



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

EDUARDO MARQUES DE ARAUJO

**PERFIL PROTEICO DE RESISTÊNCIA DE *Aspergillus fumigatus* A ITRACONAZOL E
VORICONAZOL**

RECIFE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

PERFIL PROTEICO DE RESISTÊNCIA DE *Aspergillus fumigatus* A
ITRACONAZOLE E VORICONAZOLE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Prof. Dr. Norma Buarque de Gusmão

RECIFE

2018

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Araujo, Eduardo Marques de
Perfil proteico de resistência de *Aspergillus fumigatus* a Itraconazol e Voriconazol /
Eduardo Marques de Araujo. – 2018.

50 f. : il.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientadora: Cristina Maria de Souza Motta.

Coorientador: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos,
2018.

Inclui referências.

1. Micologia médica. 2. Agentes anti-infecciosos I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora). II. Motta, Cristina Maria de Souza (coorientadora). III. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de (coorientador). III. Título.

616.96901

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 133

EDUARDO MARQUES DE ARAUJO
PERFIL PROTEICODE RESISTÊNCIA DE *Aspergillus fumigatus* A ITRACONAZOL E
VORICONAZOL

Data da defesa: 20/02/2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Prof. Dr. Norma Buarque de Gusmão

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Departamento de Medicina Tropical
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Maria Rabelo de Carvalho
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos
Universidade Federal de Pernambuco

Mãe, a despedida dolorosa, a saudade é tamanha, mas o meu carinho e amor por você terá sempre a capacidade de alcançar as grandes conquistas, dedico essa força e dedicação a você!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar às dificuldades.

Agradeço a minha Mãe Marlene Marques de Santana, heroína que me apoiou, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim foi muito importante.

As profas. Dras. Norma Buarque de Gusmão e Teresinha Gonçalves da Silva, pela orientação, apoio, amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto pela oportunidade, confiança e apoio na elaboração deste trabalho.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida para a execução do Curso.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

A resistência de *Aspergillus fumigatus* a drogas azólicas ocorre, principalmente, através de duas vias: *in vivo* como consequência da terapia antifúngica, e em isolados do ambiente, associado ao uso de fungicidas na agricultura. A utilização da espectrometria de massas através da técnica de MALDI-TOFMS reduz o tempo de diagnóstico em comparação com métodos de rotina ao determinar o fingerprint proteico do isolado clínico. Assim, objetivou-se conhecer a concentração mínima inibitória de itraconazol e voriconazole as alterações no perfil proteico em 21 isolados linhagens de *Aspergillus fumigatus* e relacioná-los a resistência fúngica. Foram obtidos 20 isolados de *A. fumigatus* estocados na Coleção de Culturas URM e um isolado da Universidade de Nantes, França. Todos foram submetidos a testes de sensibilidade antifúngica através do método de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente a itraconazol e voriconazol. A detecção de resistência foi determinada pela mudança mínima do plano espectral proteico obtida no MALDI-TOFMS, após o cruzamento de cada concentração do espectro com uma das duas concentrações extremas, máxima ou nula, onde se formou uma matriz a partir do Índice de Correlação do Composto, que foi utilizado para gerar mapas de calor. Entre os *Aspergillus fumigatus* testados, dois apresentaram resistência a voriconazol. A CIM e a mudança mínima no perfil proteico obtido através do CLSI e MALDI-TOF apresentaram concordância de 85,7% e 90,47% para voriconazol e itraconazol, respectivamente. Com a técnica do MALDI-TOF MS foi possível determinar o *breakpoint* de *Aspergillus fumigatus* após 3 horas de exposição ao antifúngico e permitiu prever a melhor escolha terapêutica para pacientes com algum quadro infeccioso por esse fungo filamentosos.

Palavras-chave: Fungo Filamentosos. Resistência antifúngica. Azólico. Proteína. MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

The resistance of *Aspergillus fumigatus* to azolic drugs occurs mainly through two routes: in vivo as a consequence of antifungal therapy and, isolated from soil / water, associated with the use of fungicides in agriculture. The use of mass spectrometry using the MALDI-TOF / MS technique reduces the time of diagnosis compared to routine methods. Thus, it was aimed to know the minimum inhibitory concentration of itraconazole and voriconazole and the changes in the protein profile in 21 isolates of *Aspergillus fumigatus* and to relate them to fungal resistance. All *A. fumigatus* were submitted to antifungal sensitivity tests using the microdilution method (MIC) with concentrations of 0.0313 to 8 µg.mL⁻¹ antifungal. Resistance detection was determined by the minimum change in the protein spectral plane obtained in MALDI-TOF / MS, after crossing each concentration of the spectrum with one of the two extreme concentrations, maximum or zero, where a matrix was formed from the Index of Correlation of the Compound used to generate heat maps. Among the *Aspergillus fumigatus* tested, two had resistance to voriconazole. The MIC and the minimal change in the protein profile obtained through MIC and MALDI-TOF presented concordance of 83.3% and 88.8% for voriconazole and itraconazole, respectively. the MALDI-TOF MS technique, it was possible to determine the Minimum Inhibitory Concentration of *Aspergillus fumigatus* after 3 hours of exposure to the antifungal and allowed to predict the best therapeutic choice for patients with invasive aspergillosis.

