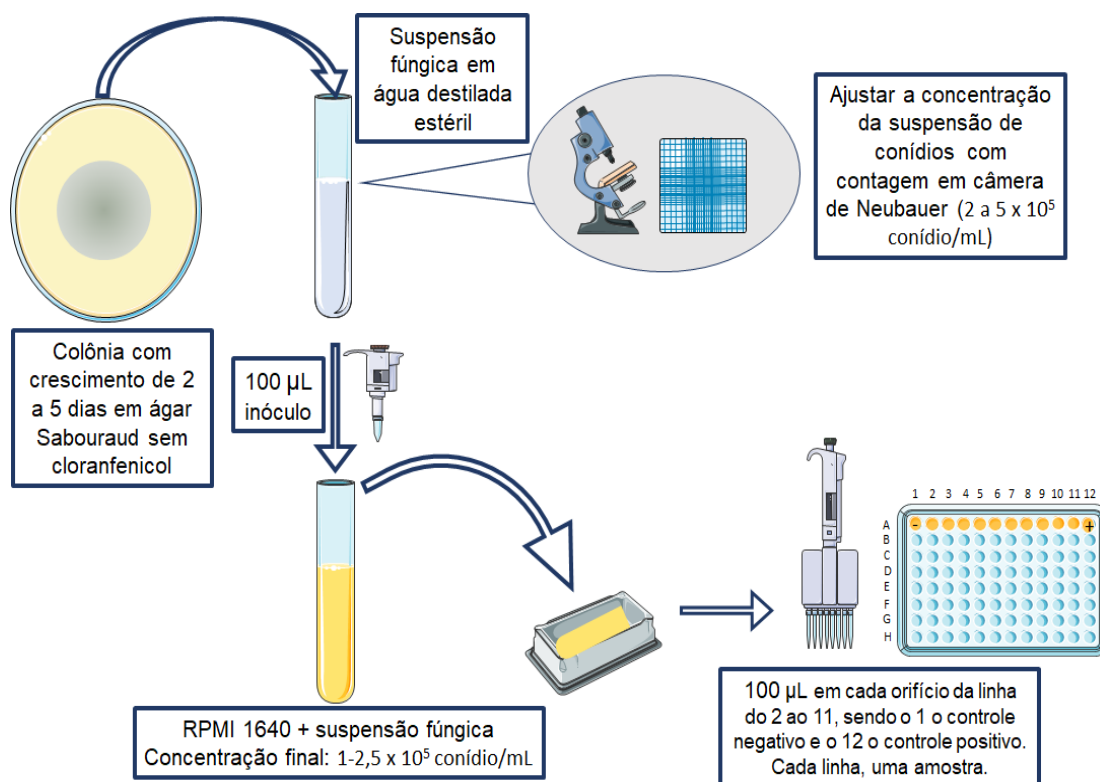
Placas de 96 orifícios, fundo reto e com tampa, foram usadas para o método de microdiluição em caldo, para avaliação dos fungicidas: tebuconazol, metconazol e difenoconazol (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemanha) e dos antifúngicos clínicos: itraconazol (Merck, EUA), voriconazol (Sigma, EUA), Posaconazol (Sigma, EUA) e anfotericina B (Sigma, EUA). Cada placa foi preenchida com 100 uL de cada uma de 10 concentrações de cada antifúngico, (0,015 mg/L a 8 mg/L), sendo uma em cada coluna.

Cada isolado foi repicado em ágar Sabouraud sem cloranfenicol, incubado a 30°C por 2 a 5 dias, até esporulação, para preparo de suspensão de conídios em 5mL de água esterilizada contendo 0,1% de Tween 20. O inóculo foi ajustado para conter entre  $2-5 \times 10^6$  ufc/mL, com auxílio de uma câmara de Neubauer.

O inóculo foi, então, diluído a 1: 10 em meio líquido RPMI 1640 (Sigma, EUA) com L-glutamina, indicador de pH e sem bicarbonato, glicose

a 2% e pH 7,0. Cem microlitros de cada inóculo foi adicionado à uma linha da placa contendo antifúngico. Em cada placa foram analisados 6 inóculos. Para controle de qualidade da diluição dos antifúngicos, em cada placa foram adicionados inóculos, preparados conforme descrito, de 2 cepas padrão em todas as placas: *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. As cepas são preconizadas como controle de qualidade pelo documento E.Def. 9.3.2. Uma coluna foi destinada ao controle positivo de crescimento (isenta de antifúngico) e outra serviu como controle negativo, ou de esterilidade do meio líquido (sem adição de inóculo e de antifúngico). Um esquema do fluxo de trabalho, empreendido para preparo do inóculo e adição à placa contendo antifúngico para realização do teste de sensibilidade, consta na Figura 11.

A incubação da placa foi de 24 horas a 48 horas sob 30°C. A leitura da inibição do crescimento de cada isolado, revelada por análise da ausência de turbidez frente à cada concentração de antifúngico, indicou o resultado de MIC. A inibição completa (100%) do crescimento fúngico foi feita em comparação aos controles positivo e negativo.



**Figura 11.** Esquema de fluxograma empregado para preparo de um inóculo (isolado A) e sua adição à uma placa contendo antifúngico para o teste de sensibilidade a antifúngicos.

Fonte: produzido com imagens do site <https://smart.servier.com>

### 3.5.2 Interpretação dos resultados de MIC

A interpretação dos resultados de TSA foi realizada de acordo com os pontos de corte clínicos (*breakpoints*), disponíveis no documento do EUCAST para algumas espécies de *Aspergillus*. Em caso de inexistência de breakpoints, foram aplicados pontos de corte epidemiológicos (*epidemiological cutoff value*, ou ECOFF) para interpretação dos valores de MIC.

#### 3.5.2.1 Classificação segundo pontos de corte clínico-*breakpoint*



Para avaliar a sensibilidade de *Aspergillus* spp. foram utilizados os *breakpoints* existentes no site do EUCAST para algumas espécies conforme a Tabela 1. Isolados de *Aspergillus fumigatus* para os quais o MIC de voriconazol apresentou valor >1 mg/L e itraconazol apresentou valor >2 mg/L foram, então, classificados como resistentes para esses antifúngicos. Assim como, os isolados de *Aspergillus flavus* que apresentaram MIC >2 mg/L foram classificados como resistentes para esse antifúngico. Dessa forma, para *Aspergillus terreus* frente ao itraconazol e posaconazol, *Aspergillus nidulans* frente ao itraconazol e voriconazol também é possível classificá-los de sensíveis a resistentes.

**Tabela 1.** *Breakpoints* (MIC, em mg/L) disponíveis para 5 espécies de *Aspergillus*, segundo EUCAST

MIC (mg/L)	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>			<i>A. niger</i>			<i>A. terreus</i>			<i>A. nidulans</i>		
	S <sub>≤</sub>	R>	ATU	S <sub>≤</sub>	R>	ATU	S <sub>≤</sub>	R>	ATU	S <sub>≤</sub>	R>	ATU	S <sub>≤</sub>	R>	ATU
<b>ITZ</b>	1	2	2	1	2	2	-	-	-	1	1	2	1	1	2
<b>VCZ</b>	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	1	1	2
<b>PSZ</b>	-	-	-	0,12	0,25	0,25	-	-	-	0,12	0,25	0,25	-	-	-
<b>AMB</b>	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

EUCAST, VCZ:Voriconazol; ITZ:Itraconazol; PSZ:Posaconazol; DFZ:Difenoconazol; MTZ:Metconazol; TBZ: Tebuconazol; AMB: Anfotericina B; ATU: Area of Technical Uncertain (área de incerteza técnica)

Fonte: adaptado do site:

[https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Clinical\\_breakpoints/AFST BP v10.0\\_200204\\_updated\\_links\\_200924.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204_updated_links_200924.pdf)

### 3.5.2.2 Classificação segundo pontos de corte epidemiológicos-ECOFF

Para as demais espécies/seções e antifúngicos, frente à ausência de *breakpoints*, foram usados os valores de ECOFF. A classificação, conforme notas técnicas disponíveis do documento EUCAST, permitiu a classificação dos isolados em selvagens (*wild-types*), que apresentam o valor de MIC até o ECOFF, ou não selvagens (*non wild-types*), que apresentam valor de MIC acima do ECOFF, para alguns isolados conforme a Tabela 2.

**Tabela 2.** Pontos de corte epidemiológicos - ECOFF disponíveis para 5 espécies de *Aspergillus*, segundo EUCAST

Espécies	Antifúngicos e valores de MIC (mg/L)			
	VCZ	ITZ	PSZ	AMB
<i>A. fumigatus</i>	1	1	0,5	1
<i>A. flavus</i>	2	1	0,5	4
<i>A. nidulans</i>	1	1	0,5	ND
<i>A. niger</i>	2	4	0,5	1
<i>A. terreus</i>	2	1	0,25	4

EUCAST,

VCZ:Voriconazol; ITZ:Itraconazol; PSZ:Posaconazol; AMB: Anfotericina B; ND: *Not determined* (não determinado)

Fonte: adaptado de notas técnicas, Hope *et al.* 2013; Arendrup *et al.* 2012; Guinea *et al.* 2020.

### 3.5.2.3 Outra classificação

Para valores de MIC obtidos de testes com espécies e fármacos para os quais não há *breakpoint* ou ECOFF determinados, a interpretação foi realizada por comparação a dados existentes na literatura. Para esse fim, foi realizada revisão narrativa de artigos pertinentes e analisados os resultados de MIC frente aos obtidos neste estudo. Para a revisão da literatura em língua inglesa, nos últimos 20 anos, foi realizada busca na base de dados

PubMed/Medline, utilizando os descritores: nome da espécie OU nome da seção + *antifungal susceptibility testing* OU *epidemiological cutoff value* OU “ECOFF” ou “EUCAST”.

### 3.6 Análise estatística

Os resultados de MIC foram analisados estatisticamente pela comparação de valores absolutos e das medianas através dos seguintes testes: Teste de Variância, teste de Shapiro-Wilk e teste T pareado, teste de Wilcoxon, Teste de Friedman. Foram considerados relevantes valores de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

As colônias de 128 *Aspergillus* foram recuperadas de 114 placas de Petri, nas quais foram impactados 20 L de ar atmosférico de cidades diversas. Do total de placas, 72% (82/114) apresentaram colônias de *Aspergillus* spp., sendo oriundas de 27 cidades: São Paulo (n=27), Guarulhos (n=15), Suzano (n=6), Valinhos (n=3), Itu (n=3), Santo André (n=2), Barueri (n=2), São José dos campos (n=2), Arujá (n=1), Sorocaba (n=1), de acordo com a tabela 3. Em 27% (22/82) das placas houve crescimento de colônias diversas, em cores e texturas, indicando presença de várias seções (Figura 12).

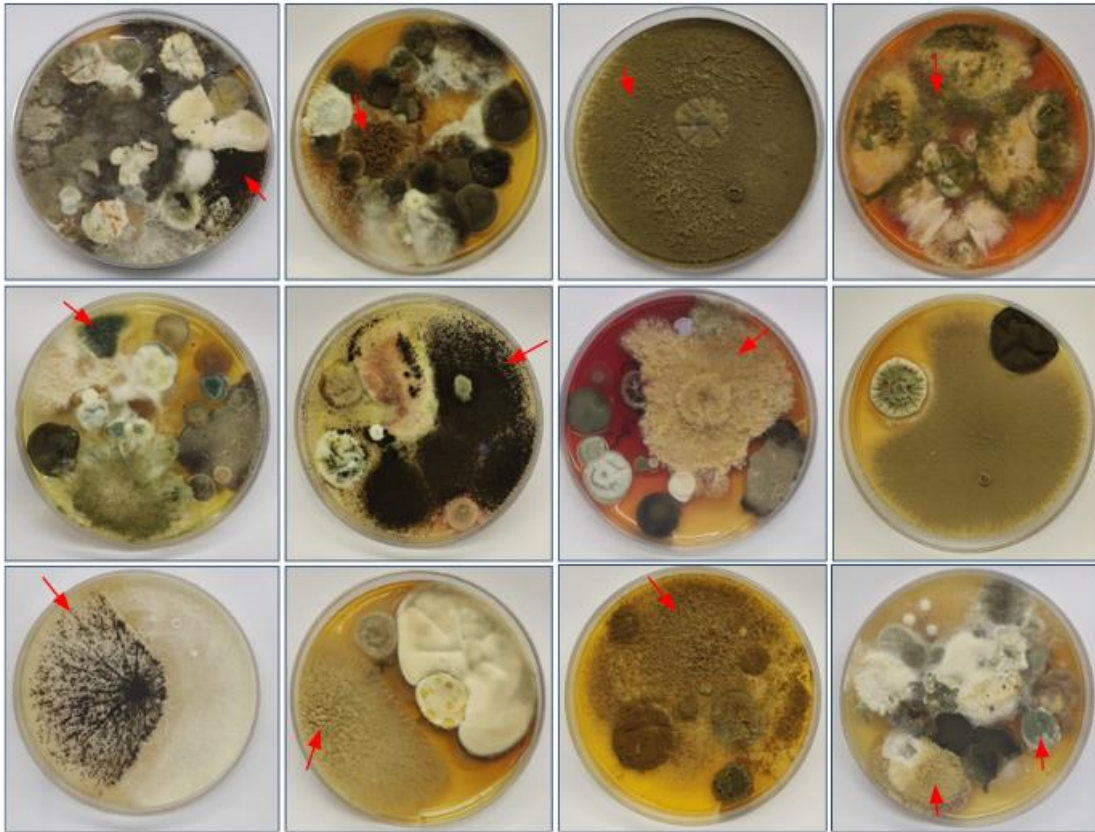
O número médio de colônias de *Aspergillus*, por placa foi de 1,6, sendo que 61% (50/82) das placas continham uma colônia de *Aspergillus* spp., 22% (18/82) continham duas colônias, 13,4% (11/82) continham três colônias, 2,4% (2/82) apresentaram quatro colônias e em 1,2% (1/82) foram observadas cinco colônias.

**Tabela 3.** Origem e número de placas de Petri positivas para colônias de *Aspergillus* spp.

Estado	Cidade	Número de placas	Bairro
São Paulo (71/82; 86,6%)	São Paulo (27/82; 32,9%)	27	Jurubatuba, Lapa, Butantã, Indianópolis, Mooca, Vila Morumbi, Pinheiros, Vila Pirituba, Bela Vista, Aclimação, São Miguel Paulista.
	Guarulhos (18,3%)	15	NI
	Suzano (7,3%)	6	NI
	Valinhos (3,6%)	3	NI
	Itú (3,6%)	3	São Luiz/Cruz das almas
	Santo André (2,4%)	2	Jaçatuba
	São José dos Campos (2,4%)	2	NI
	Barueri (2,4%)	2	NI
	Sorocaba (1,2%)	1	Praça Pio XII

	Mauá (1,2%)	1	Jardim Oratório
	Bauru (1,2%)	1	Distrito Industrial II
	Arujá (1,2%)	1	Centro Industrial
	Jacareí (1,2%)	1	NI
	São Bernardo do Campo (1,2%)	1	NI
	Mogi das Cruzes (1,2%)	1	NI
	Diadema (1,2%)	1	NI
	Campinas (1,2%)	1	NI
	Louveira (1,2%)	1	NI
	Ribeirão Preto (1,2%)	1	Jardim América
Minas Gerais (3/82; 3,6%)	Belo horizonte (1,2%)	1	NI
	Poços de calda (1,2%)	1	NI
	São Sebastião do Paraíso (1,2%)	1	NI
Rio de Janeiro (4/82; 4,9%)	Rio de Janeiro (3,6%)	2	Vila Isabel
		1	Madureira
	Rio das Ostras (1,2%)	1	NI
Rio Grande do Sul (3/82; 3,6%)	Viamão (1,2%)	1	NI
	Porto Alegre (2,4%)	2	Azenha
Bahia (1/82; 1,2%)	Salvador (1,2%)	1	NI

NI: Não Informado



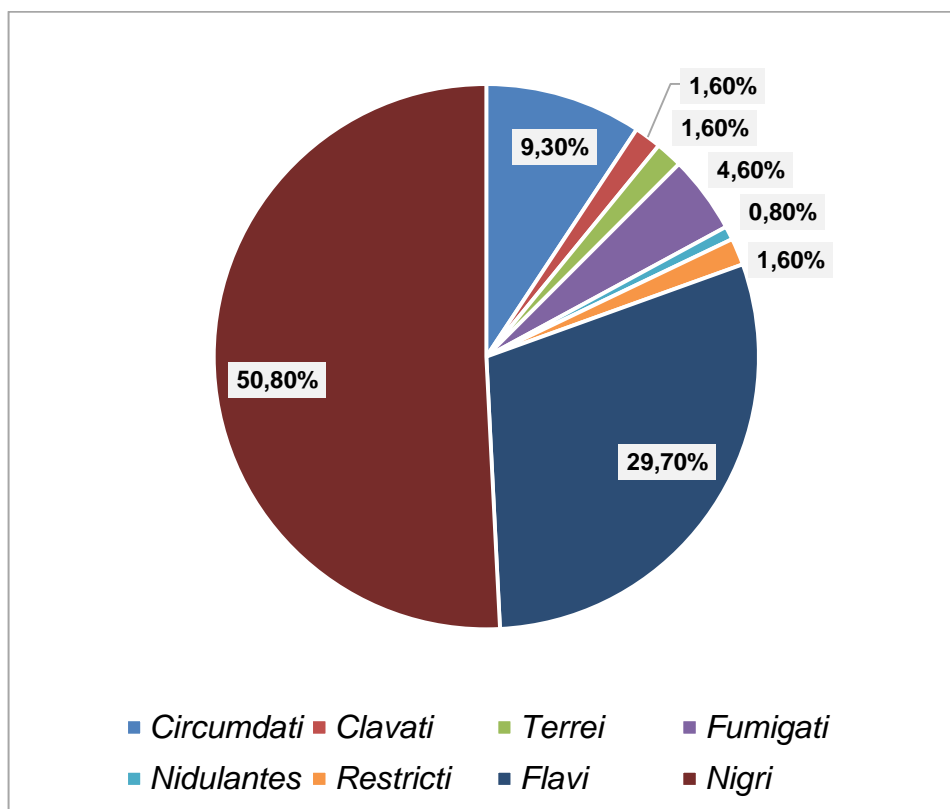
**Figura 12.** Placas contendo colônias fúngicas em ágar Sabouraud, incubadas a 30°C por 7 dias. Flechas indicam colônias com características de seções diversas de *Aspergillus*

Fonte: Acervo pessoal

#### 4.1 Seções e espécies

Cada colônia de *Aspergillus* foi considerada, para fins deste estudo, como um isolado, totalizando 130, dos quais dois (1,5%) não foram recuperados e, portanto, excluídos da análise.

Os 128 isolados de *Aspergillus* spp. foram separados em 8 seções, incluindo: *Nigri* (50,8%; 65/128), 29,7% (38/128) pertencente à seção *Flavi*, 9,3% (12/128) pertencente à seção *Circumdati*; 4,6% (6/128) pertencente à seção *Fumigati*; 1,6% (2/128) pertencente à seção *Restricti*; 1,6% (2/128) pertencente à seção *Clavati*, 1,6% (2/128) pertencente a seção *Terrei*, 0,8% (1/128) pertencente à seção *Nidulantes* (Figura 13).



**Figura 13.** Seções de 128 isolados de *Aspergillus* obtidos de ar atmosférico de 27 cidades de 5 estados Brasileiros, 2020

As espécies de 75% (96/128) isolados puderam ser definidas por sequenciamento dos genes da  $\beta$ -tubulina e da calmodulina avaliados de acordo com o banco de dados do *BLAST*, pertencentes ao *Genbank*, e estão retratadas na Tabela 4 e Figura 14.

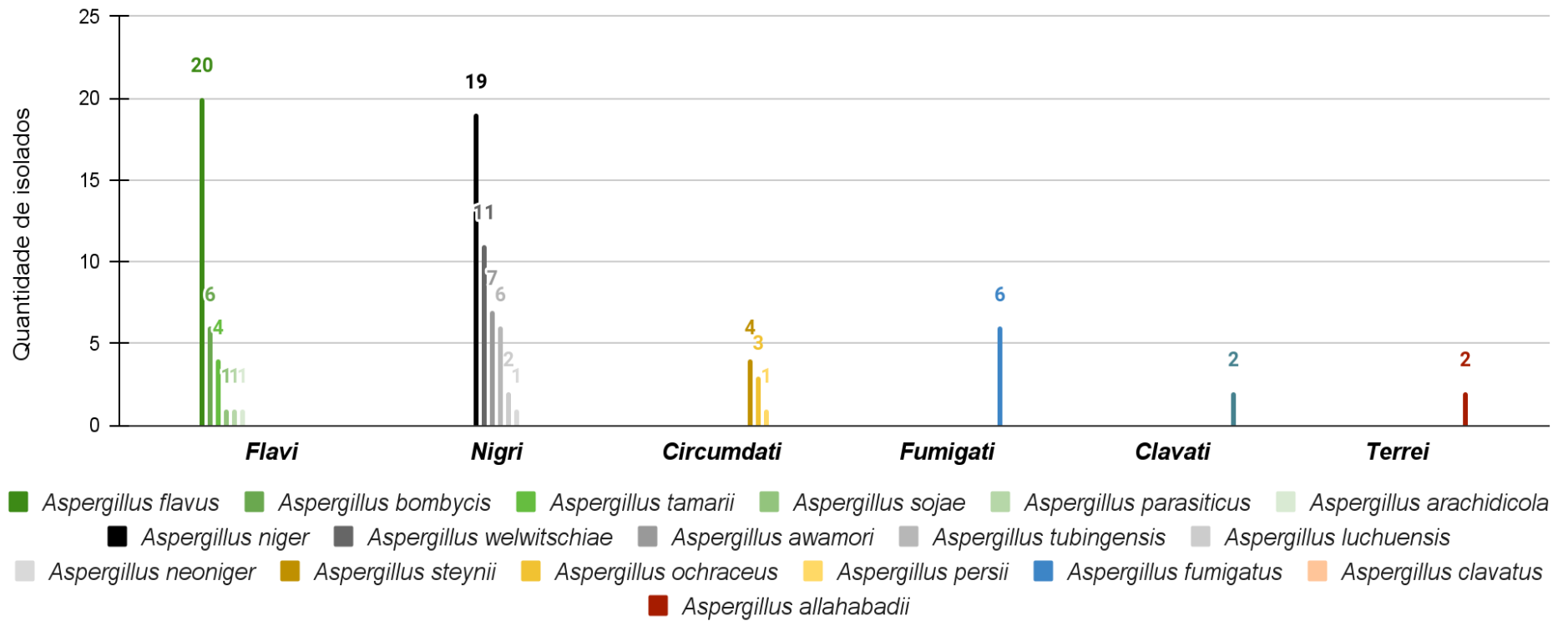
Para 20 sequenciamentos, a consulta a dois bancos de dados, *BLAST* (*Genbank*) e *Mycobank* (CBS-KNAW), gerou resultados conflitantes, desde que indicaram espécies distintas (Tabela 5). Para todos estes casos, considerou-se a espécie de acordo com o resultado do *Genbank*.

Para os demais isolados (25%; 32/128) os resultados de identificação de espécie foram inconclusivos, após sequenciamento gênico (37,5%; 12/32) ou não foram obtidos por problemas técnicos na fase de extração de DNA (62,5%; 20/32), impedindo o sequenciamento posterior (Tabela 6).

**Tabela 4.** Espécies de 96 isolados de *Aspergillus* obtidos de ar atmosférico de 23 cidades em 5 estados do Brasil, em 2020.

<b>Espécie</b>	<b>Gene Sequenciado</b>	<b>Seção</b>
<i>Aspergillus flavus</i> (n= 20)	$\beta$ -tubulina	Flavi
<i>Aspergillus bombycis</i> (n= 6)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Flavi
<i>Aspergillus tamaraii</i> (n= 4)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Flavi
<i>Aspergillus sojae</i> (n= 1)	$\beta$ -tubulina	Flavi
<i>Aspergillus parasiticus</i> (n= 1)	$\beta$ -tubulina	Flavi
<i>Aspergillus arachidicola</i> (n= 1)	$\beta$ -tubulina	Flavi
<i>Aspergillus niger</i> (n= 19)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Nigri
<i>Aspergillus neoniger</i> (n= 1)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Nigri
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (n= 11)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Nigri
<i>Aspergillus awamori</i> (n= 7)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Nigri
<i>Aspergillus luchuensis</i> (n=2)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Nigri
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n= 6)	$\beta$ -tubulina/Calmodulina	Nigri
<i>Aspergillus steynii</i> (n= 4)	$\beta$ -tubulina	Circumdati
<i>Aspergillus ochraceus</i> (n= 2)	$\beta$ -tubulina	Circumdati
<i>Aspergillus persii</i> (n= 1)	$\beta$ -tubulina	Circumdati
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n= 6)	$\beta$ -tubulina	Fumigati
<i>Aspergillus allahabadii</i> (n= 2)	$\beta$ -tubulina	Terrei
<i>Aspergillus clavatus</i> (n= 2)	$\beta$ -tubulina	Clavati





**Figura 14.** Espécies de 96 isolados de *Aspergillus*, de acordo com a seção, obtidos de ar atmosférico de 23 cidades de 5 estados do Brasil, em 2020.

**Tabela 5.** Resultados divergentes na identificação de espécie de 20 isolados, segundo dois bancos de dados utilizados (*BLAST* e *Mycobank*)

<i>Mycobank</i>	<i>BLAST</i>	Seção
<i>Aspergillus oryzae</i> S:86.36% O:94.57%	<i>Aspergillus flavus</i> QC:99% PI:92.74%	Flavi
<i>Aspergillus parasiticus</i> S:90.49% O:85.61%	<i>Aspergillus flavus</i> QC:100% PI:93.29%	Flavi
<i>Aspergillus arachidicola</i> S: 99.43% O: 99.81%	<i>Aspergillus parasiticus</i> QC:100% PI:99.43%	Flavi
<i>Aspergillus arachidicola</i> S: 99.44% O: 99.81%	<i>Aspergillus sojae</i> QC:100% PI:99.06%	Flavi
<i>Aspergillus parasiticus</i> S: 99.43% O: 99.81%	<i>Aspergillus arachidicola</i> QC:99% PI:99.43%	Flavi
<i>Aspergillus latus</i> <i>Aspergillus quadrilineatus</i> <i>Emericella nidulans</i> S:100% O:94.25%	<i>Emericella nidulans</i> <i>Emericella parvathecia</i> <i>Aspergillus latus</i> QC:99% PI:99.72%	Nidulantes
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> S:98.38 % O:96.21%	<i>Aspergillus niger</i> QC: 99% PI: 98.65%	Nigri
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> S:99.42 % O:85.95%	<i>Aspergillus niger</i> QC: 99 PI: 99.83%	Nigri
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> S:99.56 % O:92.78%	<i>Aspergillus niger</i> QC: 99% PI: 99.38%	Nigri
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> S:99.62 % O:88.44%	<i>Aspergillus niger</i> QC: 100% PI: 99.83%	Nigri
<i>Aspergillus tubingensis</i> S:86.93 % O:88.09%	<i>Aspergillus neoniger</i> QC: 97% PI: 91%	Nigri
<i>Aspergillus welwitschiae</i> S: 98.88% O: 90.83%	<i>Aspergillus awamori</i> QC: 99% PI: 99.64%	Nigri
<i>Aspergillus welwitschiae</i> S: 99.82% O: 92.50%	<i>Aspergillus awamori</i> QC: 100% PI: 98.49%	Nigri
<i>Aspergillus welwitschiae</i> S: 99.81% O: 98.88%	<i>Aspergillus awamori</i> QC: 100% PI: 99.81%	Nigri
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	Nigri

S: 100% O: 93.75%	QC: 99% PI: 99,61%	
<i>Aspergillus welwitschiae</i> S: 99.43% O: 97.94%	<i>Aspergillus awamori</i> QC: 99% PI: 99.81%	Nigri
<i>Aspergillus welwitschiae</i> S: 98.65% O: 96.82%	<i>Aspergillus awamori</i> QC: 99% PI: 99.25%	Nigri
<i>Aspergillus niger</i> S: 99.48% O: 96.78%	<i>Aspergillus awamori</i> QC: 99% PI: 99,66%	Nigri
<i>Aspergillus neoniveus</i> S: 90.56% O: 97.87%	<i>Aspergillus allahabadii</i> QC:100% PI:97.07%	Flavipedes/ Terrei*
<i>Aspergillus neoniveus</i> S: 95.79% O: 99.81%	<i>Aspergillus allahabadii</i> QC:99% PI:98.85%	Flavipedes/ Terrei*

QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição). \* *A. neoniveus* e *A. allahabadii* são respectivamente das seções *Flavipedes* e *Terrei*.

**Tabela 6.** Seções de 32 isolados sem identificação de espécie, devido a resultados inconclusivos no sequenciamento ou não sequenciados, obtidos de ar atmosférico de 23 cidade de 5 estados do Brasil, 2020

Seção	Espécie	Gene Sequenciado
<i>Nidulantes</i> (n=1)	<i>Aspergillus latus</i> / <i>Aspergillus quadrilineatus</i> / <i>Emericella nidulans</i> (n= 1)	$\beta$ -tubulina
<i>Nigri</i> (n=7)	<i>Aspergillus welwitschiae</i> / <i>Aspergillus niger</i> (n= 7)	$\beta$ -tubulina
<i>Nigri</i> (n=3)	<i>Aspergillus tubingensis</i> / <i>Aspergillus neoniger</i> / <i>Aspergillus costaricensis</i> (n= 3)	$\beta$ -tubulina
<i>Nigri</i> (n=1)	<i>Aspergillus luchuensis</i> / <i>Aspergillus niger</i> (n= 1)	$\beta$ -tubulina
<i>Circumdati</i> (n=5)	—	—
<i>Nigri</i> (n=8)	—	—
<i>Flavi</i> (n=5)	—	—
<i>Restricti</i> (n=2)	—	—

## 4.2 Sensibilidade a antifúngicos

A sensibilidade global, a quatro fármacos e a tres fungicidas agrícolas, dos 128 isolados de *Aspergillus* spp. está representada na Tabela 7 e Figura 15. A moda para o itraconazol foi de 0,5 mg/L, para voriconazol foi 0,25 mg/L, posaconazol foi 0,5 mg/L, metconazol foi 0,25 mg/L, tebuconazol foi 1,0 mg/L, difenoconazol foi 1,0 mg/L e para anfotericina B foi 1,0 mg/L. Diferença significativa ( $p < 0,05$  no teste T, assim como no teste de Wilcoxon) foi observada entre a média de MIC dos fármacos azólicos e dos fungicidas agrícolas, indicando menor sensibilidade do conjunto de isolados para os fungicidas.

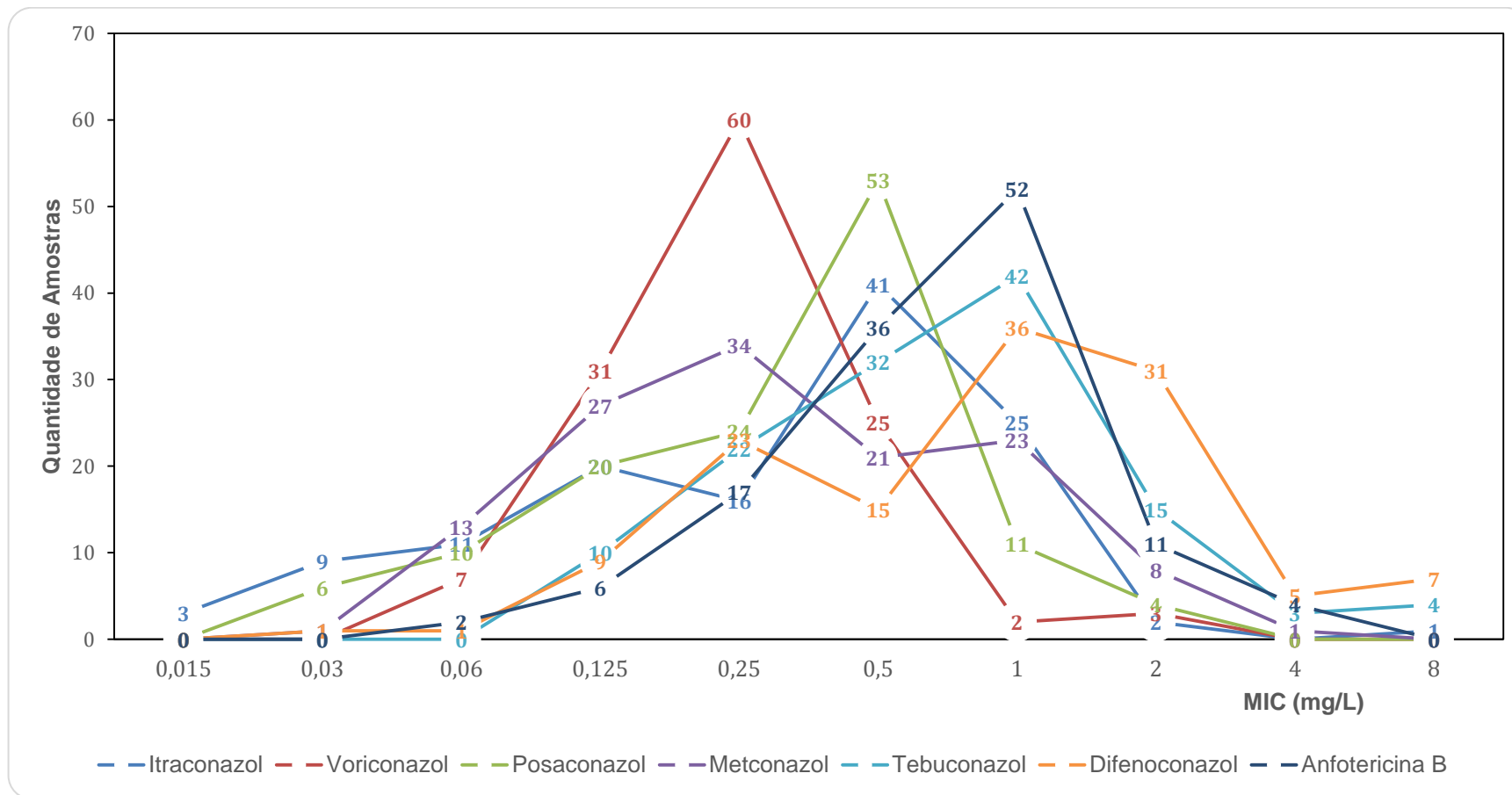
Para a análise dos resultados de MIC, foram ainda determinados os valores que englobam 50% dos isolados ( $MIC_{50}$ ) e os valores que englobam 90% ( $MIC_{90}$ ) dos isolados.

Os dados de identificação de seção, espécie e MIC obtidos para todos os 128 isolados constam do Apêndice 1.

**Tabela 7.** Distribuição de valores e intervalo de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de anfotericina B e 6 compostos triazólicos, fármacos e fungicidas agrícolas, frente a 128 isolados de *Aspergillus* spp., obtidos do ar atmosférico de 27 cidades de 5 estados do Brasil, 2020

Antifúngico	MIC (mg/L)			Nº de isolados para os quais MIC (mg/L) foi:									
	Intervalo	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,015-8	0,5	1	3	9	11	20	16	<b>41</b>	25	2	0	1
VCZ	0,06-2	0,25	0,5	0	0	7	31	<b>60</b>	25	2	3	0	0
PSZ	0,03-2	0,25	1	0	6	10	20	24	<b>53</b>	11	4	0	0
MTZ	0,03-2	0,25	1	0	1	13	27	<b>34</b>	21	23	8	1	0
TBZ	0,12-8	0,5	2	0	0	0	10	22	32	<b>42</b>	15	3	4
DFZ	0,03-8	1	2	0	1	1	9	23	15	<b>36</b>	31	5	7
AMB	0,06-8	1	2	0	0	2	6	17	36	<b>52</b>	11	4	0

MIC, concentração inibitória mínima; MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> valores que englobam 50% e 90% dos isolados, respectivamente; ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: anfotericina B  
Em negrito os valores modais para cada antifúngico



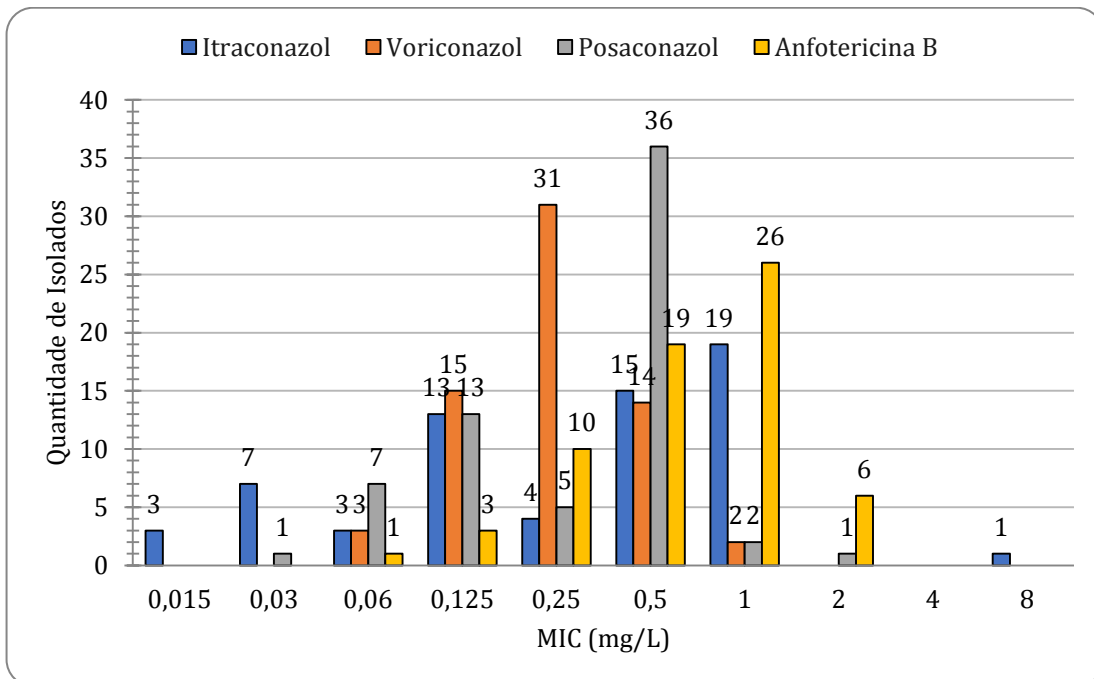
**Figura 15.** Sensibilidade (MIC; mg/L) de 128 isolados de *Aspergillus* spp., frente a 3 fármacos triazólicos, anfotericina B e 3 fungicidas triazólicos

A sensibilidade aos antifúngicos foi analisada segundo a seção de *Aspergillus*. Na seção *Nigri*, foram identificados 13 isolados de *Aspergillus niger* que se apresentaram sensíveis para anfotericina B (tabela 1) e 6 isolados considerados não selvagens, por apresentarem valor de MIC superior ao ECOFF determinado. Para os demais antifúngicos clínicos (itraconazol, voriconazol e posaconazol) os isolados podem ser classificados de acordo com ECOFF (tabela 2) como selvagens (apêndice 1). Os demais isolados da seção *Nigri* e pertencentes a outras espécies apresentaram valores dentro do ECOFF definido para *Aspergillus niger*. No entanto, um isolado identificado como *Aspergillus welwitschiae* foi classificado como não selvagem para itraconazol (Tabela 8, Figuras 16 e 17; Apêndice 1). Os valores de MIC dos três fungicidas de uso agrícola não foram correlacionados aos dos fármacos azólicos ( $p= 0,25$ ).