Keywords: Filamentous fungi. Antifungal resistance. Azole. Antifungal activity. MALDI-TOF.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Via biossintética do ergosterol a partir do escaleno (Maffei, 2006)..... | 21 |
| Figura 2. Espectros de Massas do <i>Aspergillus fumigatus</i> frente ao voriconazol * <i>Aspergillus fumigatus</i> AF/FR frente ao voriconazol1 – 0,0 µg/mL com exposição de 3 horas a 37 °C. Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0..... | 32 |
| Figura 3: Matriz ICC de <i>Aspergillus fumigatus</i> AF/FR frente à voriconazol * *Representação do Índice de Correlação do Composto (ICC) onde a matriz é derivada da seleção dos espectros de massas para <i>Aspergillus fumigatus</i> exposto por 3 horas horas a 37°C (CIM 1µg/mL) voriconazol (incluindo o valor nulo) de 8 - 0,0125 µg/mL. A correlação dos espectros e auto-correlações foram traduzidos em um mapa de calor onde os espectros relacionados são mostrados em cores quentes e os espectros não relacionados em cores frias. Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0..... | 33 |
| Figura 4: Espectros de Massas do <i>Aspergillus fumigatus</i> AF/FR frente ao itraconazol..... | 35 |
| Figura 5: Matriz ICC de <i>Aspergillus fumigatus</i> AF/FR frente à o Itraconazol * *Representação do Índice de Correlação do Composto (ICC) onde a matriz é derivada da seleção dos espectros de massas para <i>Aspergillus fumigatus</i> exposto por 3 horas horas a 37°C (CIM 1µg/mL) Itraconazol (incluindo o valor nulo) de 8 - 0,0125 µg/mL. A correlação dos espectros e auto-correlações foram traduzidos em um mapa de calor onde os espectros relacionados são mostrados em cores quentes e os espectros não relacionados em cores frias. Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| Capítulo 1 | Pág. |
|---|------|
| Tabela 1. Relação de <i>Aspergillusfumigatus</i> pertencentes à micoteca URM (UFPE) com o substrato de isolamento, local e data | 25 |
| Tabela 2: Teste de susceptibilidade antifúngica in vitro das 20 cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> disponibilizadas pela micoteca URM E 1 cepa disponibilizada pela Universidade de NANTES (França)..... | 29 |
| Tabela 3: Comparação entre o TSA* pelo CLSI** e o TSA pelo MALDI-TOF MS..... | 30 |
| Tabela 4: O número de isolados e sua respectiva porcentagem, sensíveis de acordo com as duas metodologias (CLSI e MALDI-TOF) frente a ITRACONAZOL E VORICONAZOL..... | 31 |
| Tabelas 5: Valores de correlação e auto-correlações para voriconazol..... | 34 |
| Tabelas 6: Valores de correlação e auto-correlações para Itraconazol..... | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| AI | Aspergilose invasiva |
| ABPA | Aspergilose broncopulmonar alérgica |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| LBA | Lavado bronco aveolar |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| IGS | Intergenic spacer (Espaçador intergênico) |
| PCR | Polimerase Chain Reaction |
| TMO | Transplante de medula óssea |
| MPCC | <i>Minimal Profile Change Concentration</i> |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight |
| MS | Mass Spectrometry |
| CCI | Índice de correlação de composto |
| CLSI | Clinical and laboratory standards institute |
| EUCAST | European society of clinical microbiology and infectious diseases |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônias |
| HCCA | α -ciano 4-hidroxi-cinâmico |
| TSA | Teste de sensibilidade antifúngica |

SUMÁRIO

| | Pág. |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 PROBLEMATIZAÇÃO | 14 |
| 1.2 OBJETIVOS | 14 |
| 1.2.1 Objetivo geral | 14 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 15 |
| 2.1 <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> | 15 |
| 2.2 ASPERGILOSE | 16 |
| 2.2.1 Diagnóstico e sintomas | 16 |
| 2.3 ANTIFÚNGICOS | 19 |
| 2.3.1 Voriconazol | 19 |
| 2.3.2 Itraconazol | 21 |
| 2.4 RESISTÊNCIA FÚNGICA | 22 |
| 2.5 MALDI-TOF MS | 23 |
| 2.6 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS | 24 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.1 CULTURA DE FUNGOS | 25 |
| 3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIFÚNGICOS | 26 |
| 3.3 ANÁLISE PROTEÔMICA | 27 |
| 3.4 DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS (TSA-MS) | 27 |
| 4 RESULTADOS | 29 |
| 4.1 ANÁLISES DOS RESULTADOS | 29 |
| 4.1.1 Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos | 29 |
| 4.1.2 Análise proteômica | 30 |
| 4.1.3 Detecção de resistência pelo MALDI-TOF MS | 30 |
| 5 DISCUSSÃO | 37 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 39 |
| REFERÊNCIAS | 41 |
| ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CIENTÍFICA “MEDICAL MYCOLOGY” | 45 |

1 INTRODUÇÃO

Aspergillus fumigatus é o patógeno fúngico mais prevalente nos países desenvolvidos, provavelmente, pela facilidade de disseminação dos seus conídios, causando a aspergilose invasiva (AI) em pacientes imunocomprometidos ou com outros fatores de risco. Em média 79,1% dessas pessoas desenvolvem esta doença que é de rápida progressão, que em 85% dos casos são fatais (WHITE, 2018). Estes germinam e produzem um micélio vegetativo filado e septo decorrente da produção de proteínas fúngicas que promovem sua invasão em vias respiratórias e seu crescimento no parênquima pulmonar no hospedeiro. Graus variados de imunossupressão no organismo predis põem à instalação desta infecção, a partir da adesão do fungo, disseminação e nutrientes necessários para o seu crescimento, além de fatores predisponentes intrínsecos para a progressão da doença que podem conferir resistência aos mecanismos antifúngicos do hospedeiro, sendo assim um patógeno emergente circunstancial (LATGÉ et al., 2001; MORIO et al, 2012).

A aspergilose tem como tratamento instituído a utilização de fármacos da classe dos triazóis (Sales, 2009), que inibem de forma não competitiva e reversível, enzimas que participam das etapas finais da biossíntese do ergosterol. A principal enzima inibida é a lanosterol 14-desmetilase, uma enzima microssômica do citocromo P-450 (gene CYP51), codificada pelo gene ERG11 e complexada a uma flavoproteína (CLAUDIA, 2006). Contudo este tratamento vem tomando-se incerto ou duvidoso ou inadequado, com a caracterização de mais espécies resistentes aos azólicos, que está estreitamente ligada ao modo de ação da droga (Gene CYP51) (RUSSCHER, 2014). Este tipo de mutação de resistência foi detectado em quatro países na Europa, Ásia, África, e mais recentemente na América, sugerindo uma migração geográfica do mecanismo de resistência (WIEDERHOLD, 2016). Nesse sentido, a disseminação de estirpes do patógeno resistentes aos medicamentos ao longo dos últimos anos, tornou-se um importante problema de saúde pública, havendo a necessidade de diagnósticos com mais rapidez.

Atualmente, o método *in vitro* mais utilizado para categorizar a sensibilidade ou resistência de *Aspergillus fumigatus* frente a antimicóticos é teste de susceptibilidade preconizado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) que juntamente com ferramentas genéticas, são utilizados nas rotinas laboratoriais para a confirmação de resistência aos antifúngicos. Contudo, estes testes levam 48hs ou mais para serem concluídos, sendo prejudicial à recuperação de pacientes em quadros clínicos como a aspergilose invasiva que demonstra ser uma infecção de rápida progressão clínica.

O teste de susceptibilidade a drogas frente a microorganismos patogênicos é uma ferramenta indispensável e desafiadora na luta contra doenças infecciosas. A utilização de MALDI-TOF MS (desorção a laser assistida por matriz ionizante- espectrometria de massa por tempo de voo) na

microbiologia, tem auxiliado a identificação de espécies de fungos em menores períodos de tempo, e recentemente tem sido utilizado por pesquisadores para determinar o perfil proteico de resistência (CASSAGNE, 2016). Ainda há poucos estudos relacionados aos fungos filamentosos, que evidenciam relação do perfil proteico e a resistência aos antifúngicos utilizados na terapêutica. Contudo o espectro das proteínas por MALDI – TOF MS pode ser prontamente estabelecido para descrever o perfil proteico de resistência do *Aspergillus fumigatus*, diminuindo o tempo de início da terapia e melhorando a precisão do diagnóstico. Adicionalmente, o benefício poderá ser estendido a ensaios clínicos e para monitorar o surgimento de resistência aos medicamentos.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

A relação da Concentração mínima inibitória a criação de perfil proteico característico da interação do *Aspergillus fumigatus* resistente, quando exposto a droga, ainda não desenvolvida necessita de novos estudos para uma melhor escolha terapêutica objetivando melhor tratamento para a infecção.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Conhecer a concentração mínima inibitória de *Aspergillus fumigatus* mantidos na Micoteca URM e relacionar ao perfil proteico de resistência ao itraconazol.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração mínima inibitória de itraconazol frente a *Aspergillus fumigatus* mantidos na Micoteca URM;
- Identificar resistência do *Aspergillus fumigatus* a itraconazol;
- Classificar perfil de resistência do *Aspergillus fumigatus* mantidos na micoteca URM (UFPE);
- Descrever perfil proteico de *Aspergillus fumigatus* mantidos na Micoteca URM.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Acredita-se que exista mais de 250 espécies de *Aspergillus* que podem ser encontrados em diversos ecossistemas. O nome *Aspergillus* foi colocado por um padre Italiano, Pe. Pier Micheli, devido à semelhança do conidióforo do fungo com o instrumento de madeira ou metal, o asperge (latim *aspergillum*), utilizado durante o culto religioso para aspergir Água Benta nos fiéis.

A identificação de *Aspergillus fumigatus* é baseada, predominantemente, na morfologia dos conidióforos e conídios. *A. fumigatus* apresenta conídios, equinulatos, verdes, com 2,5 a 3 µm de diâmetro e produzidos em cadeias nas fiáldes esverdeadas, com 6 a 8 por 2 a 3 µm de tamanho. Alguns isolados de *A. fumigatus* não apresentam pigmentos e possuem conídios brancos. *A. fumigatus* tem crescimento rápido, o tamanho da colônia atinge 4±1 cm em uma semana, quando cultivadas em ágar Czapek-Dox a 25°C. O *Aspergillus fumigatus* faz parte da seção *fumigati*, juntamente com as espécies *A. brevipes*, *A. duricaulis*, *A. unilateralis*, e *A. viridinutan* e a forma teleomorfa é a *Neosartorya fumigata* (KLICH, 2002; RAPER, 1965; SAMSON et al, 2014; LATGE, 2017)

Os perfis de metabólitos secundários, incluindo micotoxinas e antibióticos, produzidos por *A. fumigatus* e suas variantes morfológicas são: fumagilina, fumitoxina, fumigaclavina, fumigina, fumitremorgina, gliotoxina, monotripacidina, triptoquivalina, ácido helvólico e metabólitos de duas famílias cromóforas (FUA e FUB) não caracterizadas quimicamente (FRISVAD, 1990; MATSUDA., 2005).

A atiovenzima (glutamato desidrogenase) é comum a todas as estirpes de *A. fumigatus*. Algumas enzimas como a lactato desidrogenase, superóxido dismutase, isocitrato desidrogenase, aspartato aminotransferase, glucose-6-fosfato desidrogenase e fosfogluconato desidrogenase foram relatadas como monomórficas, embora os dados variem, e outras enzimas exibem estruturapolimórfica como a malato desidrogenase, glucose fosfato isomerase, fosfoglucomutase, hexoquinase, esterase, malato desidrogenase, peptidases, frutose-quinase, nucleósido fosforilase de purina e fosfatases. No entanto, uma vez que os padrões de electroforese de enzimas multilocus de espécies estreitamente relacionadas não foram investigados, a sua utilidade como uma ferramenta taxonomica geral é desconhecida (LATGÉ., 2017).

2.2 ASPERGILOSE

Esses fungos são patógenos oportunistas, podendo provocar colonização em cavidade pré-existent, infecção propriamente dita, processos alérgicos e intoxicação (SIDRIM, 2004; LACAZ, 2002). A espécie mais prevalente nos países desenvolvidos é o *Aspergillus fumigatus*, que provavelmente, pela facilidade de disseminação dos seus conídios, causam a aspergilose invasiva (AI) em pacientes imunocomprometidos (WHITE., 2018).

Doenças causadas por *Aspergillus fumigatus* são múltiplas e afetam indivíduos que sofrem de disfunções imunes. Os determinantes desse encontro é um hospedeiro susceptível com propágulos infecciosos deste saprobio filamentosos, que resulta em infecção. Várias características celulares de *A. fumigatus* que evoluíram em seu ambiente natural contribuem para sua virulência, bem como a interação com o hospedeiro mamífero. Entre os constituintes conidiais, componentes da parede celular, proteínas segregadas, bem como extrolitos, formam a estreita interação de *A. fumigatus* com o meio, hospedeiro e também contribuem para a evasão da vigilância imunológica. *A. fumigatus* deve ser capaz de aderir e penetrar nos epitélios respiratórios humanos e matar as células circunlantes, em particular as células fagocíticas que estão ativamente envolvidas na defesa contra *A. fumigatus* (KRAPPMANN., 2016; LATGÉ., 1999).

A colônia do *A. fumigatus* é composta por células multinucleadas com septação, as hifas são incorporadas em uma matriz extracelular (ECM) que podem formar um biofilme. Os biofilmes são formados na condição de crescimento estático ou *in vivo* durante a formação de um aspergiloma. A composição e estrutura da parede celular diferem substancialmente entre as hifas que crescem individualmente ou dentro de um biofilme (LATGE, 2017).

2.2.1 Diagnóstico e sintomas

Os conídios do *A. Fumigatus* possuem adesinas que se ligam especificamente a várias proteínas circulantes no hospedeiro ou à membrana basal: fibrinogênio, laminina, complemento, fibronectina, albumina, colágeno e proteínas tensoativas (LATGÉ., 1999; LATGE., 2017). A ligação ocorre por meio de interações físico-químicas não especificadas e/ou reconhecimento recíproco de receptor-ligante. A camada de parede celular mais externa dos conídios do *A. fumigatus* é caracterizada pela presença de fascículos de *rodlets* entrelaçados. Esta camada, que é composta de proteínas hidrofóbicas (hidrofobinas), que confere propriedades hidrofóbicas ao conídio do *A. fumigatus* (THAU, 1994). As hidrofobinas são uma família de proteínas homólogas que estão presentes na superfície de conídios secos de diferentes espécies fúngicas (WESSELS, 1993). Todas as hidrofobinas têm oito resíduos de cisteína conservados, padrões hidropáticos semelhantes e massa molecular de baixa gama de 10 a 20 kDa e são extremamente resistentes à degradação química. As moléculas de carboidratos e proteínas na superfície dos conídios estão envolvidas na

ligação às proteínas dos hospedeiros de uma forma específica (MANDAN, 1997). As lectinas específicas de ácido fucose e siálico também foram identificadas na parede celular dos conídios. O receptor para a laminina é uma glicoproteína de 72 kDa, também, presente na superfície do conídio (LATGÉ, 2001). A ligação de fibrinogênio, laminina, fibronectina ao complemento está associada com as camadas de parede externa e interna dos conídios com uma localização diferente para cada proteína, sugerindo que, diferentes proteínas de *Aspergillus fumigatus* se ligam a proteínas únicas dos hospedeiros. O *A. fumigatus* resiste à temperatura corporal de 37° C, o que contribui para o fator de virulência (LATGÉ., 2017)