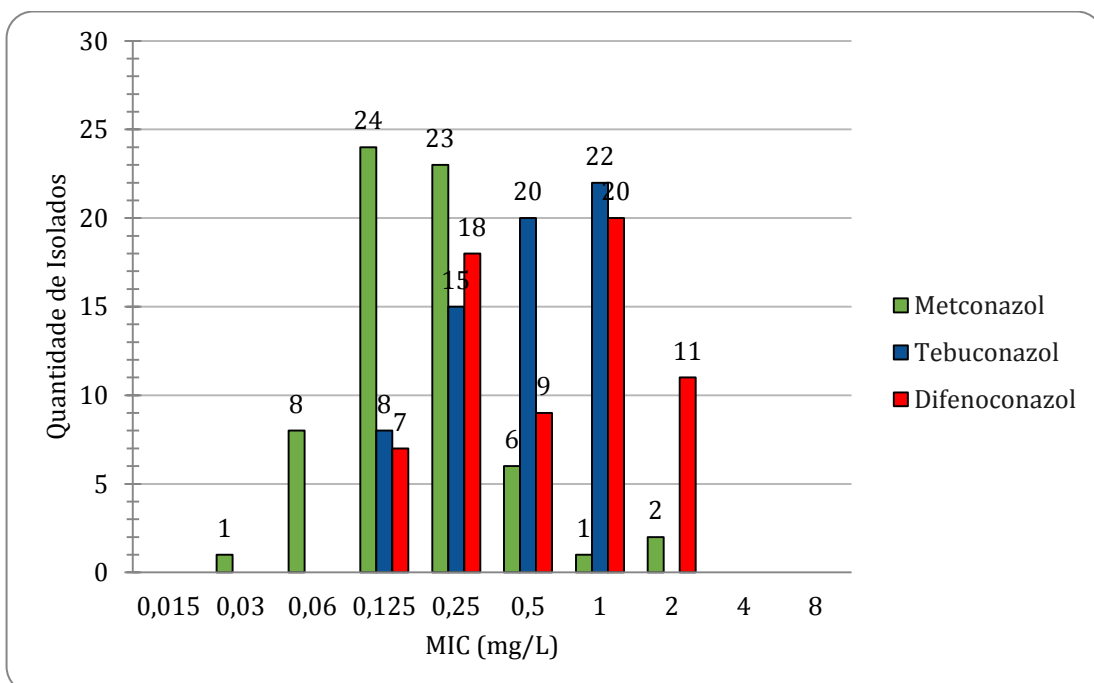
**Tabela 8.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de fármacos e fungicidas agrícolas, frente a 65 isolados da seção *Nigri*

ANT.	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Número de isolados para os quais MIC (mg/L) foi de:									
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,5	1	3	7	3	13	4	15	19	0	0	1
VCZ	0,25	0,5	0	0	3	15	31	14	2	0	0	0
PSZ	0,5	0,5	0	1	7	13	5	36	2	1	0	0
MTZ	0,125	0,5	0	1	8	24	23	6	1	2	0	0
TBZ	0,5	1	0	0	0	8	15	20	22	0	0	0
DFZ	0,5	2	0	0	0	7	18	9	20	11	0	0
AMB	0,5	1	0	0	1	3	10	19	26	6	0	0

MIC (mg/L), concentração inibitória mínima; MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> valores que englobam 50% e 90% dos isolados, respectivamente; ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: anfotericina B.



**Figura 16.** Sensibilidade de 65 isolados da seção *Nigri* frente a três fármacos triazólicos e à anfotericina B



**Figura 17.** Sensibilidade de 65 isolados da seção *Nigri* frente a três fungicidas agrícolas

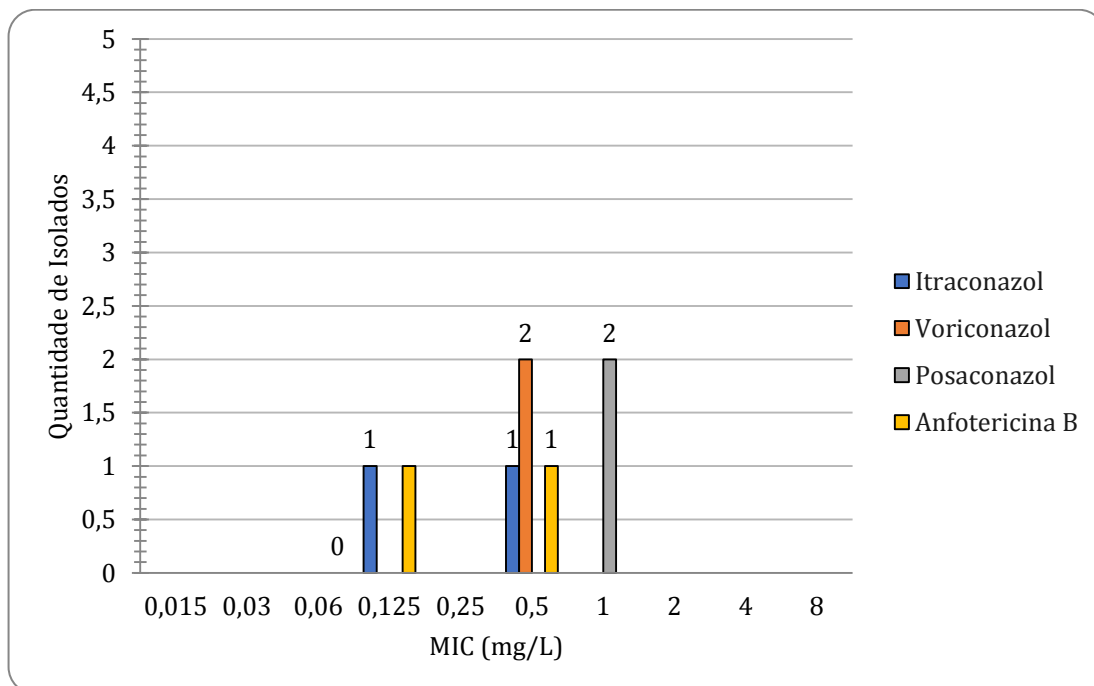


Os dois isolados da seção *Clavati*, ambos *Aspergillus clavatus*, não puderam ser classificados quanto à sensibilidade, desde que, não há *breakpoint* nem ECOFF disponível pelo EUCAST. Para os antifúngicos clínicos, assim como, para tebuconazol e metconazol os resultados de MIC dessa espécie situaram-se no valor modal, enquanto MIC de difenoconazol e MIC de posaconazol ficaram acima da moda global, ou seja, aquela encontrada para o total de 128 isolados (Tabelas 7 e 9, Figuras 18 e 19).

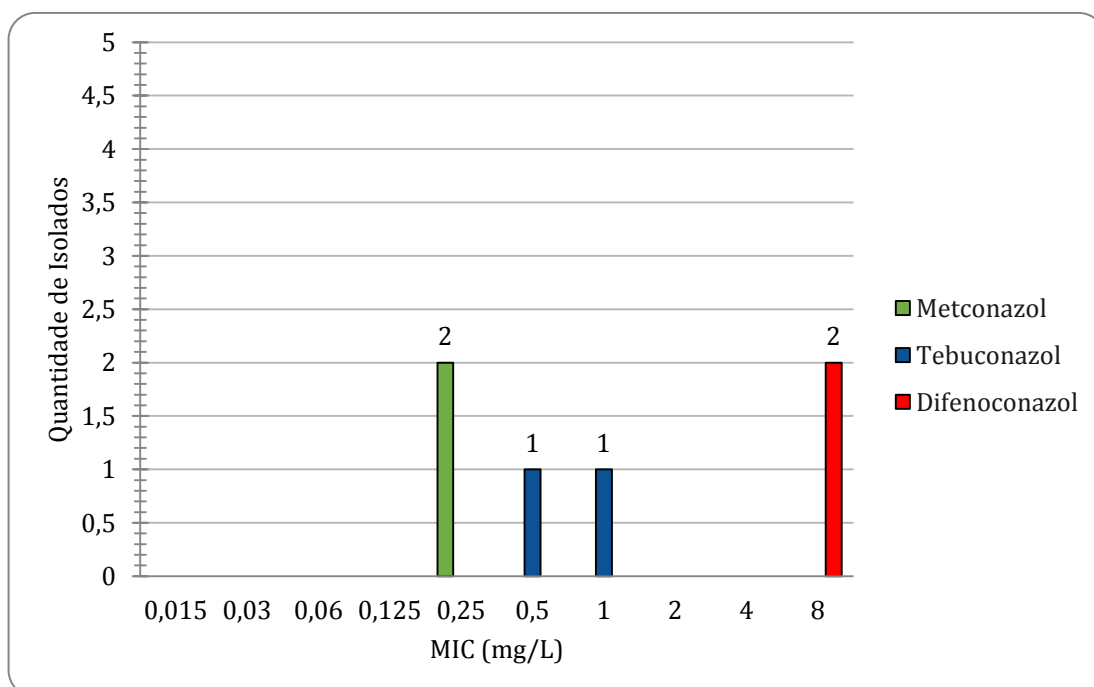
**Tabela 9.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de fármacos e fungicidas, frente a 2 isolados da seção *Clavati*

ANT.	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Número de isolados para os quais MIC (mg/L) foi de:									
			0,0015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,125	0,5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
VCZ	0,5	0,5	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
PSZ	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
MTZ	0,25	0,25	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
TBZ	0,5	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
DFZ	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
AMB	0,06	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0

ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: anfotericina B



**Figura 18.** Sensibilidade de 2 isolados da seção *Clavati* frente a três fármacos triazólicos e à anfotericina B



**Figura 19.** Sensibilidade de 2 isolados da seção *Clavati* frente a três fungicidas agrícolas

Para isolados da seção *Terrei*, os valores de MIC de todos os antifúngicos ficaram dentro da moda global (Tabela 10, Figuras 20 e 21).

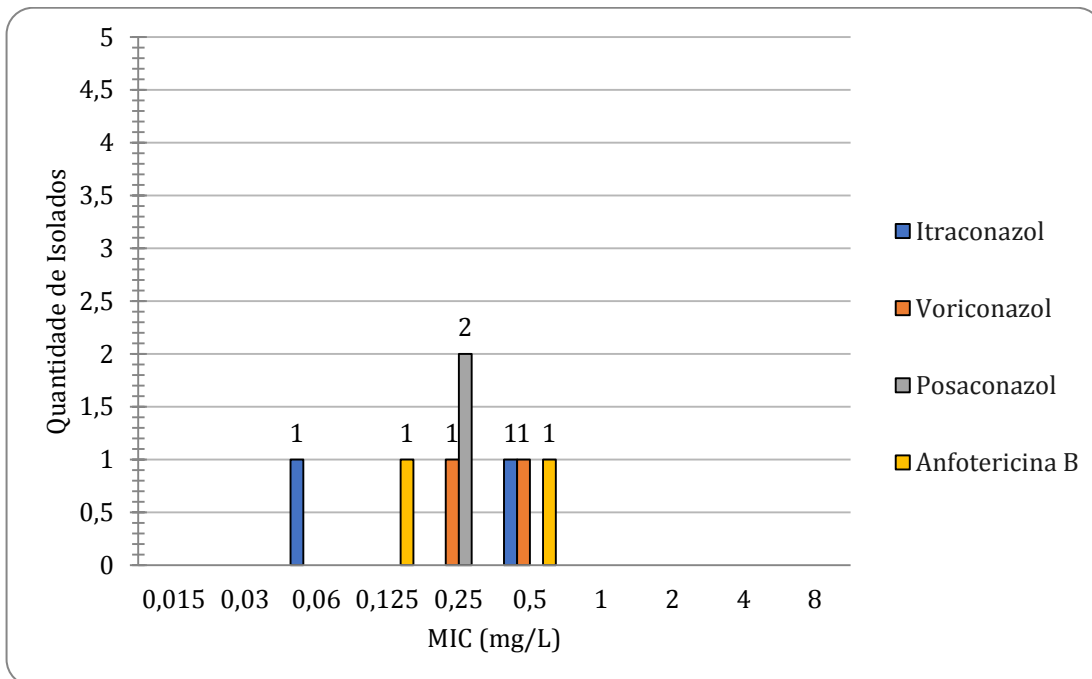
Os resultados de sensibilidade para o isolado da seção Nidulantes constam na Tabela 11 e Figuras 22 e 23. Os valores de MIC foram próximos aos das modas globais e semelhantes entre fungicidas agrícolas e antifúngicos clínicos.

Todos os 6 isolados pertencentes à seção *Fumigati* foram identificados como *Aspergillus fumigatus*, os quais foram classificados como sensíveis para os quatro antifúngicos clínicos (itraconazol, posaconazol, voriconazol e anfotericina B) (Tabela 12, Figuras 24 e 25). Os valores de MIC dos antifúngicos clínicos e fungicidas agrícolas foram próximos e os de metconazol situaram-se acima da moda global.

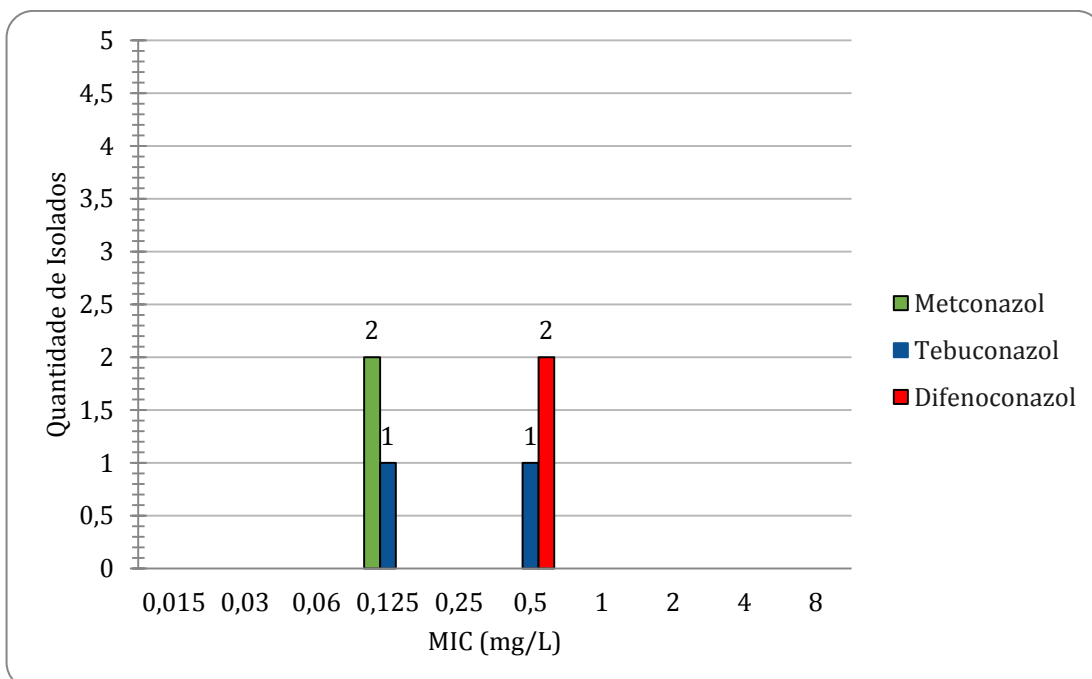
**Tabela 10.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> encontrados frente a 2 isolados da seção *Terrei*

ANT.	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Número de isolados para os quais MIC (mg/L) foi de:									
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,125	0,5	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
VCZ	0,5	0,5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
PSZ	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
MTZ	0,25	0,25	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
TBZ	0,5	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
DFZ	8	8	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
AMB	0,125	0,5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0

ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: anfotericina B



**Figura 20.** Sensibilidade de 2 Isolados da seção *Terrei* frente a fármacos triazólicos e anfotericina B

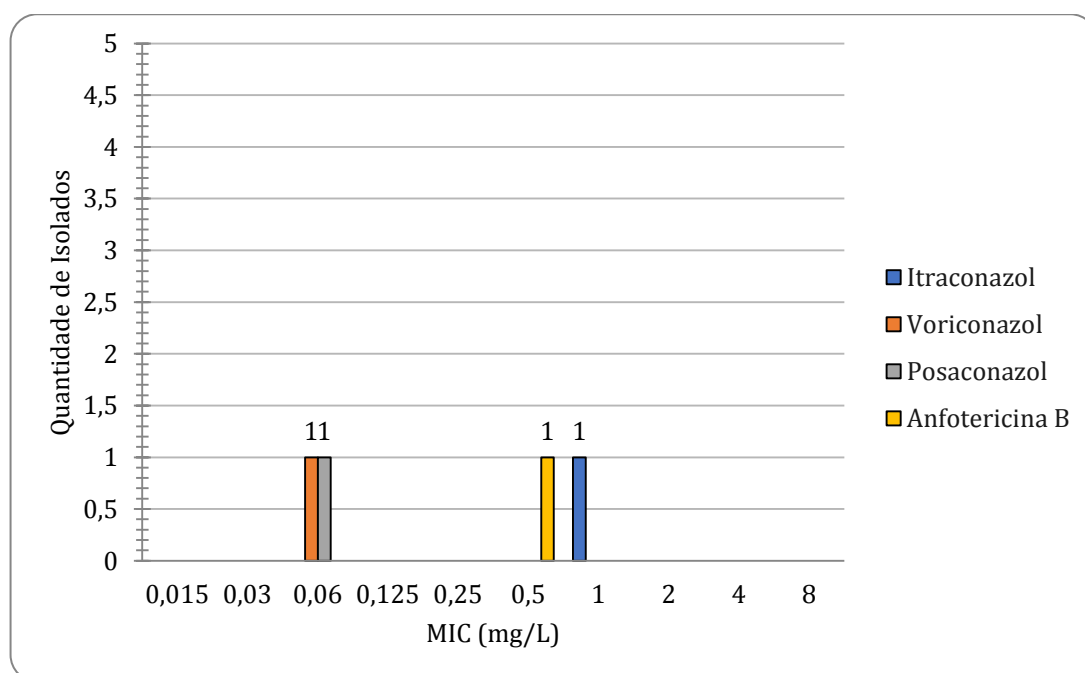


**Figura 21.** Sensibilidade de 2 Isolados da seção *Terrei* frente a três fungicidas agrícolas

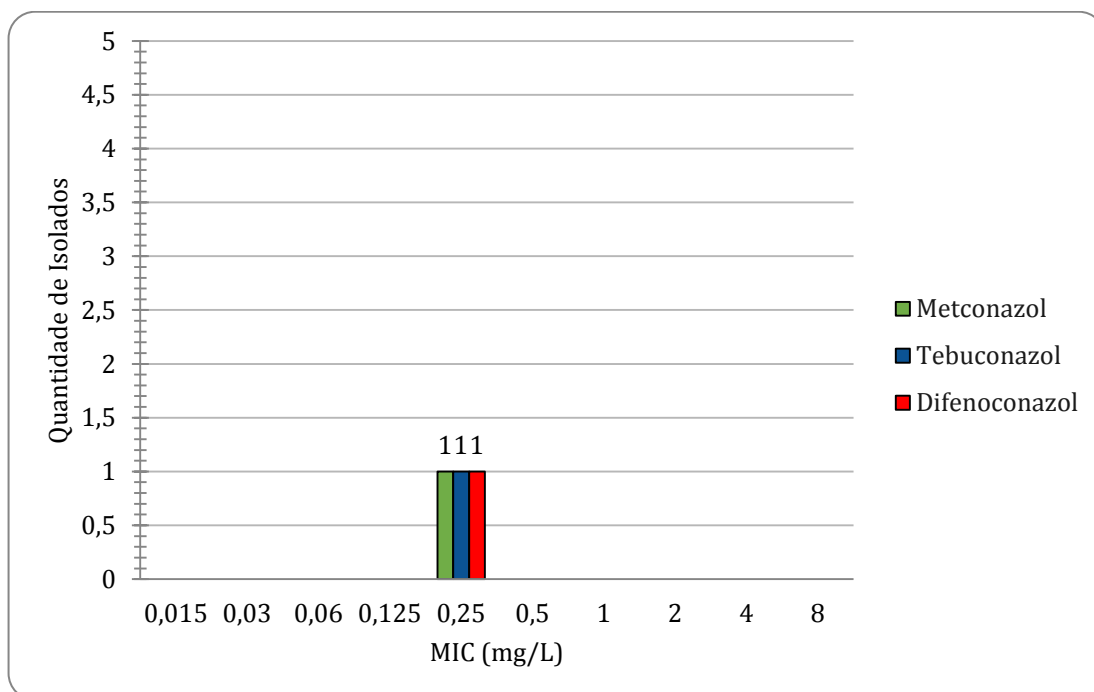
**Tabela 11.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de fármacos e fungicidas frente a um isolado da seção *Nidulantes*

ANT.	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Número de isolados para os quais MIC (mg/L) foi de:										
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	
ITZ	0,125	0,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
VCZ	0,5	0,5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PSZ	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MTZ	0,25	0,25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
TBZ	0,5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
DFZ	8	8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AMB	0,125	0,5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: anfotericina B



**Figura 22.** Sensibilidade de isolado da seção *Nidulantes* frente a fármacos triazólicos e anfotericina B

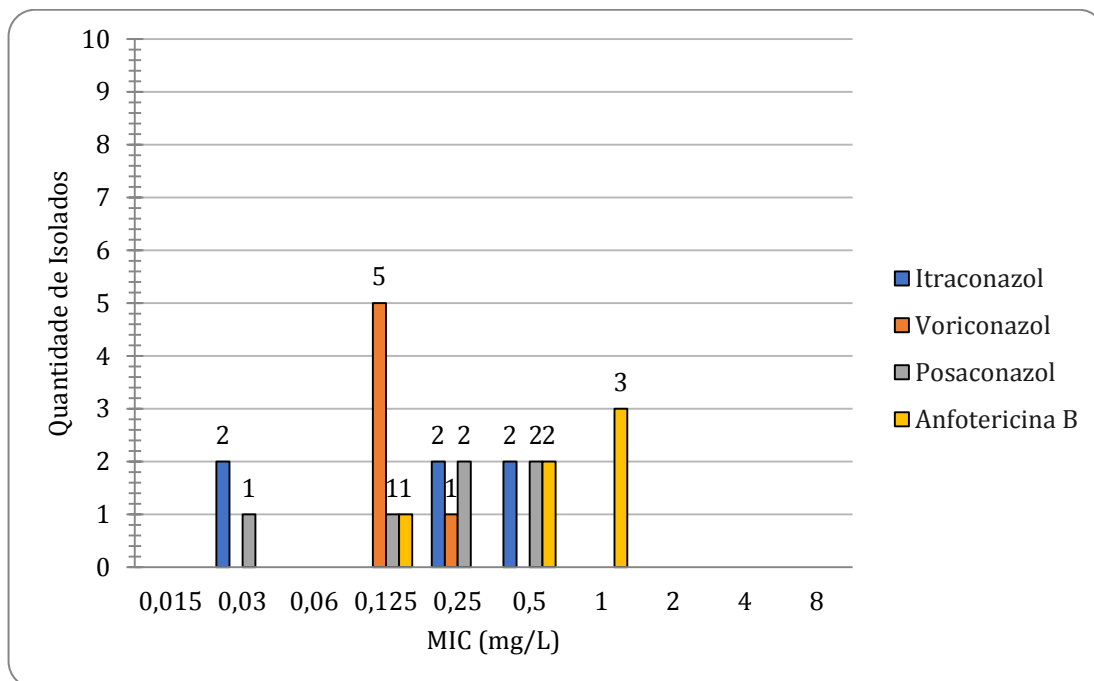


**Figura 23.** Sensibilidade de isolado da seção *Nidulantes* frente a três fungicidas agrícolas

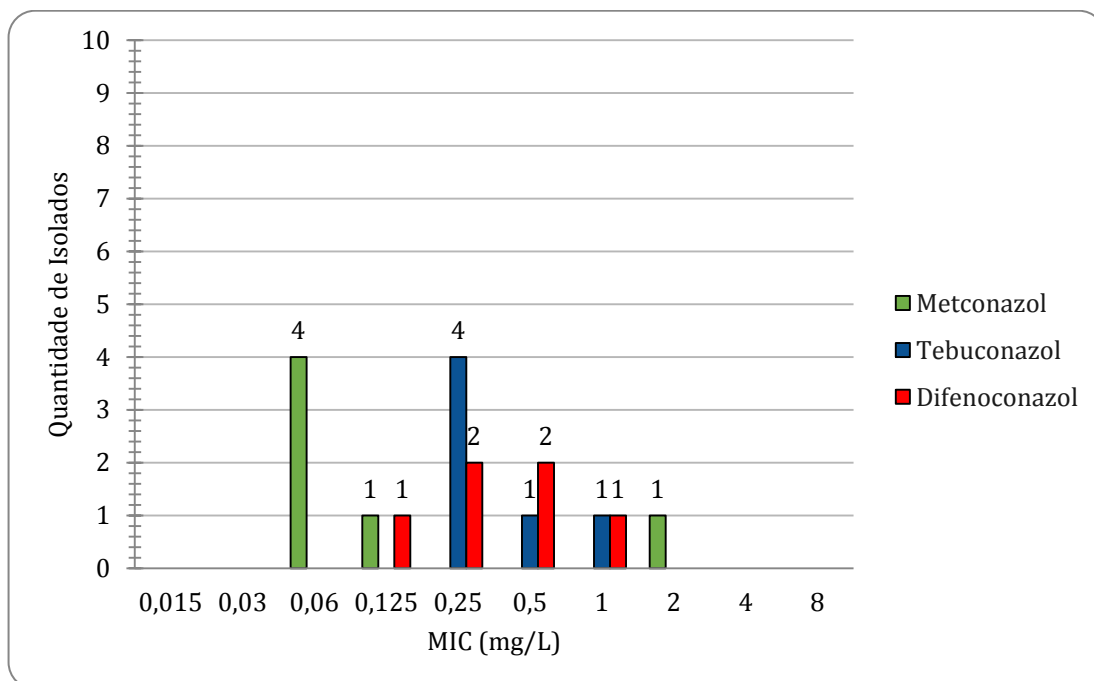
**Tabela 12.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de fármacos e fungicidas frente a 6 isolados de *Aspergillus fumigatus*

ANT.	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Número de isolados para os quais MIC (mg/L) foi de:									
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,25	0,5	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0
VCZ	0,125	0,25	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0
PSZ	0,25	0,5	0	1	0	1	2	2	0	0	0	0
MTZ	0,06	2	0	0	4	1	0	0	0	1	0	0
TBZ	0,25	1	0	0	0	0	4	1	1	0	0	0
DFZ	0,25	1	0	0	0	1	2	2	1	0	0	0
AMB	0,5	1	0	0	0	1	0	2	3	0	0	0

ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: *amphotericin B* (Anfotericina B).



**Figura 24.** Sensibilidade de 6 isolados de *Aspergillus fumigatus* frente aos fármacos triazólicos e anfotericina B



**Figura 25.** Sensibilidade de 6 isolados de *Aspergillus fumigatus* frente a três fungicidas agrícolas

Na seção *Flavi* (n=38), 20 (52,6%; 18/38) isolados foram identificados como *Aspergillus flavus*, os quais foram classificados como sensíveis para

itraconazol e selvagem para voriconazol, posaconazol, anfotericina B (Tabela 13).

Para um isolado de *Aspergillus tamaritii* o MIC de voriconazol (2,0 mg/L) ficou acima do valor da moda global (Tabela 7 e 13; Figuras 26 e 27).

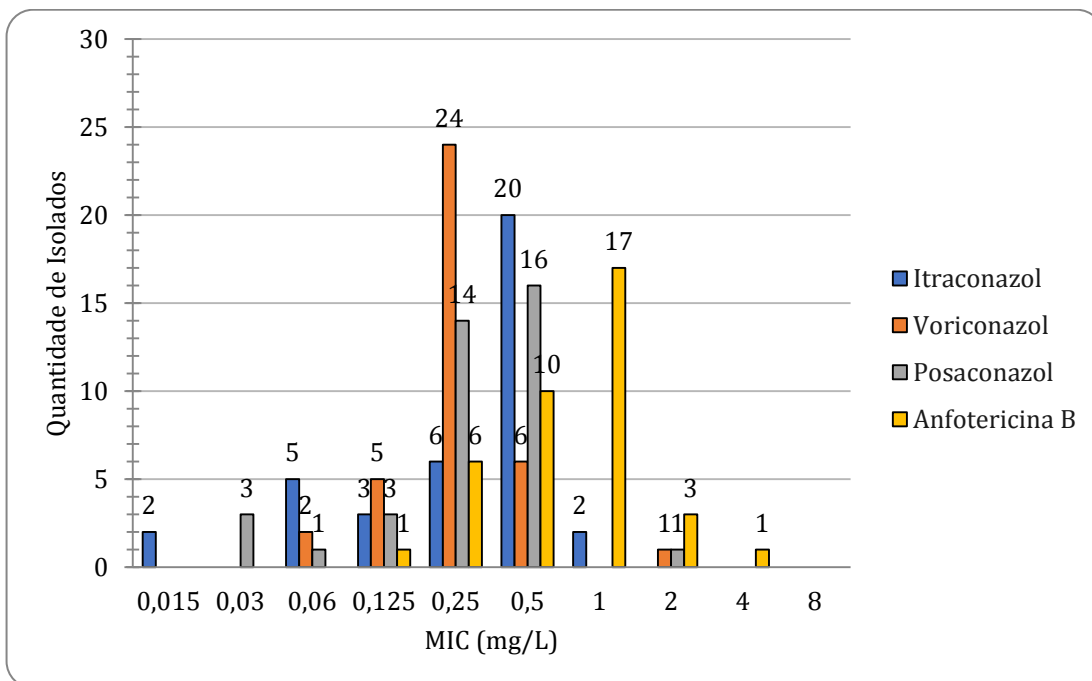
Os resultados de MIC dos fungicidas agrícolas da seção *Flavi* foram maiores do que os de antifúngicos clínicos, como observado nas figuras 26 e 27, ainda que sem significância estatística ( $p=0,6$ ).

**Tabela 13.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de fármacos e fungicidas, frente a 38 isolados da seção *Flavi*

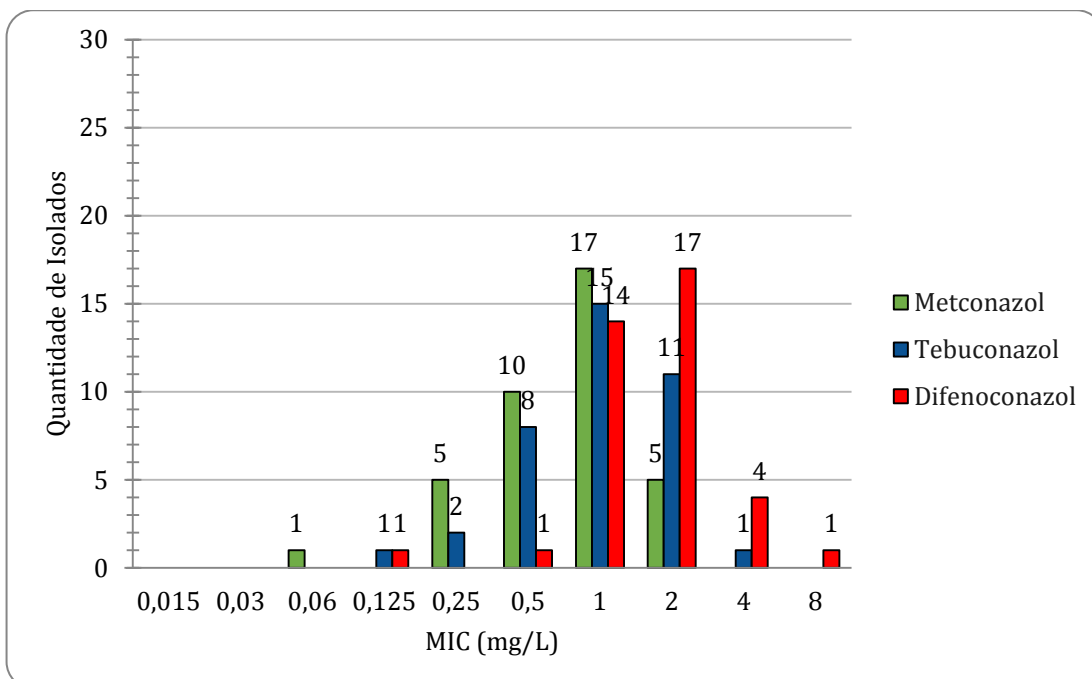
ANT.	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Número de isolados para os quais MIC (mg/L) foi de:									
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,5	0,5	2	0	5	3	6	20	2	0	0	0
VCZ	0,25	0,5	0	0	2	5	24	6	0	1	0	0
PSZ	0,25	0,5	0	3	1	3	14	16	0	1	0	0
MTZ	1	2	0	0	1	0	5	10	17	5	0	0
TBZ	1	2	0	0	0	1	2	8	15	11	1	0
DFZ	2	4	0	0	0	1	0	1	14	17	4	1
AMB	1	1	0	0	0	1	6	10	17	3	1	0

ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: anfotericina B





**Figura 26.** Sensibilidade de 38 isolados da seção *Flavi* frente aos fármacos triazólicos e à anfotericina B



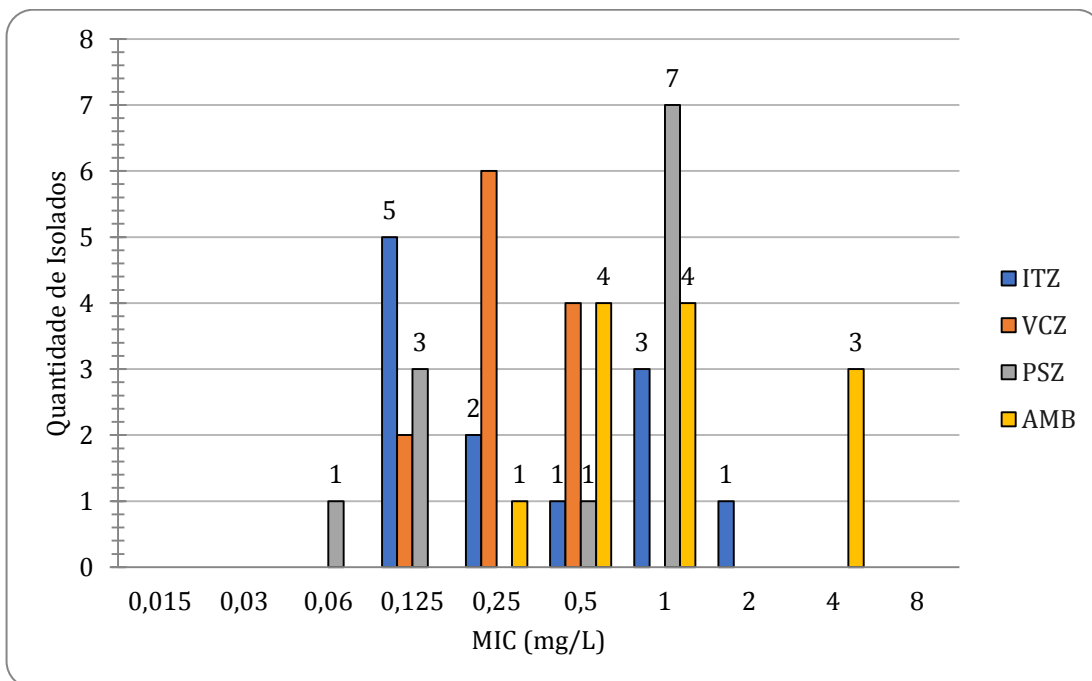
**Figura 27.** Sensibilidade de 38 isolados da seção *Flavi* frente a três fungicidas agrícolas