Quadro 1. Mecanismo de virulência de *Aspergillus fumigatus* .

| Categoria | Molécula | Função <i>em vivo</i> |
|-------------------------|-----------------------|--|
| Moléculas tóxicas | Ribonuclease | Morte da célula hospedeira |
| | Hemólise | Lise dos glóbulos vermelhos |
| Metabólitos secundários | Gliotoxinas | Imunossupressão |
| Enzimas | Protease sérica | Promover a matriz pulmonar |
| | Proteína aspártica | Colonização ou/e degradação de fator humoral |
| | Metaloprotease | |
| | Dipeptidopeptidases | |
| | Catalases | Antioxidantes durante a fagocitose |
| | Superóxido dismutases | |
| | Fosfolipases | Dano epitelial |

Fonte: Latgéet (2001).

A primeira técnica utilizada para a detecção de *A. fumigatus* circulante na corrente sanguínea foi o de aglutinação indireta com partículas de látex para detecção da galactomanana, sendo substituído pelo método de ELISA (Platelia™ *Aspergillus* EIA). este ensaio foi aprovado pelo FDA para utilização no diagnóstico da aspergilose invasiva quando realizado com amostras de soro (PFEIFFER, 2006).

A galactomanana é um polissacarídeo que faz parte da camada externa da parede celular de *Aspergillus fumigatus*, sendo liberada durante seu crescimento. A técnica baseia-se no método Elisa sanduíche que utiliza anticorpos monoclonais (EB-A2) de ratos que foram imunizados ao entrar em contato com cepas de *A. fumigatus*. Tais anticorpos reconhecem o epítipo de galactofuranose da galactomanana, ligando-se a este (TÂNASE, 2012) A detecção da galactomanana é predominantemente realizada em amostras de soro, porém a presença deste antígeno também pode

ser detectada por meio da análise de tecidos e de outros fluídos biológicos, incluindo o lavado broncoalveolar, líquido e urina (LATGE., 2017)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um tipo diferencial de diagnóstico, do qual é possível detectar o DNA do agente causador da doença por meio da replicação *in vitro* de uma sequência alvo característica do micro-organismo pesquisado (NIERMAM., 2005; LATGÉ., 1999). Os alvos moleculares mais comumente utilizados baseiam-se nos complexos de DNA ribossômico e mitocondrial, pelo fato de apresentarem múltiplas cópias ao longo do genoma: 35 e 12, respectivamente. Neste presente método vários tipos de diagnósticos podem ser utilizados, porém os que mais demonstram resultado de acordo com Buchheidt *et al* (2001) são amostras derivadas de LBA (lavado brônquio alveolar) e amostras sanguíneas.

A aspergilose bronco pulmonar alérgica (ABPA), o aspergiloma e a AI, são síndromes envolvendo o crescimento micelial de *A. fumigatus* no corpo e, especificadamente, cada tipo de infecção tem uma sua singularidade (KOSMIDIS., 2015).

A principal porta de entrada deste micro-organismo e o local de infecção é o trato respiratório. Embora, outros locais, como pele, peritônio, rins, ossos, olhos e trato gastrointestinal, entretanto, as infecções não respiratórias são raras, mesmo tendo sido descritas no hospedeiro normal ou no imunocomprometido (MORENO, 2016; DENNING, 1998). As doenças pulmonares causadas por *A. fumigatus* podem ser classificadas de acordo com o local da doença, dentro do trato respiratório e ao longo da colonização ou invasão medular, ambas influenciadas pelo estado imunológico do hospedeiro (LATGÉ., 2017). Segundo Salles *et al.* são critérios de diagnósticos a obstrução brônquica episódica, a eosinofilia periférica, a presença de anticorpos específicos contra antígenos de *Aspergillus* spp., a reação cutânea imediata a antígeno de *Aspergillus* spp., a elevação sérica de IgE, a presença de infiltrados pulmonares que resolvem com corticoides e bronquiectasias centrais. Os critérios de diagnósticos secundários são: detecção de isolados de *Aspergillus*, expectoração de moldes brônquicos, elevação de IgE específica contra *Aspergillus* spp. Para o diagnóstico deste tipo de infecção a confirmação com cultura é importante para diferenciar de infecção causada por outros fungos filamentosos. O valor preditivo positivo de uma cultura de material respiratório não estéril aumenta com o aumento da imunossupressão (WALSH., 2008). Na histologia, encontrar uma hifa hialina septada, ramificada em ângulo agudo (hifas dicotômicas) não é específico para *Aspergillus* spp., outros métodos, como PCR, podem ser necessários para a identificação do fungo. (BARNES., 2006).

Já a infecção caracterizada por aspergiloma invasivo (AI), comumente referida como bola fúngica, ocorre em cavidades pulmonares, pré-existentes, causadas possivelmente por tuberculose, sarcoidose ou outros distúrbios pulmonares e nos seios paranasais cronicamente obstruídos (SOUBANI, 2002). Historicamente, no início dos anos 50, essa síndrome era a forma clássica de

aspergilose, ocorre, ainda hoje, em pacientes com doenças pulmonares. O aspergiloma consiste numa massa esferoide de hifas embutida numa matriz de proteína com estruturas esporuladas na periferia, todas as quais são encontradas externas ao revestimento da cavidade, isto é, na via aérea. A hemoptise resulta da ruptura dos vasos sanguíneos na parede da cavidade ocupada pelo fungo ou no suprimento da artéria pulmonar, a centímetros do aspergiloma (DIXON., 1992; LATGÉ., 2017).

Aaspergilose invasiva(AI) tornou-se uma das principais causas de morte, principalmente, entre os pacientes onco-hematológicos. A incidência média de AI é estimada em 5 a 25% em pacientes com leucemia aguda, 5 a 10% após TMO alogênico e 0,5 a 5% após tratamento citotóxico de doenças do sangue ou transplante de órgãos sólidos e TMO autólogos. AI acomete 19 a 26% dos pacientes com transplante cardíaco-pulmonar, e 1 a 10%, em ordem decrescente, os receptores de fígado, coração, pulmão e rim (LATGÉ, 1999). Embora a AI seja reconhecida como a principal infecção fúngica em pacientes com câncer, sua incidência é provavelmente subestimada devido à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos (KAISER, 1998). Aaspergilose invasiva, também, ocorre em pacientes com condições não hematógenas subjacentes; É cada vez mais relatada em pacientes com AIDS (1 a 12%) e também é uma complicação infecciosa comum de doença granulomatosa crônica - CGD (25 a 40%). Em contraste, raramente é encontrada em pacientes imunocompetentes (KARIN, 1997).

De acordo com Soubani et al (2002; 2015) ABPA é uma complicação pulmonar alérgica mais grave causada por espécies de *Aspergillus*. Ocorre em pacientes que sofrem de asma atópica ou fibrose cística. A ABPA ocorre, aproximadamente, 1 a 2% dos pacientes asmáticos (15% dos pacientes asmáticos sensibilizados a *A. fumigatus*) e 7 a 35% dos pacientes com fibrose cística. Os sintomas são semelhantes ao da asma clássica, com uma única resposta imune celular e os resultados patofisiológicos causados pela resposta de produtos das células T. Seus efeitos variam de asma a destruição total dos pulmões com características clínicas, sorológicas, radiológicas e patológicas definidas.

Senti falta de aspergilose pulmonar crônica e aspergilose cutânea

2.3 ANTIFÚNGICOS

As drogas recomendadas para a terapêutica primária da aspergilose invasiva são voriconazol e itraconazol (WALSH, 2008; PATTERSON, 2016; ANVISA, 2014).

2.3.1 Voriconazol

O mecanismo de ação do voriconazol (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) é semelhante ao de todos os agentes triazólicos, é a inibição da desmetilação independente de 14 α -lanosterol do citocromo P450 (CYP 450), que é um passo vital na síntese de ergosterol de

membrana celular dos fungos. Para leveduras, o voriconazol apresenta-se com ação fungistática, assim como outros azoles. No entanto, para *Aspergillus fumigatus*, voriconazol e outros azoles de segunda geração possuem ação fungicida. Este efeito pode referir-se à maior ação dos novos azoles a 14 α -desmetilase de lanosterol, em comparação com a encontrada em leveduras, o que pode permitir uma interrupção mais completa da síntese de ergosterol e levar à morte celular (SARAVOLATZ, 2003)

O voriconazol parece ser amplamente ativo contra muitas espécies de *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus fumigatus*. É mais eficaz do que o itraconazol. Os fungos dematiáceos e hialinos, *in vitro*, são sensíveis ao voriconazol e resistentes à anfotericina B (SARAVOLATZ, 2003)

O potencial de interações medicamentosas com voriconazol é alto devido ao seu metabolismo por isoenzimas CYP450. Os indutores do CYP450, como rifampicina, barbitúricos de ação prolongada e carbamazepina, diminuem as concentrações de voriconazol, e o uso desses medicamentos em combinação com voriconazol deve ser evitado. A co-administração de rifabutina e voriconazol não só leva a diminuição dos níveis do antifúngico, mas também aumenta as concentrações séricas de rifabutina em níveis tóxicos. O uso concomitante desses dois agentes é contra-indicado. Uma interação similar de 2 vias ocorre entre voriconazol e fenitoína, que é um substrato CYP2C9 e um potente indutor de CYP450. Fenitoína diminui os níveis de voriconazol; Quando os dois medicamentos são administrados concomitantemente, a dosagem de voriconazol administrada por via oral deve ser duplicada. No entanto, o voriconazol aumenta os níveis de fenitoína ao competir pela enzima CYP2C9 pela qual a fenitoína é metabolizada. Assim, os níveis de fenitoína devem ser cuidadosamente monitorizados quando os dois agentes são usados concomitantemente (SARAVOLATZ, 2003).

Para o voriconazol não foi definida uma gama terapêutica padronizada, a maioria dos estudos disponíveis recomenda concentrações de aproximadamente 1-6 $\mu\text{g/mL}$. Ainda são necessários ensaios prospectivos e randomizados para confirmar a correlação entre as concentrações plasmáticas de voriconazol e os resultados clínicos (HOWARD, 2008).

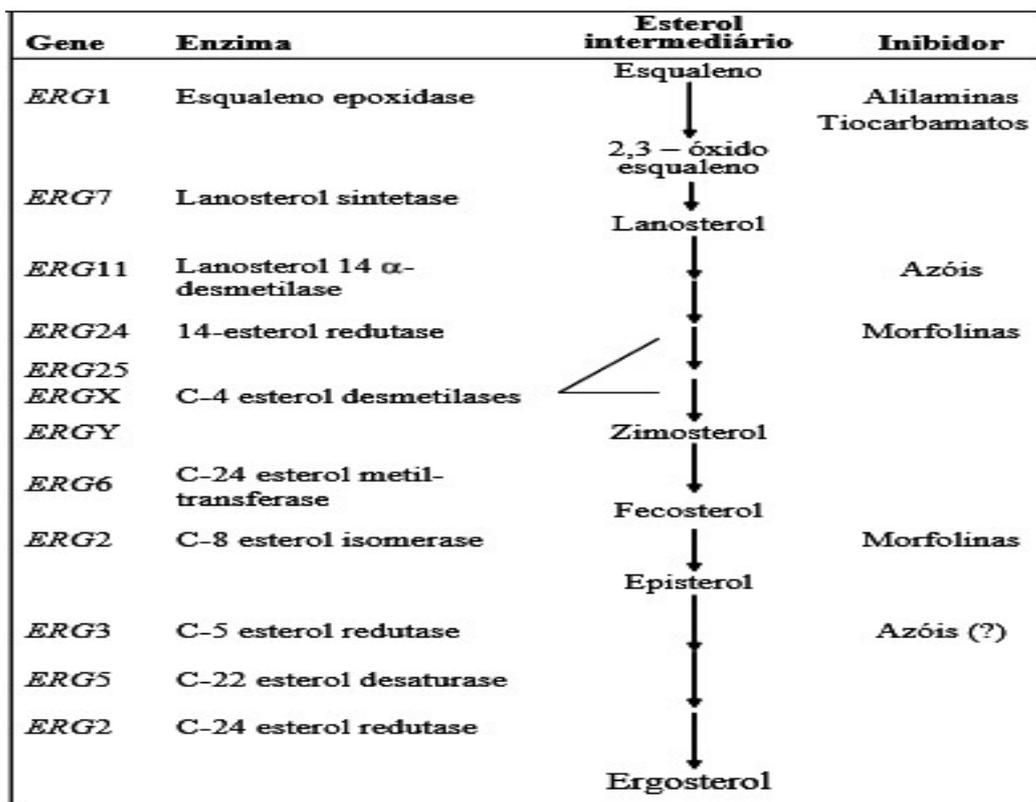
O voriconazol foi aprovado para o tratamento da aspergilose invasiva com base nos resultados de um estudo de tratamento grande, multinacional e randomizado que comparou o voriconazol com a anfotericina B e os resultados de um estudo menor, europeu, aberto e não comparativo (DENNING, 2002; HERBRECHT., 2002)