Dentre 12 isolados da seção *Circumdati*, um apresentou altos valores de MIC de itraconazol (2 mg/L) e de tebuconazol (8 mg/L). Para outro isolado, identificado como *Aspergillus persii*, também foi encontrado MIC alto de tebuconazol (8 mg/L). Para o isolado de *Aspergillus ochraceus*, encontrou-se MIC elevado para todos os fungicidas agrícolas (metconazol MIC 4 mg/L, difenoconazol MIC 8 mg/L, tebuconazol MIC 8 mg/L) (Tabela 14, Figuras 28 e 29). Os resultados de MIC apresentaram significância estatística quando comparados os antifúngicos clínicos com os fungicidas agrícolas ( $p=0,03$ ). Assim, os isolados da seção *Circumdati* apresentaram valores de MIC mais elevados para os fungicidas agrícolas quando comparados com os antifúngicos clínicos

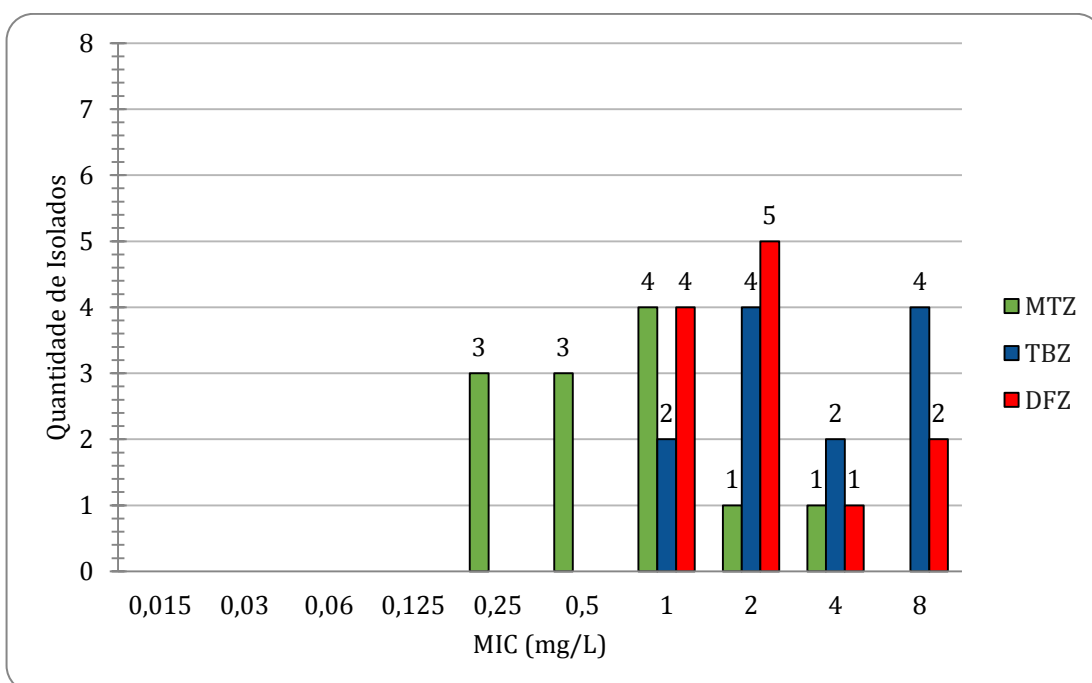
**Tabela 14.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de fármacos e fungicidas para 12 isolados da seção *Circumdati*

ANT.	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Número de isolados para os quais MIC (mg/L) foi de:									
			0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,25	1	0	0	0	5	2	1	3	1	0	0
VCZ	0,25	0,5	0	0	0	2	6	4	0	0	0	0
PSZ	1	1	0	0	1	3	0	1	7	0	0	0
MTZ	0,5	2	0	0	0	0	3	3	4	1	1	0
TBZ	2	8	0	0	0	0	0	0	2	4	2	4
DFZ	2	8	0	0	0	0	0	0	4	5	1	2
AMB	1	4	0	0	0	0	1	4	4	0	3	0

ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: *amphotericin B* (Anfotericina B).



**Figura 28.** Sensibilidade de 12 isolados da seção *Circumdati* frente aos fármacos triazólicos e à anfotericina B



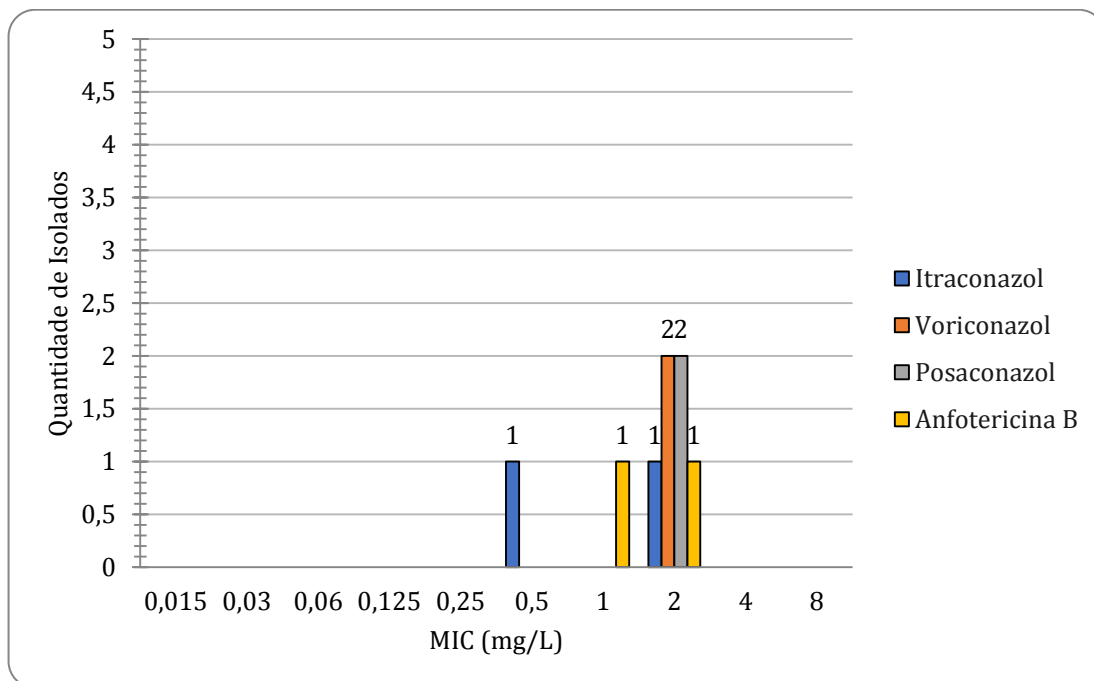
**Figura 29.** Sensibilidade de 12 isolados da seção *Circumdati* frente a três fungicidas agrícolas

Para a seção *Restricti* não existem *breakpoints* clínicos e nem pontos de corte epidemiológico (ECOFF). Os dois isolados apresentaram valores elevados de MIC, tanto para os antifúngicos clínicos quanto para os fungicidas agrícolas, em relação aos valores globais encontrados neste estudo (Tabela 15). Um isolado apresentou valores de MIC de itraconazol e de voriconazol (MIC 2 mg/L) situados acima da moda global. O mesmo foi observado para o outro isolado, frente ao voriconazol (MIC 2 mg/L) (Tabela 15, Figuras 30 e 31).

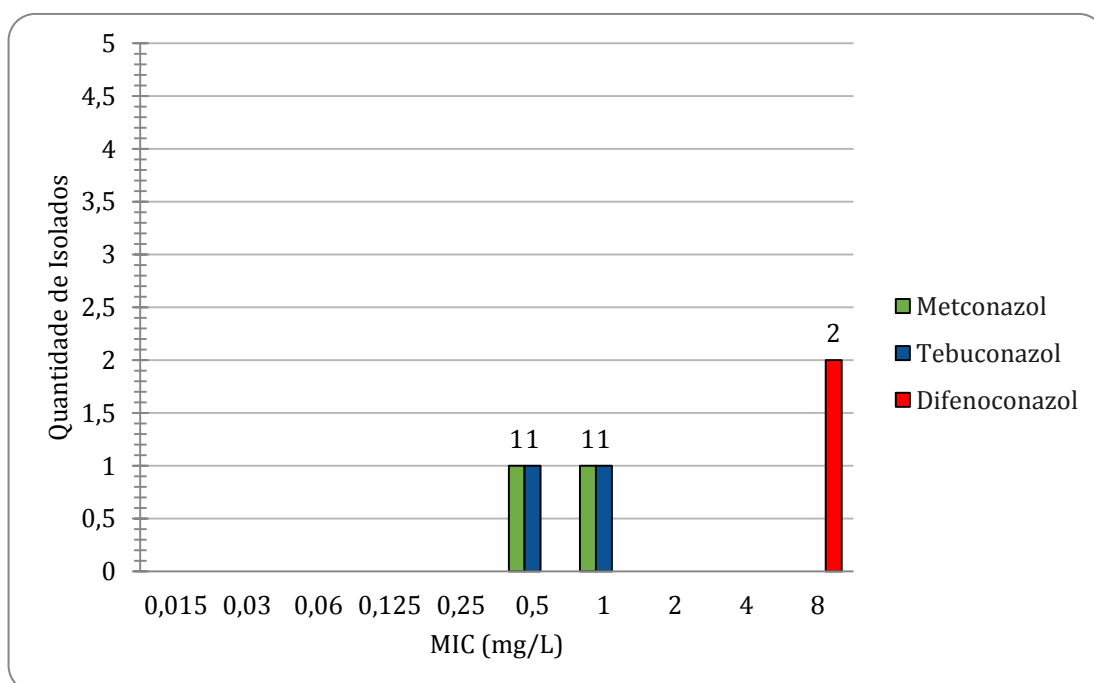
**Tabela 15.** Distribuição dos valores de MIC, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de fármacos e fungicidas para dois isolados da seção *Restricti*

ANT.	Número de isolados de acordo com a concentração de MIC (mg/L):											
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
ITZ	0,5	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
VCZ	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
PSZ	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
MTZ	0,5	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
TBZ	0,5	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
DFZ	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
AMB	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

ANT: antifúngico, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, PSZ: posaconazol, MTZ: metconazol, TBZ: tebuconazol, DFZ: difenoconazol, AMB: *amphotericin B* (Anfotericina B).



**Figura 30.** Sensibilidade de dois isolados da seção *Restricti* frente a três fármacos triazólicos e à anfotericina B



**Figura 31.** Sensibilidade de 2 isolados da seção *Restricti* frente a três fungicidas agrícolas

## 5. Discussão

Aspergilose é uma doença fúngica oportunista, transmitida via inalatória, que acomete indivíduos, imunologicamente, debilitados que apresentam sintomas e manifestações clínicas variadas. Novas condições de risco, para aspergilose invasiva em pacientes imunologicamente hígidos, foram recentemente associadas à presença do vírus da influenza e coronavírus SARS-CoV-2 (Crum-Cianflone *et al.* 2016; Arastehfar *et al.* 2020; Verweij *et al.* 2020; Liu *et al.* 2021)

Apesar de grande parte dos estudos enfatizarem infecções causadas por *Aspergillus fumigatus*, outras espécies crípticas que morfologicamente são indistinguíveis entre si, ganharam importância após sua identificação por técnicas de biologia molecular. O sequenciamento de mais de dois *locus*, referentes aos genes codificantes da *beta tubulina*, da *calmodulina* e gene *RPB2* permite separação de tais espécies (Tsang *et al.* 2020). Dentre elas, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus versicolor*, ainda que menos frequentes como agentes de infecções, possuem alta toxicidade representando risco à saúde humana pela capacidade de produção de aflatoxinas em meio ambiente. Além disso, seu perfil de sensibilidade a antifúngicos diverge das espécies de maior interesse médico, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus terreus*. Assim, caso venham a causar quadros infecciosos podem levar ao insucesso dos tratamentos convencionais. Merecem, desse modo, atenção acadêmica para investigação de seus nichos e de dispersão ambiental (Tsang *et al.* 2020, Samson *et al.* 2014).

Sendo *Aspergillus* um fungo anemófilo e ubíquo, é inexorável a inalação humana de seus esporos. A instalação e gravidade da doença depende, não somente do hospedeiro, mas do inóculo fúngico e presença de fenótipos resistentes a tratamentos antifúngicos. A resistência antifúngica pode ocorrer através de mutações gênicas, selecionadas pela exposição prolongada ao antifúngico na clínica durante tratamentos ou, ainda, devido à aquisição de cepas que, previamente, entraram em contato com compostos

azólicos pulverizados em meio agrícola (Chowdhary *et al.* 2014, Snelders *et al.* 2008, Camps *et al.* 2012, Howard *et al.* 2013). A extensa utilização de compostos azólicos na agricultura, para a melhora da qualidade dos vegetais, é capaz de induzir, em determinados fungos presentes no ambiente, mecanismos de resistência (Azevedo *et al.* 2015).

Estudos epidemiológicos para caracterização de espécies e fenótipos resistentes, em ambientes de regiões geográficas diversas são escassos, principalmente, no Brasil. Raras publicações indicando frequência alta de *Aspergillus* e descrevendo a diversidade de espécies no ar atmosférico de cidades brasileiras são encontradas na literatura disponível (Gambale *et al.*, 1983; Mobin e Salmito, 2006)

Nesse cenário, é falho o entendimento das fontes de transmissão e extensão da resistência relacionada às espécies presentes no ar atmosférico, assim como, seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos clínicos.

A existência de uma rota ambiental de resistência dependente de pressão seletiva sobre cepas de *Aspergillus*, acidentalmente, expostas a fungicidas agrícolas e disseminadas por correntes aéreas, motivou o desenvolvimento deste estudo para ampliação do conhecimento sobre o tema. A concentração de esporos anemófilos de *Aspergillus* pode ser estimada pela contagem de unidades formadoras de colônias que foram computadas (entre 1 a 5 a cada 20 L de ar ou 0,02m<sup>3</sup> de ar). Sabendo-se que, a cada respiração são inalados 500 mL de ar e supondo ritmo médio de 12 inspirações por minuto, estima-se que um indivíduo inala 17.000 L de ar por dia que podem conter de 850 a 4250 esporos. Mesmo que os cílios da traqueia e pulmões possam expelir grande quantidade de tais partículas, muitas podem atingir os alvéolos pulmonares e desencadear infecção. Assim, foi relevante conhecer as espécies e fenótipos de resistência contidos nesses inóculos fúngicos.

No estudo foram isolados 128 isolados de *Aspergillus* spp. e a seção mais encontrada, *Nigri*, representou metade do conjunto. Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos obtidos por Mobin & Salmito

(2006), que identificaram em 60% (20/33) de amostras de ar atmosférico, a espécie *Aspergillus niger* na cidade de Teresina, Pi.

A seção *Nigri* possui uma grande variedade de espécies e essa diferenciação apresenta extrema dificuldade, sendo necessário o sequenciamento do gene que codifica a calmodulina associado com aquele da  $\beta$ -tubulina (Varga *et al.* 2011). Essa dificuldade foi confirmada neste trabalho, no qual foi impossível determinar a espécie de 11 isolados que, mesmo após o sequenciamento desses dois genes, demonstravam a mesma porcentagem de identificação para mais de uma espécie, segundo banco de dados *Genbank*. Além disso, oito isolados desta seção não foram sequenciados devido à limitação da técnica de extração. Hubka e Kolarik (2012) demonstraram que os genes dos polipeptídeos  $\beta$ 1-tubulina e  $\beta$ 2-tubulina quando sequenciados apresentam interferências com um gene parálogo (tubC) da  $\beta$ 3-tubulina. Devido à falta de especificidade gênica para identificação da a seção *Nigri* é necessário a utilização de outros genes para a correta identificação, sendo utilizado aqueles que codificam *calmodulina* e gene a RNA polimerase.

Foram utilizados dois bancos de dados para a identificação de espécie, no entanto algumas espécies apresentaram divergência na identificação desses bancos de dados. Nesses casos, foi considerado a identificação do *BLAST* (*Genbank*) devido a porcentagem de identificação apresentar valores superiores.

Entre as espécies da seção *Nigri*, *Aspergillus niger* representou quase metade dos isolados, *Aspergillus welwitschiae* um quarto e *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus luchuensis* e *Aspergillus neoniger* o restante dos isolados da seção. Da mesma forma, Sabino *et al.* (2021) encontrou em amostras ambientais equivalência na proporção de de outras espécies da seção *Nigri* e *Aspergillus niger*. Na pesquisa de Tsang *et al.* (2020), foi demonstrado que espécies crípticas de *Nigri* foram isoladas de amostras clínicas com maior prevalência que *Aspergillus niger*.

A seção *Flavi* representou um terço dos isolados, representando espécies utilizadas nas áreas industriais, biotecnológicas, alimentícias e na



área da saúde humana (Varga *et al.* 2011). Neste trabalho, foram identificadas seis espécies desta seção, sendo a mais encontrada *Aspergillus flavus*, considerada o segundo principal agente causador de aspergilose (Frisvad *et al.* 2019). A segunda espécie mais encontrada foi *Aspergillus bombycis*, produtor de aflatoxinas, seguido de *Aspergillus tamarii* que tem a capacidade de causar infecções em humanos como observado no trabalho de Tsang *et al.* 2020. *Aspergillus sojae*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus arachidicola* também foram verificados no ar atmosférico. A identificação de espécies pode ser complexa, como verificado em cinco isolados que apresentaram identificações distintas, segundo os dois bancos de dados utilizados. Além disso, cinco isolados não foram sequenciados por problemas na extração.

Isolados da seção *Circumdati*, encontrados em torno de 10% no conjunto dos achados, possuem vesículas bisseriadas, com conídios de coloração amarela a ocre e produção de esclerócio de cor clara (Visagie *et al.* 2014). As espécies estão amplamente distribuídas no meio ambiente e podem ser encontradas em diversos locais, como areia, solo, ar, água e inclusive em ambientes hospitalares (Sabino *et al.* 2016). Foram identificados quatro isolados de *Aspergillus steynii* e dois de *Aspergillus ochraceus*, que de acordo com o trabalho de Visagie *et al.* (2014), produzem grandes quantidades de ocratoxina A, composto nefrotóxico aos humanos. Ainda, foi encontrado também, um isolado de *Aspergillus persii*, que segundo Visagie *et al.* (2014), produz quantidades menores ou inconstantes de ocratoxina A. Da seção *Circumdati*, cinco isolados não foram identificados, devido à dificuldade de extração de DNA que se acredita ser devido às características da seção, como produção de estipes de parede grossa, vesículas bisseriadas, conídios amarelos e pigmentados, assim como a produção de esclerócio em abundância (Visagie *et al.* 2014).