2.3.2 Itraconazol

O itraconazol (Sporanox, Janssen XXXXX) é um agente antifúngico ativo contra *Aspergillus fumigatus* (SOUBANI., 2002). O nitrogênio livre da molécula azol compete com o oxigênio no átomo de ferro heme catalítico das enzimas do citocromo P-450. A principal enzima inibida é a lanosterol 14 α -desmetilase, uma enzima microsômica do citocromo P-450 (CYP51), codificada pelo gene ERG11, complexada a uma flavoproteína. A droga se liga através de um grupo nitrogênio na posição 5 do anel azólico ao grupo heme da enzima alvo e bloqueia a desmetilação do carbono 14 do lanosterol, gerando depleção de ergosterol e excesso de 14-metilesteróis. O resultado é um acúmulo de precursores que substituem o ergosterol na membrana celular gerando modificações na permeabilidade da membrana fúngica, na atividade de enzimas ligadas à membrana (ATPase e enzimas de transporte de elétrons), na coordenação da síntese de quitina, ocorrendo a lise celular, e portanto exercendo um efeito fungistático (MAFFEI, 2006). Outra enzima que participa dessa biossíntese, além de ser atingida pelos azóis é a C-5 esterol redutase, codificada pelo gene ERG3. O hidroxitraconazol, um metabolito bioativo do itraconazol, tem atividade antifúngica semelhante ao composto original (HOSTETLER., 1993).

O itraconazol liga-se muito fracamente ao citocromo de mamífero P-450, o que reduz consideravelmente a toxicidade da droga em seres humanos.

Figura 1-Via biossintética do ergosterol a partir do escaleno.



Fonte: MAFFEI (2006)

Para o itraconazol ser eficaz no tratamento de AIE ter uma absorção significativa com distribuição sistêmica, deve-se monitorar continuamente a dose recomendada de itraconazol no soro, uma vez que a absorção varia substancialmente entre pacientes. O itraconazol é eficaz em doentes com imunodeficiências menos graves, isto é, aqueles que são capazes de absorver itraconazol do trato gastrointestinal, tais como transplante de órgão sólido, anemia aplástica ou pacientes com linfoma, e com distúrbios na imunidade celular. O antifúngico é eficaz em pacientes em tratamento anterior que não obteve êxito ou foi descontinuado devido à nefro e hepatotoxicidade da droga. Ocorre resistência em qualquer droga que estimule o metabolismo P-450 como por exemplo a rifampicina, fenitoína, carbamazepina, fenobarbitona e essas drogas irão interagir negativamente com o itraconazol. Considerando estas desvantagens, o itraconazol deve ser considerado uma droga antifúngica de segunda linha (LATGÉ, 1999).

Em pacientes com infecção na fase aguda as doses recomendadas deve ser de 600 a 800mg/dia durante 3 a 4 dias, seguidos por 400 mg/dia, havendo também, um acompanhamento das concentrações no soro, que se estiverem entre 2 a 40mg/mL, é provável que ocorra uma resposta positiva ao tratamento (LATGÉ, 1999; LATGÉ., 2017). Quando o tratamento requer longa duração, vários meses, mas não deve ultrapassar a 26 meses (devido ao alto índice de mortalidade após essa quantidade de tempo). A longa duração do tratamento é possível, uma vez que o itraconazol é bem tolerado pelos pacientes e a vantagem é o uso fora do hospital.

2.4 RESISTÊNCIA FÚNGICA

A resistência fúngica adquirida desenvolve-se em resposta à exposição de fungos aos compostos azólicos, isto mostra que a resistência a droga se desenvolve após a exposição no paciente ou em ambientes agrícolas. As condições favoráveis para o desenvolvimento da resistência aos azólicos incluem a longa duração da exposição ao fármaco e um elevado número de microrganismos em reprodução (SNELDERS., 2008)

A prevalência de isolados de *Aspergillus* resistente aos compostos azólicos podem diferir, dependendo da localização do hospital onde os pacientes são admitidos e da doença subjacente dos pacientes. Determinar a epidemiologia local ou regional, especialmente em áreas onde os isolados resistentes aos azólicos são encontrados no ambiente. Os pacientes podem inalar os esporos resistentes aos azólicos no ar e subsequentemente desenvolverem uma doença resistente a esses antifúngicos, mesmo quando nunca foram tratados com compostos azólicos. Embora o risco de inalação de esporos de *Aspergillus* resistentes aos azólicos possa ser semelhante para todos os pacientes (Sugiro inserir uma referencia aqui). A vigilância sanitária na Holanda indica que há variação das taxas de resistência de isolados de *Aspergillus* dependendo da localização dos hospitais.

Quando os isolados de *A. fumigatus* são provenientes de pacientes às taxas de resistência aos azólicos variaram de 4,3% a 19,2% em 2013 e 3,8% a 13,3% em 2014 (VAN DER LINDEN, 2016).

Aspergillus fumigatus habitualmente abriga o mecanismo de resistência TR34 / L98H ou TR46 / Y121F / T289A. Segundo Snelders et al. (2008) a substituição da leucina pela histidina no gene CYP51A, juntamente com duas cópias de uma sequência de 34 pb tandem no promotor do gene (TR / L98H), é o mecanismo de resistência dominante. A análise por microsátélites indicou que os isolados resistentes a itraconazol são geneticamente distintos, mas permanecem agrupados.

A resistência é conferida ao *A. fumigatus* é resultado de uma superprodução da enzima alvo (lanosterol 14 desmetilase) e a alteração no alvo da droga que resulta em aumento do número de cópias da enzima alvo e alteração na ligação da droga sem alterar a capacidade de catalizar a desmetilação (MAFFEI, 2006).

2.5 MALDI-TOF MS

Na espectrometria de massas, a dessorção / ionização por laser sobre uma matriz orgânica (MALDI) é uma técnica de ionização que utiliza uma matriz de absorção de energia laser para criar íons a partir de moléculas grandes com fragmentação mínima (HILLENKAMP, 1991; HILLENKAMP., 2014).