Apesar de *Aspergillus fumigatus* estar descrito como mais prevalente em ar de ambientes internos (Hoseinzadeh *et al.* 2013, Gniadek *et al.* 2017), neste trabalho foi encontrado apenas em seis ocasiões (três cidades), em

ambientes internos, computando cerca de 5% e 10% de frequência relativa dessa espécie.

As demais seções foram raramente verificadas, como: *Restricti*, *Clavati*, *Terrei* e *Nidulantes*.

Os dois isolados identificados pelo BLAST como *Aspergillus allahabadii* da seção *Terrei* apresentaram uma discrepância de identificação quando comparados aos resultados obtidos no Mycobank, *Aspergillus neoniveus*. No trabalho de Sklenár *et al.* (2021), percebe-se que quando realizados estudos filogenéticos com apenas três genes, a série *Neonivei* da seção *Flavipedes* é parafilética à seção *Terrei*. Por esse motivo, acredita-se que houve essa diferença de identificação entre as duas bases de dados, já que *Aspergillus allahabadii* é da seção *Terrei* e *Aspergillus neoniveus* pertence à seção *Flavipedes*. (Houbraken *et al.* 2020, Sklenár *et al.* 2021).

O único isolado da seção *Nidulantes* apresentou a mesma porcentagem de identificação para mais de uma espécie com o sequenciamento do gene da  $\beta$ -tubulina, sendo elas: *Aspergillus latus*, *Aspergillus quadrilineatus* e *Emericella nidulans*. Para a correta identificação, é necessário o sequenciamento de mais de um gene. No trabalho de Steenwyk *et al.* (2020) foi observado que o gênero *Aspergillus* pode apresentar hibridização, assim, a fusão entre duas espécies pode resultar na formação de uma nova espécie. Steenwyk *et al.* (2020) relata que a espécie *Aspergillus latus* é resultado da hibridização de *Aspergillus spinulosporus* e *Aspergillus quadrilineatus*. Chen *et al.* 2016, ao retratar as características das espécies pertencentes seção *Nidulantes*, confirma que *Aspergillus latus*, *Aspergillus quadrilineatus*, *Aspergillus spinulosporus* e *Emericella nidulans* são muito semelhantes, com exceção da produção de alguns metabólitos e micromorfologia dos ascósporos. Acredita-se que patógenos híbridos podem apresentar novas características, como por exemplo o aumento de resistência (Steenwyk *et al.* 2020). Para que o isolado obtido neste trabalho fosse identificado, corretamente, seria necessário o sequenciamento de outros genes auxiliares, como o da *calmodulina* e gene RPB2.

A busca da resistência ambiental nas espécies encontradas no ar atmosférico de 27 cidade de 5 estados do Brasil, foi feita pela pesquisa de alterações nos valores de MIC pela metodologia de microdiluição (EUCAST *antifungal MIC method for moulds* E. Def 9.3.2). Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos clínicos e fungicidas agrícolas foram realizados para todos os isolados e os resultados de MIC analisados quanto aos *breakpoints* disponíveis e aos ECOFFs, sendo classificados em sensíveis ou resistentes e selvagens ou não selvagens, respectivamente. Para as espécies que não apresentaram esses valores base para a comparação, foi extrapolado os parâmetros estabelecidos para a espécie de cada seção. Existem, no entanto, seções para as quais não há valores de *breakpoints* clínicos e ECOFF e, para estes casos, os dados de MIC foram analisados frente às publicações de interesse.

A seção *Nigri* apresenta espécies que são descritas com um perfil de susceptibilidade a antifúngicos reduzido para os antifúngicos azólicos clínicos e anfotericina B, com isso os pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) disponíveis pelo EUCAST, são apenas para a espécie *Aspergillus niger* e são mais elevados quando comparando com *Aspergillus fumigatus*. (Vermeulen *et al.* 2015; Badali *et al.* 2016; Guinea *et al.* 2020). Foram encontrados isolados de *Aspergillus niger* para os quais os valores de MIC se encontram dentro do ECOFF para os antifúngicos itraconazol e voriconazol. Para os posaconazol, dois isolados apresentaram MIC acima do ECOFF e para anfotericina B, outros dois isolados se enquadram na faixa acima, sendo classificados como não selvagens para esses antifúngicos. Espécies crípticas desta seção foram encontradas, sendo elas: *Aspergillus welwitschiae* e *Aspergillus tubingensis*. Essas espécies são descritas como apresentando baixa sensibilidade a antifúngicos azólicos descritos como não selvagens (Alcazar-Fuoli *et al.* 2009; Hashimoto *et al.* 2017). Isso foi observado apenas em um isolado identificado como *Aspergillus welwitschiae* que apresentou MIC de 8 mg/L para itraconazol e 2 mg/L para posaconazol, sendo os demais 10 isolados, classificados como selvagens, diferente do descrito no trabalho de Tsang *et al.* (2020), que relata a maioria dos isolados

de *A. welwitschiae* e *A. tubingensis* como não selvagem para os fármacos clínicos triazólicos (itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol). Esse fato também foi observado por Takeda *et al.* (2019) que encontrou isolados de *A. tubingensis* e *A. welwitschiae* não selvagens para itraconazol e voriconazol. Para a anfotericina B, Carrara *et al.* (2020) descreve que os 112 isolados de seu estudo eram suscetíveis, sendo que 21 apresentaram o valor de MIC de 2 mg/L que seria considerado a faixa intermediária. Esses valores foram parecidos aos obtidos neste estudo, cujo valor de MIC máximo para a anfotericina B foi de 2 mg/L em dois isolados. Os demais isolados da seção *Nigri* apresentaram valores dentro do ECOOF.

Os isolados de *Aspergillus flavus* foram classificados como sensíveis para itraconazol, selvagens para voriconazol, posaconazol e anfotericina B. Valores semelhantes de MICs foram observados por Gonçalves *et al.* (2013). Quanto aos fungicidas agrícolas, Jørgensen *et al.* (2021) obtiveram valores mais elevados de MIC para cepas selvagens do que os obtidos neste trabalho. Acredita-se que essa diferença possa ser regional ou amostral, já que Jørgensen *et al.* (2021) apenas testaram dois isolados de *Aspergillus flavus*. Os isolados de *Aspergillus parasiticus* (n=1), *Aspergillus sojae* (n=1) e *Aspergillus arachidicola* (n=1), apresentaram valores de MIC dentro do ECOFF e semelhantes aos obtidos por Gonçalves *et al.* (2013). Os seis isolados de *Aspergillus bombycis* foram considerados selvagens quando comparados ao ECOFF para *Aspergillus flavus*. Por fim, três isolados de *Aspergillus tamarii* foram classificados como selvagens e o outro, apresentou valores elevados para todos os antifúngicos triazólicos e anfotericina B, sendo classificado como não selvagem para posaconazol (2 mg/L) e apresentando o limite do ECOFF para os demais antifúngicos testados. Em concordância com este trabalho, Gonçalves *et al.* (2013) observam que os isolados dessa espécie são menos suscetíveis aos azóis e devido a capacidade de ocasionar infecções em seres humanos, devem ser monitorados.

Neste trabalho, o perfil de susceptibilidade dos isolados da seção *Circumdati* chamou atenção, pois a maioria dos isolados apresentaram

valores de MIC elevados para os fungicidas agrícolas tebuconazol (MIC 8 mg/L) e difenoconazol (MIC 8 mg/L). Além disso, para dois isolados, foi encontrado MIC de 4 mg/L para anfotericina B e o valor médio para posaconazol foi de 1 mg/L. Sabino *et al.* (2016) obtiveram valores elevados de MIC para anfotericina B e itraconazol para essa seção. Isso demonstra que somado ao fato de que essa seção está presente em diversos ambientes, incluindo hospitais, têm a capacidade de crescimento a 37°C e apresenta baixa susceptibilidade a antifúngicos triazólicos e anfotericina B, representando um perigoso potencial patógeno (Sabino *et al.* 2016).

Os isolados de *Aspergillus fumigatus* deste trabalho apresentaram sensíveis para todos os antifúngicos clínicos testados e baixos valores de MIC para os fungicidas agrícolas. Diferente do observado por Trovato *et al.* (2018) que isolaram de solo e folhas, de ambientes agrícolas expostos à fungicidas azólicos na Itália, cinco isolados de *Aspergillus fumigatus* resistentes, a itraconazol ou voriconazol, e que apresentaram mutação genética. Jørgensen *et al.* (2021), realizaram trabalho com cepas selvagens e não selvagens de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus terreus* determinando o MIC para diversos fungicidas agrícolas, entre eles: difenoconazol, tebuconazol e metconazol. Para os isolados selvagens de *Aspergillus fumigatus*, os valores de MIC obtidos pelos autores foram semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Na análise da susceptibilidade aos antifúngicos em isolados da seção *Terrei* e *Nidulantes*, nota-se que foram sensíveis a todos os antifúngicos testados. Lass-Flörl *et al.* (2021) descreveram as características do complexo *Terrei* e demonstram que *Aspergillus terreus* pode apresentar resistência intrínseca à anfotericina B. Neste trabalho, não foram observados valores de MIC elevados para os integrantes da seção *Terrei*. Quanto ao isolado da seção *Nidulantes*, apesar da hipótese que isolados híbridos possam apresentar valores de MIC elevados (Steenwyk *et al.* 2020), não foi observado valores acima do ECOFF disponível para *Aspergillus nidulans*, classificando esse isolado como selvagem. Os dois isolados de *Aspergillus clavatus*, apresentaram baixos valores de MIC para os antifúngicos clínicos e

valores elevados para difenoconazol (MIC= 8 mg/L) quando comparado às demais espécies da seção *Nidulantes*. Dados de MIC para os fungicidas agrícolas desta seção, não são encontrados na literatura, então acredita-se que seja uma característica desta espécie. Já a seção *Restricti* não apresenta ECOFF nem *breakpoints* clínicos, porém os resultados demonstraram que os dois isolados desta seção apresentam valores altos de MIC para itraconazol (2 mg/L), posaconazol (2 mg/L), voriconazol (2 mg/L), anfotericina B (2 mg/L) e difenoconazol (8 mg/L). No Trabalho de Tsang *et al.* (2020) identificou-se um isolado da seção *Restricti*, porém o isolado apresentou valores menores de MIC quando comparados aos deste trabalho. Devido aos poucos dados de sensibilidade antifúngica em *Restricti* não é possível concluir se os isolados apresentam esses valores de MIC como características próprias ou se adquiriram através de mutações.

Algumas limitações foram encontradas ao longo deste estudo: não foi possível obter a identificação de algumas espécies devido dificuldade da extração do DNA pelo kit comercial de extração, assim como a dificuldade de identificação devido à utilização de apenas dois genes para o sequenciamento. Ainda, para avaliar os mecanismos de resistência dos isolados é necessário o sequenciamento do gene *cyp51A* para identificar possíveis mutações, assim como avaliar outros mecanismos de resistência.

Este estudo agregou dados sobre espécies crípticas e fenótipos de resistência a compostos azólicos e à anfotericina B, em isolados de *Aspergillus* de origem ambiental encontrados em cidades de estados do Brasil, contribuindo para a compreensão da epidemiologia molecular de uma das mais importantes micoses invasivas, a aspergilose.

## 6. Conclusões

- A carga de unidades formadoras de colônias de *Aspergillus* em ar atmosférico foi diversa em distintas cidades brasileiras;
- Foram recuperados do ar atmosférico de 27 cidades localizadas em 5 estados do Brasil, diversas espécies crípticas de *Aspergillus* revelando a grande diversidade fenotípica dos agentes de aspergilose passíveis de inalação. Este achado enfatiza a importância da identificação acurada dos agentes etiológicos dos quadros de aspergilose. Isolados resistentes ou não selvagens ao voriconazol, itraconazol, posaconazol foram encontrados nas espécies: *Aspergillus welwitschiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamaritii* confirmando a existência da rota ambiental de resistência em nosso país e demonstrando a importância de monitorar tendências e investigar as causas dessa ocorrência;
- Não foi observada multirresistência à anfotericina B e antifúngicos clínicos triazólicos, no entanto, foram encontrados isolados com resistência cruzada, ao itraconazol e posaconazol, na espécie *Aspergillus welwitschiae* e para posaconazol e difenoconazol na espécie *Aspergillus tamaritii*, alertando para emergência de isolados com forte potencial para causar infecções refratárias aos antifúngicos comuns de uso clínico; e
- Não houve correlação entre aumento de MIC dos fármacos azólicos itraconazol, voriconazol e posaconazol e dos fungicidas de uso agrícola difenoconazol, metconazol, tebuconazol, no conjunto de isolados, motivando a estudos futuros analíticos para confirmar esse achado.
- Valores altos de MIC chamam atenção para possíveis mecanismos de resistência subjacentes nos isolados de ar atmosférico ou outra forma de resistência, assim são necessário estudos complementares para ampliação desse conhecimento e hipóteses denexo causal.

## 7. Referências Bibliográficas

ABAD, A.; FERNANDEZ-MOLINÁ, JV.; BIKAND, J.; RAMÍREZ, A.; MARGARETO, J.; SENDINO, J., *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2010; v. 27, n. 4: p 155–182.

ABARCA, ML.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, FJ. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of microbiology*. 2004; v. 86(1): p. 33–49.

AGARWAL R.; CHAKRABARTI A.; SHAH A.; GUPTA D.; MEIS JF.; GULERIA R. *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013; v. 43, n. 8: p. 850-873.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELHEM, MSC.; BONFIETTI, LX.; RODRIGUEZ-TUDELA, JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015; v.57, n. 19: p. 57-64.

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicroby. Agents Chemother*. 2009; v. 53, n. 10: p 4514-4517.

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* : its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Frontiers in microbiology*. 2013; v. 3: p. 1–6.

ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; van de VEERDONK, F. L.; JENKS, J. D.; KOEHLER, P.; KRAUSE, R. *et al.* COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)-From Immunology to Treatment. *Journal of fungi*. 2020; v. 6, n. 9: p. 1-17.

ARENDRUP, MC.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LASS-FLÖRL, C.; HOPE, WW. EUCAST Technical note on *Aspergillus* spp and amphotericin B, itraconazole and posaconazole. *Clinical Microbiology and infection*. 2012; v. 18, n.7: p. 248-250.

ARENDRUP, MC.; MELETIADIS, J.; MOUTON, JW.; LAGROU, K.; HAMAL, P.; GUINEA, J. *et al.* EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.2 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. 2020; ed.9.3.2: p.1-23.  
[https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Files/EUCAST\\_E\\_Def\\_9.3.2\\_Mould\\_testing\\_definitive\\_revised\\_2020.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9.3.2_Mould_testing_definitive_revised_2020.pdf)

AZEVEDO, MM.; FARIA-RAMOS, I.; CRUZ, LC.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, AG. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; v.63: p.7463-7468.

BADALI, H.; FAKHIM, H.; ZAREI F.; NABILI, M.; VAEZI, A.; POORZAD, N. *et al.* In Vitro Activities of Five Antifungal Drugs Against Opportunistic Agents of *Aspergillus Nigri* Complex. *Mycopathologia*. 2016; v. 181: p. 235-240. doi:10.1007/s11046-015-9968-0

BADDLEY, JW. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Medical Mycology*, 2011; v. 49 n. SUPPL. 1: p. 7–12.

BEER, KD.; FARNON, EC.; JAIN, S.; JAMERSON, C.; LINEBERG, S.; MILLER, J. *et al.* Multidrug-resistant *aspergillus fumigatus* carrying mutations linked to environmental



fungicide exposure — three states, 2010–2017. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2018; v. 67, n. 38: p. 1064-1067.

BHABHRA, R.; ASKEW, DS. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: Role of the fungal nucleolus. Medical Mycology. 2005; v. 43, n. SUPPL.1: p. 87–93.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELI, RO.; DENNING, DW. Global and multi-national prevalence of fungal disease-estimate precision. Journal of fungi. 2017; v. 57, n. 3: p. 1-29.

BRAUER, VS.; REZENDE, CP.; PESSONI, AM.; de PAULA, RG.; RANGAPPA, KS.; NAYAKA, SC. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. Biomolecules. 2019; v.9, n.521: p. 1-21.

CAMPS, SM.; van der LINDEN, JW.; LI, Y.; KUIJPER, EJ.; van DISSEL, JT.; VERWEIJ, PE. *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. v. 56, n 1: p. 10-16. doi:10.1128/AAC.05088-11

CARRARA, B.; RICHARDS, R.; IMBERT, S.; MORIO, F.; SASSO, M.; ZHR, N. *et al.* Species Distribution and Comparison between EUCAST and Gradient Concentration Strips Methods for Antifungal Susceptibility Testing of 112 *Aspergillus* Section *Nigri* Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2020. v. 64, n 7: p 2510-19. doi:10.1128/AAC.02510-19

CAVASSIN, FB.; BAÚ-CARNEIRO, JL.; VILAS-BOAS, RR.; QUEIROZ-TELLES, F. Sixty years of amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. Infectious Disease and Therapy. 2021; v.10: p.115-147.

CHEN, AJ.; FRISVAD, JC.; SUN, BD.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; DIJKSTERHUIS, J. *et al.* *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. Stud Mycol. 2016. v. 84. p. 1-118. doi:10.1016/j.simyco.2016.10.001

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; van den BOOM, M.; YNTEMA, JB.; HAGEN, F.; VERWEIJ, PE.; *et al.* Multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment in Tanzania. J Antimicrob Chemother. 2014. v.69, n.11, p.2979-2983. doi:10.1093/jac/dku259

CRUM-CIANFLONE, NF. Invasive Aspergillosis Associated With Severe Influenza Infections. Open Forum Infectious Diseases. 2016; v. 10, n. 3: 1-8.

FERA, MT.; de SARRO, A. New triazoles and a echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanism of resistance. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2009; v.7, n.8: p. 981-998.

DENNING DW.; CADRANEL J.; BEIGELMAN-AUBRY C.; ADER F.; CHAKRABARTI A.; BLOT S. *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. European Respiratory Journal. 2016; v. 47, n. 1: p. 45-68.

DERESINSKI, SC.; STEVENS, DA. Caspofungin. Clinical infectious disease. 2003; v.36: p. 1445-1457.