Nas últimas décadas, o MALDI-TOF tornou-se uma das ferramentas mais eficazes para a análise de biomoléculas. O princípio geral do espectro de massas é separar e detectar íons em fase gasosa. O MALDI como princípio para análise de grandes biomoléculas foi introduzido por Karas e Hillenkamp (1987). Em resumo, a amostra é incorporada na estrutura cristalina de pequenos compostos orgânicos (matriz) e depositada em um suporte de amostra condutor. Os coquetês são irradiados com um raio laser pulsado de nanosegundos, por exemplo, um laser ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 266 ou 337 nm. As energias introduzidas são de 1×10^7 - 5×10^7 W / cm². A energia do laser causa a decomposição estrutural do cristal irradiado e gera uma nuvem de partículas (a pluma) a partir da qual os íons são extraídos por um campo elétrico. Pode ser mais bem descrito como uma conversão da energia do laser para a oscilação vibratória das moléculas de cristal. Isso resulta na desintegração do cristal. Após a aceleração através do campo elétrico, os íons derivam através de um caminho livre de campo e, finalmente, alcançam o detector (multiplicador de elétrons secundário ou placa de canal). As massas de íons (taxas de massa e carga, m/z) são tipicamente calculadas medindo o TOF, que é mais longo para moléculas maiores do que para menores (desde que suas energias iniciais sejam idênticas). Com os íons predominantemente carregados e não fragmentados, são geradas as massas de íons parentais que podem ser facilmente determinadas a partir do espectro resultante sem a necessidade de processamento de dados complexo. (HILLENKAMP, 1991; HILLENKAMP., 2014). As massas são acessíveis como dados

numéricos para processamento direto e análise subsequente. Os TOF medidos durante um experimento típico MALDI estão no intervalo de vários microssegundos (JURINKE, 2004).

Segundo JURINKE (2004) a desorção a laser que assiste uma matriz ionizante-espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF) identifica com precisão bactérias e fungos selecionadas em situações clínicas. Na qual no atual momento esta sendo avaliada para uso rotineiro hospitalar.

2.6 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS

O MALDI-TOFMS está emergindo como uma ferramenta importante e cada vez mais amplamente disponível em laboratórios de microbiologia clínica. Esta tecnologia permite a detecção e identificações precisas e sensíveis de bactérias e fungos através de amostras biológicas com micro-organismos (VELLA, 2013).

Esses testes são principalmente realizados para orientar o tratamento de infecções ou em casos de falhas terapêuticas. A seleção e disseminação de estirpes de patógenos resistentes aos medicamentos ao longo dos últimos 50 anos tornou-se um importante problema de saúde pública global que faz o teste de susceptibilidade a drogas de micro-organismos patogênicos uma ferramenta indispensável e na luta contra doenças infecciosas. Os testes de susceptibilidade baseiam-se no crescimento de medição do crescimento microbiano frente a diferentes concentrações de fármacos, de modo a determinar a concentração mínima de inibição (CIM) para a população de um determinado patógeno, uma vez que o valor da CIM determinado *in vitro* ajuda a prever a eficácia terapêutica (MARINACH, 2009).

O método de detecção de resistência fúngica utilizando MALDI-TOFMS, tem como princípio uma abordagem baseada em uma matriz de correlação gerado através de auto-correlações e correlações cruzadas entre diferentes espectros. Esta matriz é produzida por um índice de correlação de composto (CCI), que permite de forma confiável e precisa, a determinação da concentração inibitória mínima que promove alguma alteração/mudança de perfil proteico. Este valor de ponto final tem se tornado uma alternativa ao CIM, dependendo das mudanças proteômicas detectáveis após uma exposição de células de fungos a diferentes concentrações da droga. Os endereços secundários de MALDI-TOFMS fornecem uma economia de tempo clara (15 h versus 24 h ou mes 72h) sobre os métodos baseados em CLSI ou EUCAST. (VELLA, 2013)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE FUNGOS

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizadas 20 (vinte) culturas de *Aspergillusfumigatus* (Sherf, 1943) provenientes da Micoteca URM (Tabela 2) do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil e uma sensível aos antifúngicos azólicos, cedida pela Universidade de Nantes.

Tabela 1: Relação de *Aspergillusfumigatus* estocados à micoteca URM (UFPE) com o substrato de isolamento, local e data

| Registro URM | Substrato | Local | Ano de depósito |
|--------------|--|------------|-----------------|
| 7315 | Solo de mata atlântica | Paraná | 2015 |
| 7306 | Solo de bosque | São Paulo | 2015 |
| 7021 | Olho humano | Pernambuco | 2013 |
| 7020 | Olho humano | Pernambuco | 2013 |
| 6641 | Folha de mata atlântica | Paraná | 2012 |
| 6577 | Esputo humano | Pernambuco | 2012 |
| 6576 | Esputo humano | Pernambuco | 2012 |
| 6573 | Lavado bronco alveolar humano | Pernambuco | 2012 |
| 6571 | Esputo humano | Pernambuco | 2012 |
| 6570 | Esputo humano | Pernambuco | 2012 |
| 6568 | Lavado bronco alveolar humano | Pernambuco | 2012 |
| 6564 | Lavado bronco alveolar humano | Pernambuco | 2012 |
| 6562 | Esputo humano | Pernambuco | 2012 |
| 6560 | Esputo humano | Pernambuco | 2012 |
| 6559 | Lavado bronco alveolar humano | Pernambuco | 2012 |
| 6534 | Solo de caatinga | Pernambuco | 2012 |
| 6483 | Capsula de castanha da índia | Pernambuco | 2011 |
| 6327 | Conduto auditivo externo humano | Pernambuco | 2011 |
| 6326 | Conduto auditivo externo humano | Pernambuco | 2011 |
| 6200 | Pulmões de paciente humano transplantado | Pernambuco | 2010 |

Fonte: o Autor (2018)

3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* AOS ANTIFÚNGICOS

A técnica utilizada seguiu o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008) com modificações. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os agentes antifúngicos comerciais utilizados foram itraconazol e o voriconazol (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium). As substâncias foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e as concentrações foram preparadas nos intervalos de $0,0313$ a $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o preparo das suspensões os isolados de *Aspergillus fumigatus* foram cultivados em ágar batata-dextrose durante sete dias, posteriormente as colônias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de solução salina estéril a $0,85\%$ agitando-se delicadamente as colônias com a ponta de uma pipeta de transferência. Acrescentou-se a suspensão $0,01 \text{ mL}$ de Tween 20 para facilitar a dispersão dos conídios. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para um tubo de ensaio estéril. Quando as partículas mais pesadas se depositarem no fundo, após 3 a 5 minutos, a suspensão homogênea foi transferida para um tubo esterilizado, fechando-se a tampa firmemente, e homogeneizando-se em um agitador de tubos durante 15 segundos.