FRISVAD, JC.; HUBKA, V.; EZEKIEL, CN.; HONG, S.-B.; NOVÁKOVÁ, A.; SHEN, AJ., *et al.* Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Studies in Mycology. 2019; v. 93: p. 1–63.

GAMBALE, W.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo. Revista de Microbiologia, Brasil. 1983. v. 14, p. 204-214.

GALLIS, HA.; DREW, RH.; PICKARD, WW. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Reviews of Infectious Diseases*. 1990; v. 12, n. 2: p. 308-328.

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; v. 61: p. 1323–1330.

GNIADK, A.; KRZYŚCIAK, P.; TWARUŻEK, M.; MACURA, AB. Occurrence of fungi and cytotoxicity of the species: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* isolated from the air of hospital wards. *Int J Occup Med Environ Health*. 2017. v. 30, n. 2: p 231-239. doi:10.13075/ijomeh.1896.00841

GODEAU, C.; REBOUX, G.; SCHERER, E.; LABOISSIERE, A.; LECHENAULT-BERGEROT, S.; MILLON, L., *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the hospital: Surveillance from flower beds to corridors. *American Journal of Infection Control*. 2019; v. 48. n. 6: p. 1-3.

GONÇALVES, 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. v.57, n. 4, p.1944-1947. doi:10.1128/AAC.01902-12

GUINEA, J. Updated EUCAST Clinical Breakpoints against *Aspergillus*, Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *J Fungi (Basel)*. 2020. v. 6, n. 4: p 343. doi:10.3390/jof6040343

HASHIMOTO, A.; HAGIWARA, D.; WATANABE, A.; YAHIRO, M.; YIKELAMU, A.; YAGUCHI, T.; *et al.* Drug Sensitivity and Resistance Mechanism in *Aspergillus* Section *Nigri* Strains from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. v.61, n.8, p.2583-16. doi:10.1128/AAC.02583-16

HOSEINZADEH, E.; SAMARGHANDIE, MR.; GHASIAN, AS.; ALIKHANI, MY.; ROSHANAIE, G. Evaluation of bioaerosols in five educational hospitals wards air in Hamedan, during 2011-2012. *Jundishapur journal of microbiology*. 2013. v. 6. P: 1-8

HOLZ, RW. The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 1974; v. 235: p. 469-79.

HONG, SB.; GO, SJ.; SHIN, HD.; FRISVAD, JC.; SAMSON, RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*. 2005; v.97, n.6: p. 1316-1329.

HONG, SB.; CHO, HS.; SHIN, HD.; FRISVAD, JC.; SAMSON, RA. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; v.56. p.477-486. doi: 10.1099/ijs.0.63980-0.

de HOOG, GS.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 2° ed. Netherlands: Amer Society for Microbiology; 2000.

HOPE, WW.; CUENCA-ESTRELLA, M.; LASS-FLÖRL, C.; ARENDRUP, MC. EUCAST Technical note on Voriconazole and *Aspergillus* spp. *Clinical Microbiology and infection*. 2013; v.19, n.6: p. 278-280.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S; VISAGIE, CM.; YILMAZ, N.; WANG, XC.; MEIJER, M., *et al.* Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 2020; v. 95: p. 5–169.

HOUBRAKEN, J.; de VRIES, RP.; SAMSON, RA. Chapter 4-Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species in SARIASLANI, S.; GADD, GM. *Advances in applied microbiology*. [S.l.]: Academic press. 2014; v. 86: p. 199-249. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002629000044>

HUBKA, V.; KOLARIK, M.;  $\beta$ -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia*. 2012. v.29 p.1-10. doi:10.3767/003158512X658123

HOWARD, SJ.; HARRISON, E.; BOWYER, P.; VARGA, J.; DENNING, DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011. v.55, n.10, p.4802-4809. doi:10.1128/AAC.00304-11

ISHIDA, K. *Agentes Antifúngicos*. In: ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. (Org.). *MICROBIOLOGIA*. 6. ed. [S.l.]: ATHENEU, 2015; p. 609–618.

JEANVOINE, J.; ROCCHI, S.; BELLANGER, AP.; REBOUX, G.; MILLON, L. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment?. *Médecine et Maladies infectieuses*. 2020; v. 50, n. 5: p. 389-395.

JØRGENSEN, KM.; HELLEBERG, M.; HARE, RK.; JØRGENSEN, LN.; ARENDRUP MC. Dissection of the Activity of Agricultural Fungicides against Clinical *Aspergillus* Isolates with and without Environmentally and Medically Induced Azole Resistance. *J Fungi (Basel)*. 2021. v.7, n.3, p.1-12. doi:10.3390/jof7030205

KLICH, MA. Identification of common *Aspergillus* species. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. p.116.

KLICH, MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Medical mycology*. 2006; v. 44: p. 127–131.

KOCSUBÉ, S.; PERRONE, G.; MAGISTÀ, D.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; SZIGETI, G., *et al.* *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*. 2016; v. 85: p. 199–213.

KOSMIDIS, C.; DENNING, DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015; v. 70: p. 270–277.

LASS-FLÖRL, C.; DIETL, AM.; KONTOYIANNIS, DP.; BROCK, M. *Aspergillus terreus* Species Complex. *Clin Microbiol Rev*. 2021. v.34, n.4, p.1-27. doi:10.1128/CMR.00311-20

LATGÉ, JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; v. 12, n. 2: p. 310–350.

LATGÉ, JP.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020; v. 23, n. 1: p. 1–75.

LESTRADE, PPA.; BENTVELSEN, RG.; SCHAUWVLIEGHE, AFAD.; SCHALEKAMP, S.; van der VELDEN, WJFM.; KUIPER, EJ. *et al.* Voriconazole resistance and mortality in invasive aspergillosis: a multicenter retrospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 2018; v. 68, n. 9: p. 1463–1471.

LESTRADE, PPA.; MEIS, JF.; MELCHERS, WJG.; VERWEIJ, PE. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clinical Microbiology And Infection*. 2019; v. 25, n. 7: p. 799-806.

- LIU, JW.; KU, YH.; CHAO, CM.; OU, HF.; HO, CH.; CHAN, KS.; *et al.* Epidemiological Correlation of Pulmonary *Aspergillus* Infections with Ambient Pollutions and Influenza A (H1N1) in Southern Taiwan. *J Fungi (Basel)*. 2021. v.7, n.3, p. . doi:10.3390/jof7030227
- LOCKHART, SR.; BEER, K.; TODA, M. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*: What You Need To Know. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2020; v. 42, n.1: p. 1-6.
- MEZZARI, A.; PERIN, C.; JÚNIOR, SAS.; BERND, LAG. Airborne fungi in the city of porto alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2002; v. 44, n. 5: p. 269-272
- MEZZARI, A.; PERIN, C.; JÚNIOR, SAS.; BERND, LAG.; GESU, GD. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre,RS. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2003; v. 49, n. 3: p. 270-273.
- MOBIN, M.; do amparo SALMITO M. Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI [Fungus microbiota in air conditioners in intensive care units in Teresina, Piauí]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006. v.39, n.6, p.556-559. doi:10.1590/s0037-86822006000600009
- MOLONEY, NM.; OWENS, RA.; DOYLE, D. Proteomic analysis of *Aspergillus fumigatus* – clinical implications. *Expert Review of Proteomics*. 2016; v. 13, n. 7: p.635-649.
- de MORAES, AML.; PAES, RA.; HOLANDA, VL. Capítulo 4-Micologia IN: MOLINARO, EM.; CAPUTO, LFG.; AMENDOEIRA, MRR. *Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC [s.n.], 2009; v. 4.
- MOUSAVI, B. HEDAYATI, MT.; HEDAYATI, N.; ILKIT, M.; SYEDMOUSAVI, S. *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Current Medical Mycology*. 2016; v. 2, n. 1: p. 36-42.
- PATTERSON, TF.; THOMPSON III, GR.; DENNING, DW.; FISHMAN, JA.; HADLEY, S.; HERBRECHT, R., *et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; v. 63, n. 4: p. 1–60.
- PAULUSSEN, C.; HALLSWORTH, JE.; ALVARÉZ-PÉREZ, S.; NIERMAN, WC.; HAMILL, PG.; BLAIN, D., *et al.* Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*. 2017; v. 10: p. 296-322.
- QUIAO, J.; LIU, W.; LI, R. Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. *Japan Journal of Medical Mycology*. 2008; v. 49: p. 157-163.
- RICHARDSON, M. & WARNOCK, D.W. *Fungal Infection-Diagnosis and Management*. 4 ed. [S.l.]: WILEY-BLACKWELL. 2003. p. 61-73. doi.org/10.1002/9780470755259.ch13.
- SABINO, R.; CAROLINO, E.; VERÍSSIMO, C.; MARTINEZ, M.; CLEMONS, KV.; STEVENS DA. Antifungal susceptibility of 175 *Aspergillus* isolates from various clinical and environmental sources. *Med Mycol*. 2016. v.54, n.7, p.740-756. doi:10.1093/mmy/myw024
- SABINO, R.; GONÇALVES, P.; MARTINS MELO, A.; SIMÕES, D.; OLIVEIRA, M.; FRANSCISCO, M. *et al.* Trends on *Aspergillus* Epidemiology-Perspectives from a National Reference Laboratory Surveillance Program. *J Fungi (Basel)*. 2021. v.7, n.1. doi:10.3390/jof7010028
- SALES, MPU. Capítulo 5 - Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2009; v. 35, n. 12: 1238-1244.

- SAMSON, RA.; VARGA, J.; FRISVAD, JC. Taxonomic studies on the genus *Aspergillus*. Netherlands. *Studies in Mycology*. 2011; v. 69.
- SAMSON, RA.; VISAGIE, CM.; HOUBRAKEN, J.; HONG, SB.; HUBKA, V.; KLAASSEN, CHW., *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 2014; v. 78: p. 141-173.
- SCHOUSTRA, SE.; DEBETS, AJM.; RIJS, AJMM; ZHANG, J.; SNELDERS, E.; LEENDERTSE, PC. Environmental Hotspots for Azole Resistance Selection of *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 2019; v. 25. n. 7: p. 1347-1353.
- SKLENÁŘ, F.; JURJEVIĆ, Ž.; HOUBRAKEN, J.; KOLAŘÍK, M.; ARENDRUP, MC.; JØRGENSEN, KM.; *et al.* Re-examination of species limits in *Aspergillus* section *Flavipedes* using advanced species delimitation methods and description of four new species. *Stud Mycol*. 2021. v.99, n.100. doi:10.1016/j.simyco.2021.100120
- 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(11):e219. doi:10.1371/journal.pmed.0050219
- STEENWYK, JL.; SHEN, XX.; LIND, AL.; GOLDMAN, GH.; ROKAS, A. A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *American Society for Microbiology*. 2019; v. 10, n. 4: p. 1-25.
- STEENWYK, JL.; LIND, AL.; RIES, LNA.; dos REIS, TF.; SILVA, LP.; ALMEIDA, F.; *et al.* Pathogenic Allodiploid Hybrids of *Aspergillus* Fungi. *Curr Biol*. 2020. v.30, n.13, p.2495-2507. doi:10.1016/j.cub.2020.04.071
- TAKAZONO, T.; IZUMIKAWA, K. Recent advances in diagnosing chronic pulmonary aspergillosis. *Frontiers in Microbiology*. 2018; v. 9: p. 1–7.
- TÁVORA, LGF.; GAMBALE, W.; HEINS-VACCARI, EM.; ARRIAGADA, GLH.; LACAZ, CS.; SANTOS, CR. *et al.* Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003; v. 36: p. 613-616.
- TEKAIA, F.; LATGÉ, JP. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion Microbiology*. 2005; v. 8: p. 385–392.
- TEUTSCHBEIN, J.; ALBRECHT, D.; PÖTSCH, M.; GUTHKE, R.; AIMANIANDA, V.; CLAVAUD, C. *et al.* Proteome Profiling and Functional Classification of Intracellular Proteins from Conidia of the Human-Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Journal of proteome research*. 2010; v. 9, n. 7: p 3427-3442
- TROVATO, L.; SCALIA, G.; DOMINA, M.; OLIVERI, S. Environmental Isolates of Multi-Azole-Resistant *Aspergillus* spp. in Southern Italy. *Journal of Fungi*. 2018 v.6, n.4.
- TSANG, C.; TANG, JYM.; YE, H.; XING, F.; LO, SKF.; XIAO, C.; *et al.* Rare/cryptic *Aspergillus* species infections and importance of antifungal susceptibility testing. *Mycoses*. 2020. v.3, n.63, p.1283–98.
- VARGA, J.; FRISVAD, JC.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; *et al.* New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. 2011. v.69, p.1–17.

VERMEULEN, E.; MAERTENS, J.; de BEL, A.; NULENS, E.; BOELEN, J.; SURMONT, I.; *et al.* Nationwide Surveillance of Azole Resistance in Aspergillus Diseases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015. v.59, n.84569–76.

VERWEIJ, PE.; GANGNEUX, JP.; BASSETI, M.; BRÜGGEMANN, RJM.; CORNELLY, OA.; KOEHLER, P. *et al.* Diagnosing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis. *The Lancet Microbe*. 2020; v. 1, n. 2: p. 53-55.

VERWEIJ, PE.; SNELDERS, E.; KEMA, GHJ.; MELLADO, E.; MELCHERS, WJG. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use?. *The Lancet Infectious Diseases*. 2009; v. 9, n. 12: p.789-795.

VISAGIE, CM.; VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; MEIJER, M.; KOCSUBÉ, S.; YILMAZ, N.; *et al.* Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*. 2014. v.78, p.1–61.

WALSH, TJ.; ANAISSIE, EJ.; DENNING, DW.; HERBRECHT, R.; KONTOYIANNIS, DP.; MARR, K.A *et al.* Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; v. 46: p. 327-360.

XAVIER, MO.; MADRID, IM.; CLEFF, MB.; CABANA, AL.; SILVA FILHO, RP.; MEIRELES, MCA. Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. *Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science*. 2007; v. 45, n.3: p. 174-179.

# APÊNDICE

## Apêndice 1

Resultados de sequenciamento e sensibilidade a antifúngicos de 128 isolados de *Aspergillus* spp. provenientes de ar atmosférico de 5 municípios do estado de São Paulo, jan-mar/2020

Identificação dos isolados, segundo método e base de dados utilizados						Concentração Inibitória Mínima (mg/L) de 4 fármacos e 3 fungicidas agrícolas								Local	
N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-beta-tubulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-beta-tubulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
1	541	<i>Aspergillus clavatus</i>	S: 99.80% O: 93.91%	<i>Aspergillus clavatus</i>	QC:99% PI:100%	Clavati	0,12	0,5	1	1	0,5	0,25	8	Guarulhos	SP
2	350	<i>Aspergillus oryzae</i>	S:86.36% O:94.57%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:99% PI:92.74%	Flavi	0,06	0,25	0,5	1	0,5	1	2	São Paulo	SP
3	526	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 99.62%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:99% PI:100%	Flavi	0,015	0,25	0,5	2	1	1	1	São José dos Campos	SP
4		NI		NI		Circumdati	2	0,5	1	4	2	1	2	São Paulo	SP
6	410	<i>Aspergillus parasiticus</i>	S:90.49% O:85.61%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:93.29%	Flavi	0,5	0,12	0,25	2	0,5	0,5	1	Santo André	SP
7		NI		NI		Flavi	0,5	0,25	0,25	2	0,12	0,25	0,5	São Paulo	SP
8	520	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 99.62%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:99% PI:100%	Flavi	0,5	0,25	0,5	1	1	0,5	1	São Paulo	SP
9	474	<i>Aspergillus fumigatus</i>	S:96.80% O:90.72%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	QC:97% PI:97.01%	Fumigati	0,5	0,12	0,25	0,5	0,5	0,12	0,5	São Paulo	SP

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado



**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-beta-tubulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-beta-tubulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
10	526	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 89.77% O: 91.01%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:93.25%	Flavi	0,015	0,5	0,5	0,5	1	2	1	São Paulo	SP
11	455	<i>Aspergillus flavus</i>	S:90.39% O:84.84%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:96% PI:93.53%	Flavi	0,25	0,06	0,25	1	0,25	1	0,12	São Paulo	SP
12	482	<i>Aspergillus fumigatus</i>	S: 93.95% O: 99.38%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	QC:99% PI:93.95%	Fumigati	0,25	0,12	0,25	1	0,25	0,06	0,5	São Bernardo do Campo	SP
13	467	<i>Aspergillus fumigatus</i>	S: 89.77% O: 91.01%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	QC:97% PI:91.16%	Fumigati	0,25	0,12	0,5	1	0,25	0,06	0,25	Valinhos	SP
14	528	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:100%	Flavi	0,5	0,12	0,5	0,25	0,5	0,25	2	Valinhos	SP
15	415	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 93.33% O: 100%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:93.25%	Flavi	0,5	0,25	0,25	1	0,5	0,06	1	São Paulo	SP
16	470	<i>Aspergillus neoniveus</i>	S: 90.56% O: 97.87%	<i>Aspergillus allahabadii</i>	QC:100% PI:97.07%	Terrei	0,06	0,25	0,25	0,5	0,12	0,12	0,5	São Paulo	SP
17	461	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 89.21% O: 96.10%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:89.71%	Flavi	0,25	0,25	0,5	1	0,5	1	4	Valinhos	SP
18	446	<i>Aspergillus fumigatus</i>	S: 87.44% O: 94.40%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	QC:99% PI:87.25%	Fumigati	0,03	0,12	0,12	1	0,25	0,06	0,12	São Bernardo do Campo	SP

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-beta-tubulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-beta-tubulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
20	389	<i>Aspergillus flavus</i>	S:92.82% O:84.38%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:92.82%	Flavi	0,5	0,25	0,5	1	1	1	2	São Paulo	SP
21	487	<i>Aspergillus fumigatus</i>	S: 100% O: 100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	QC:100% PI:100%	Fumigati	0,5	0,25	0,5	0,5	1	2	1	São Paulo	SP
22	408	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 100%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:98% PI:99,79%	Flavi	0,25	0,25	0,12	1	0,5	0,5	1	Suzano	SP
26	441	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 99,54% O: 97,73%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:99,30%	Flavi	0,5	0,5	0,12	1	2	0,5	2	Mogi das Cruzes	SP
27	526	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 99,62%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:99% PI:100%	Flavi	0,5	0,25	0,12	1	1	0,5	1	Mogi das Cruzes	SP
36	475	<i>Aspergillus flavus</i>	S:99,57% O:97,90%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:98% PI:99,79%	Flavi	0,25	0,25	0,5	0,5	1	1	2	Guarulhos	SP
38	511	<i>Aspergillus steynii</i>	S: 99,27% O: 95,41%	<i>Aspergillus steynii</i>	QC:98% PI:99,79%	Circumdati	0,5	0,25	1	1	1	0,5	1	São Paulo	SP
39	531	<i>Aspergillus flavus</i>	S:92.82% O:84.38%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:99,56%	Flavi	0,06	0,12	0,25	1	0,5	1	1	Louveira	SP
40		NI		NI		Circumdati	0,12	0,25	0,12	1	2	0,25	2	Louveira	SP
41	566	<i>Aspergillus persii</i>	S: 98,77% O: 99,82%	<i>Aspergillus persii</i>	QC:100% PI:98,77%	Circumdati	0,25	0,5	1	0,5	>8	2	>8	São Paulo	SP

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-beta-tubulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-beta-tubulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
46	566	<i>Aspergillus steynii</i>	S: 99.27% O: 95.41%	<i>Aspergillus steynii</i>	QC:100% PI:100%	Circumdati	0,12	0,12	1	0,25	2	0,5	1	Louveira	SP
47	529	<i>Aspergillus steynii</i>	S: 99.42% O: 99.04%	<i>Aspergillus steynii</i>	QC:100% PI:100%	Circumdati	0,12	0,12	0,5	0,5	2	0,25	1	Louveira	SP
49	526	<i>Aspergillus tamarii</i>	S: 100% O: 99.05%	<i>Aspergillus tamarii</i>	QC:100% PI:100%	Flavi	0,12	0,25	0,25	0,25	1	1	2	São Paulo	SP
50		NI		NI		Circumdati	0,12	0,25	0,12	0,5	4	1	2	Guarulhos	SP
51	525	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:100%	Flavi	0,5	0,25	0,25	0,5	1	1	2	Guarulhos	SP
52	524	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:100%	Flavi	0,5	0,5	0,25	0,5	2	1	4	Guarulhos	SP
53		NI		NI		Circumdati	0,12	0,25	0,12	1	4	0,5	2	Guarulhos	SP
54	525	<i>Aspergillus arachidicola</i>	S: 99.43% O: 99.81%	<i>Aspergillus parasiticus</i>	QC:99% PI:99.62%	Flavi	0,5	0,25	0,25	0,5	2	0,5	2	São Paulo	SP
55	530	<i>Aspergillus tamarii</i>	S: 100% O: 98.31%	<i>Aspergillus tamarii</i>	QC:99% PI:100%	Flavi	0,25	0,25	0,25	0,12	1	0,5	1	Campinas	SP
56	523	<i>Aspergillus flavus</i>	S: 100% O: 99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>	QC:100% PI:100%	Flavi	0,25	0,5	0,25	0,25	2	2	4	Rio das Ostras	RJ

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-beta-tubulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-beta-tubulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
57C	538	<i>Aspergillus clavatus</i>	S: 99.80% O: 94.26%	<i>Aspergillus clavatus</i>	QC:99% PI:100%	Clavati	0,5	0,5	1	0,06	1	0,25	>8	São Paulo	SP
58	528	<i>Aspergillus parasiticus</i>	S: 99.43% O: 99.81%	<i>Aspergillus arachidicola</i>	QC:99% PI:99.43%	Flavi	0,5	0,06	0,25	0,25	0,5	0,5	1	São Paulo	SP
59	523	<i>Aspergillus neoniveus</i>	S: 95.79% O: 99.81%	<i>Aspergillus allahabadii</i>	QC:99% PI:98.85%	Terrei	0,5	0,5	0,25	0,12	0,5	0,125	0,5	Guarulhos	SP
60	532	<i>Aspergillus arachidicola</i>	S: 99.44% O: 99.81%	<i>Aspergillus sojae</i>	QC:100% PI:99.06%	Flavi	0,06	0,5	0,25	0,25	2	1	2	São Paulo	SP
61	541	<i>Aspergillus fumigatus</i>	S: 100% O: 99.63%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	QC:100% PI:100%	Fumigati	0,03	0,12	0,03	0,12	0,25	0,06	0,25	São Paulo	SP
88	534	<i>Aspergillus bombycis</i>	S: 99.2% O:100%	<i>Aspergillus bombycis</i>	QC:99% PI:98.85%	Flavi	0,5	0,12	0,5	0,25	4	2	4	São Paulo	SP
89	458	<i>Aspergillus bombycis</i>	S:99,13% O:100%	<i>Aspergillus bombycis</i>	QC:100% PI:99,56%	Flavi	0,06	0,25	0,5	0,5	2	1	2	São Paulo	SP
90	534	<i>Aspergillus bombycis</i>	S: 99.43% O: 99.81%	<i>Aspergillus bombycis</i>	QC:100% PI:99.56%	Flavi	0,5	0,25	0,5	0,5	2	2	2	São Paulo	SP
91	539	<i>Aspergillus bombycis</i>	S: 99.10% O: 99.85%	<i>Aspergillus bombycis</i>	QC:100% PI:99.06%	Flavi	0,12	0,25	0,5	1	2	1	1	Porto Alegre	RS

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-beta-tubulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-beta-tubulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
93	542	<i>Aspergillus bombycis</i>	S: 100% O: 99.62%	<i>Aspergillus bombycis</i>	QC:99% PI:99.72%	Flavi	0,5	0,25	0,5	0,5	2	2	2	Porto Alegre	RS
99		NI		NI		Restricti	0,5	2	2	2	0,5	0,5	8	Itú	SP
100		NI		NI		Restricti	2	2	2	1	1	1	8	Porto Alegre	RS
104	342	<i>Aspergillus sydowii</i>	S:100% O:98.83%	<i>Aspergillus sydowii</i>	QC:100% PI:100%	Flavi	1	2	2	4	0,25	0,25	8	São Paulo	SP
114	365	<i>Aspergillus latus</i> / <i>Aspergillus quadrilineatus</i> / <i>Emericella nidulans</i>	S:100% O:94.25%	<i>Emericella nidulans</i> / <i>Aspergillus latus</i>	QC:99% PI:99.72%	Nidulantes	1	0,06	0,06	0,5	0,25	0,25	0,25	Suzano	SP
116		NI		NI		Flavi	0,5	0,12	0,5	1	1	1	2	Baurú	SP
117		NI		NI		Flavi	1	0,5	0,06	1	2	1	2	Guarulhos	SP
118		NI		NI		Flavi	0,5	0,25	0,03	0,5	1	0,5	1	Guarulhos	SP
119		NI		NI		Flavi	0,5	0,25	0,03	1	1	0,5	1	São José dos Campos	SP

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-beta-tubulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-beta-tubulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
123	400	<i>Aspergillus ochraceus</i>	S:96,77% O:99,39%	<i>Aspergillus ochraceus</i>	QC:99% PI:97.58%	Circumdati	1	0,25	1	4	>8	1	4	São Paulo	SP
126	359	<i>Aspergillus tamaraii</i>	S:96.77% O:99.39%	<i>Aspergillus tamaraii</i>	QC:99% PI:99.72%	Flavi	0,5	0,25	0,03	1	1	0,25	1	São Paulo	SP
129	489	<i>Aspergillus ochraceus</i>	S:96.77% O:99.39%	<i>Aspergillus ochraceus</i>	QC:99% PI:97.58%	Circumdati	1	0,5	1	0,5	>8	4	8	São Bernardo do Campo	SP

Q.L.: *Query length* (tamanho da sequência), QC: *Query cover* (cobertura) equivalente ao S: *Similarity* (similaridade), PI: *percentage identification* (porcentagem de identificação) equivalente ao O: *Overlap* (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-calmodulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-calmodulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
23	584	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99,48% O: 98,80%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Qc:98% ID:99,83%	Nigri	0,25	0,25	0,12	1	0,25	0,12	0,25	São Paulo	SP
24		NI		NI		Nigri	0,5	0,25	0,12	1	0,25	0,12	0,25	São Paulo	SP
25		NI		NI		Nigri	1	1	0,25	1	0,5	0,25	2	São Paulo	SP
28	527	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99,65% O:97,15%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Qc:99% Id: 100%	Nigri	0,5	0,25	0,12	0,5	0,5	0,12	0,5	Belo Horizonte	MG
29		NI		NI		Nigri	0,12	0,06	0,12	0,25	0,12	0,03	0,12	Suzano	SP
30		NI		NI		Nigri	0,5	0,12	0,25	0,5	0,25	0,06	0,25	Guarulhos	SP
31	514	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,41% O:98,05%	<i>Aspergillus niger</i>	Qc:99% Id: 99,22%	Nigri	1	0,5	0,5	0,5	1	0,25	2	Guarulhos	SP
32	498	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,80% O:97,79%	<i>Aspergillus niger</i>	Qc:99% Id: 99,60%	Nigri	1	0,5	0,5	0,5	1	0,25	2	Guarulhos	SP
33	523	NI	NI	NI	NI	Nigri	1	0,25	0,5	0,25	0,5	0,125	1	Guarulhos	SP
34	498	<i>Aspergillus niger</i>	S: 100% O: 95.15%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:100% PI:100%	Nigri	1	0,5	0,5	0,125	1	0,25	1	Guarulhos	SP
35	590	<i>Aspergillus tubingensis</i>	S: 99,30% O:95,67%	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Qc: 98% ID: 99,83%	Nigri	1	0,5	0,5	2	1	0,25	2	Rio de Janeiro	RJ

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-calmodulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-calmodulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
44	590	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,31% O: 95,70%	<i>Aspergillus niger</i>	Qc: 99% ID: 99,83%	Nigri	0,03	0,25	0,5	0,25	1	0,12	0,25	Barueri	SP
45	586	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,48% O: 98,46%	<i>Aspergillus niger</i>	Qc:100% ID: 99,83%	Nigri	0,03	0,12	0,5	0,25	1	0,12	0,25	Barueri	SP
48	585	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,48% O: 98,46%	<i>Aspergillus niger</i>	Qc:100% ID: 100%	Nigri	0,12	0,5	0,5	0,25	1	0,12	0,5	Louveira	SP
62	585	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99,47% O: 97,09%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Qc:98% ID:99,83%	Nigri	1	0,12	0,5	0,5	0,5	0,25	1	Sebastião do Paraíso	MG
63	575	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 100% O: 95,83%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Qc:98% ID:99,65%	Nigri	1	0,12	0,5	0,5	0,5	0,25	1	Salvador	BA
64	556	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 100% O: 96,94%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Qc: 99% ID: 100%	Nigri	1	0,12	0,5	1	0,5	0,5	1	Sebastião do Paraíso	MG
65	573	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,48% O: 100%	<i>Aspergillus niger</i>	Qc: 100% ID: 99,83%	Nigri	1	0,25	0,5	0,5	1	0,25	1	Sebastião do Paraíso	MG
66	584	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99,48% O: 98,80%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Qc:98% ID:99,83%	Nigri	1	0,12	0,5	0,5	1	0,25	1	Salvador	BA

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado



**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-calmodulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-calmodulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
69	584	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99.13% O: 98,63%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:98% PI:99,48%	Nigri	0,06	0,25	1	2	0,5	0,25	2	São Paulo	SP
70	583	<i>Aspergillus tubingensis</i>	S: 99.48% O: 97,94%	<i>Aspergillus tubingensis</i>	QC: 100% Id: 97,60%	Nigri	0,5	0,5	0,25	1	0,25	0,06	0,25	São Paulo	SP
71	534	<i>Aspergillus luchuensis</i>	S: 99% O: 99.81%	<i>Aspergillus luchuensis</i>	QC:100% PI:100%	Nigri	0,5	0,25	0,25	1	0,25	0,12	0,25	Jacareí	SP
72	585	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99.48% O: 98.97%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:100% PI:100%	Nigri	0,5	0,25	0,5	0,06	0,5	0,06	2	Suzano	SP
73	585	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99.48% O: 98.97%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:100% PI:100%	Nigri	1	0,5	0,5	1	0,25	0,25	0,5	Valinhos	SP
74		NI		NI		Nigri	1	0,25	0,5	1	0,25	0,06	0,5	Valinhos	SP
75	500	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99,12% O: 98,63%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	QC:100% PI:99,14%	Nigri	0,25	0,25	0,5	0,12	0,5	0,12	1	Valinhos	SP
76		NI		NI		Nigri	0,03	0,25	0,12	0,25	0,5	0,12	1	Valinhos	SP
77		NI		NI		Nigri	0,03	0,06	0,12	0,25	0,12	0,12	0,25	Suzano	SP
78		NI		NI		Nigri	0,03	0,12	0,5	0,5	0,25	0,06	0,5	Suzano	SP
79	486	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,48% O: 98,46%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:100% PI:99,83%	Nigri	0,12	0,12	0,5	1	0,12	0,12	0,5	Guarulhos	SP

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-calmodulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-calmodulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
82		NI		NI		Nigri	0,12	0,06	0,03	1	1	0,5	0,12	Suzano	SP
83	589	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 98.88% O: 90.83%	<i>Aspergillus awamori</i>	QC:99% PI:98.64%	Nigri	0,06	0,06	0,03	0,5	1	0,5	0,25	Santo André	SP
84	589	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99.82% O: 92.50%	<i>Aspergillus awamori</i>	QC:100% PI:99.49%	Nigri	0,25	0,12	0,12	1	0,5	1	0,06	Guarulhos	SP
85	580	<i>Aspergillus tubingensis</i>	S: 98.40% O: 96.90%	<i>Aspergillus tubingensis</i>	QC:99% PI:99.65%	Nigri	0,06	0,12	0,25	1	0,25	0,5	0,25	Barueri	SP
86	572	<i>Aspergillus tubingensis</i>	S: 98,42% O: 88,64%	<i>Aspergillus tubingensis</i>	QC:99% PI:99,82%	Nigri	0,25	0,12	0,12	0,5	0,5	0,5	0,03	Rio de Janeiro	RJ
87	530	<i>Aspergillus tubingensis</i>	S: 100% O: 85,09%	<i>Aspergillus luchuensis</i>	QC:100% PI:99,81%	Nigri	0,5	0,12	0,12	2	1	0,25	0,5	São Paulo	SP
94	585	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99,48% O: 98,12%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	QC:100% PI:99,66%	Nigri	0,03	0,25	0,06	1	0,25	0,06	0,25	Arujá	SP
95	537	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99.81% O: 98.88%	<i>Aspergillus awamori</i>	QC:100% PI:99.81%	Nigri	0,25	0,5	0,5	2	0,5	0,25	0,25	Arujá	SP
96	360	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 100% O: 100%	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	QC:100% PI:100%	Nigri	0,5	0,25	0,5	0,5	1	0,12	1	Sorocaba	SP
97	448	<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	S: 98,38% O: 96,21%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:99% PI:98,65%	Nigri	0,06	0,12	0,5	0,25	0,5	0,06	0,25	Sorocaba	SP

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-calmodulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-calmodulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
102		NI		NI		Nigri	0,12	0,25	0,5	2	0,12	0,12	0,25	São Paulo	SP
103	482	<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	S: 99.56% O: 92.78%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:99% PI:99.38%	Nigri	0,5	0,25	0,5	1	1	0,12	1	São Paulo	SP
105	588	<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	S: 99.62% O: 88.44%	<i>Aspergillus niger</i>	QC:100% PI:99.83%	Nigri	0,5	0,25	0,5	1	1	0,25	1	São Paulo	SP
106		NI		NI		Nigri	0,12	0,12	0,5	1	1	0,12	0,25	Itú	SP
107	319	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 100% O: 93.75%	<i>Aspergillus awamori</i>	QC:99% PI:99.61%	Nigri	0,03	0,12	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12	São Paulo	SP
108	590	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99.48% O: 96.78%	<i>Aspergillus awamori</i>	QC:99% PI:99.66%	Nigri	0,12	0,12	0,5	0,5	0,5	0,12	0,5	São Paulo	SP
109	512	<i>Aspergillus tubingensis</i>	S: 86,93% O: 88,09%	<i>Aspergillus neoniger</i>	QC:97% PI:91%	Nigri	0,12	0,12	0,5	0,5	0,5	0,12	0,25	Suzano	SP
110	535	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 98,65% O: 96,82%	<i>Aspergillus awamori</i>	QC:99% PI:99,25%	Nigri	0,5	0,25	0,06	1	0,25	0,12	0,25	São Paulo	SP
111	535	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	S: 99.43% O: 97.94%	<i>Aspergillus awamori</i>	QC:99% PI:99.81%	Nigri	0,25	0,5	0,06	1	0,12	0,12	0,12	São Paulo	SP
112		NI		NI		Nigri	1	0,5	0,06	1	0,25	0,25	0,12	São Paulo	SP
113		NI		NI		Nigri	0,5	0,25	0,06	0,5	0,25	0,12	0,12	São Paulo	SP

Q.L.: Query length (tamanho da sequência), QC: Query cover (cobertura) equivalente ao S: Similarity (similaridade), PI: percentage identification (porcentagem de identificação) equivalente ao O: Overlap (sobreposição), NI: Não identificado

**Apêndice 1.** Resultados de sequenciamento e teste de sensibilidade a antifúngicos (continuação)

N	Q.L.	SEQUENCIAMENTO-MYCOBANK-calmodulina		SEQUENCIAMENTO-BLAST-calmodulina		SEÇÃO	ITZ	VRZ	PSZ	AMB	TBZ	MTZ	DFZ	CIDADE	ESTADO
124		NI		NI		Nigri	0,0015	0,5	0,12	0,5	1	0,25	1	Poços de Caldas	MG
125		NI		NI		Nigri	0,5	0,25	0,12	1	0,12	0,12	0,25	São Paulo	SP
127	514	<i>Aspergillus niger</i>	S: 99,41% O:98,05%	<i>Aspergillus niger</i>	Qc:99% Id: 99,22%	Nigri	0,12	0,25	0,06	2	0,12	0,06	0,25	Guarulhos	SP
128		NI		NI		Nigri	0,06	0,25	0,12	0,5	0,25	0,12	0,25	Rio de Janeiro	RJ

Q.L.: *Query length* (tamanho da sequência), QC: *Query cover* (cobertura) equivalente ao S: *Similarity* (similaridade), PI: *percentage identification* (porcentagem de identificação) equivalente ao O: *Overlap* (sobreposição), NI: Não identificado



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL



São Paulo, 28 de janeiro de 2021

Projeto: CTC 24-M/2020

“Investigação de espécies e perfil de suscetibilidade de cepas de *Aspergillus* spp. de ar atmosférico.”

Coordenação: Márcia de Souza Carvalho Melhem

Prezado Coordenador,

Comunicamos que o projeto foi aprovado quanto ao Mérito Científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL com Ciência da Direção Geral e cadastro CTC-IAL 24-M/2020.

Por tratar-se de projeto que *não envolve, direta ou indiretamente, a pesquisa com seres humanos, e que não envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (não humano) segundo a Lei nº 11794/2008, não exige a avaliação quanto aos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Instituto Adolfo Lutz (CEUA/IAL).*

Atenciosamente,

ADRIANA BUGNO  
Presidente do CTC/IAL

1ª Via: Coordenador  
2ª Via: Diretor de Núcleo  
3ª Via: Diretor de Centro  
4ª Via: CTC