As densidades das suspensões de conídios foram lidas e ajustadas pela densidade óptica (DO) de $0,15$ a $0,17$ (transmitância de 68 a 70%), As diluições de inóculo $1:50$ corresponderam a $2X$ a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, aproximadamente. O inóculo pode ser quantificado colocando $0,01 \text{ mL}$ de uma diluição de $1:100$ do inóculo ajustado numa placa de ágar Sabouraud-dextrose para determinar as unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. As placas foram incubadas a temperatura de 30°C e observadas diariamente para verificar a presença das colônias. As colônias foram contadas, assim que possível, após 24 h de crescimento ao tornar-se visível, cada poço foi inoculado com $0,1 \text{ mL}$ da suspensão de $2X$ do inóculo de conídios. Para itraconazole voriconazole ponto final da reação é, em geral, facilmente definido e a CIM pode ser lida como a menor concentração da droga que proporciona qualquer grau de crescimento discernível (100% de inibição, ou escore numérico de 0). Em geral, não são encontrados pontos finais da reação mal definidos (*trailing*).

Para o teste sensibilidade foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços. O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas, e as placas foram incubadas a 35°C durante 46 a 50 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O teste foi realizado em triplicata, uma coluna foi utilizada como controle negativo sem adição de antifúngico.

3.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para identificação proteômica foram utilizadas as amostras sem adição dos antifúngicos utilizada no teste de sensibilidade *In Vitro*. Os propágulos fúngicos foram transferidos para tubos *Eppendorf* de 1,5 mL em 300 µL de água destilada esterilizada e homogeneizada em agitador rotatório. Em seguida adicionado 900 µL etanol absoluto, o conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado e então centrifugado a 12.000 g durante 2 min; o sobrenadante foi descartado e o sedimento seco a temperatura ambiente. O sobrenadante foi misturado com 50 µL de ácido fórmico (70%), levado ao agitador rotatório, em seguida, adicionado 50 µL de acetonitrila e homogeneizado em agitador rotatório. A solução foi centrifugada a 12.000g durante 2 min, e 1 µL do sobrenadante foi colocado em duplicata sobre uma placa de aço, seco a temperatura ambiente a 25° C. Posteriormente, cada amostra foi revestida com 1 µL de solução de matriz, o qual consisti de uma solução saturada de α -ciano-ácido 4 hidroxí-cinâmico (HCCA) em 50% de acetonitrila e 2,5% ácido trifluoroacético (concentração final: 10 mg HCCA/mL) e seca a temperatura ambiente a 25°C. A placa alvo em aço polido de MALDI-TOF MS foi subsequentemente introduzida no espectrômetro de massas para obtenção dos espectros proteicos.

Os espectros para determinação dos isolados a partir de cada perfil proteico foram obtidos através de um laser Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet; Nd:Y3Al5O12) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit proteico (protein calibration standard I, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, foram usadas para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104ns em uma voltagem de +20kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 300 tiros de laser acumulados por perfil e oito perfis produzidos por amostra, levando a um total de 2.400 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.1) onde as identificações finais foram determinadas. Identificação através do software Biotyper™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

3.4 DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS (TSA-MS)

O TSA-MS foi realizado de acordo com Marinachet *al.* (2009) com modificações. Isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* foram obtidos a partir de uma suspensão de 10⁷ UFC/mL, cultivadas em meio RPMI por 12h a uma temperatura de 37°C sob agitação. Após o crescimento foi transferida para placas de microtitulação contendo diluições seriadas de itraconazol e voriconazol (8-0,03135 µg/mL) e mantidas a 37°C sob agitação por 3h. Uma coluna da placa de microtitulação foi utilizada como controle negativo sem adição de antifúngico e com o meio RPMI mais a suspensão de conídios. As suspensões foram lavadas duas vezes em água destilada esterilizada e

solubilizadas em ácido fórmico a 30%. Um microlitro de cada suspensão de células fúngicas foi transferida diretamente, em duplicata, sobre o anel da placa em aço polido (BrukerDaltonics, Bremen, Germany), e em seguida, foi adicionado 1 μ L de etanol absoluto e 1 μ L de solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e acetonitrila a 50%; ácido trifluoracético a 2,5%, deixando-se secar a temperatura ambiente.

Aferições espectrais foram realizadas com o equipamento (BrukerDaltonics) dentro de uma variação de massa de 3.000 a 8.000 Da e registrados em modo linear positivo (DE CAROLIS *et al.*, 2012). Para cada experimento, espectros foram obtidos do total de quatorze concentrações de cada um dos três antifúngicos e do controle livre de droga, para serem importados e analisados ao software MALDI Biotyper 3.1 da empresa BrukerDaltonics (DeCaroliset *al.*, 2012). A ferramenta do MALDI Biotyper nomeada Índice de Correlação de Composto (ICC) foi utilizada como método estatístico para analisar a relação entre os espectros (DEGAND *et al.*, 2008).

Os espectros brutos foram divididos em dose intervalos do mesmo tamanho (417 Da cada) e a composição de correlações cruzadas e auto correlações de todos os intervalos, em termos de médias geométricas, foi utilizada como parâmetro de distância entre os espectros (VELLA *et al.*, 2013). Valores de ICC próximo a um representam elevada conformidade de espectros, enquanto que valores ao redor de zero indica uma clara diversidade entre os espectros (VELLA *et al.*, 2013).

Os resultados foram visualizados em uma matriz de correlação e traduzidos em “mapa calor”, onde espectros proximamente relacionados foram identificados em cores “quentes” e espectros não relacionados em cores frias, baseados em seus valores de ICC alto e baixo, respectivamente. Então, a sensibilidade do pico espectral de cada concentração foi comparada contra a concentração máxima e livre de droga. Finalmente, foi possível determinar a concentração mínima a alterar o perfil para o antifúngico avaliado. Um valor definido como a concentração da droga mais baixa ao qual um pico espectral é similar a aquele observado à concentração máxima do que o pico espectral observado à ausência de droga (DE CAROLIS *et al.*, 2012).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISES DOS RESULTADOS

4.1.1 Teste de sensibilidade *In Vitro* aos antifúngicos

O teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro* foi realizado com dois antimicóticos, itraconazol e voriconazol, utilizando o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008), frente aos 21 *Aspergillus fumigatus* que foram mantidos em meio BDA. Todos os *Aspergillus fumigatus* (100%) foram sensíveis frente ao itraconazol; para voriconazol, dez (47.61%) foram sensíveis, sete (33,33%) foram susceptíveis dose-dependente e dois (9,52%) isolados apresentaram resistência. O *breakpoint* com sua respectiva CIM de cada isolado de *Aspergillus fumigatus* se encontra sumarizado na Tabela 3.

Tabela 2. Pontos de corte e Valores da Concentração Mínima Inibitória das 20 cepas de *Aspergillus fumigatus* frente aos antifúngicos voriconazol e itraconazol.

| Número de Registro URM | Concentração Inibitória Mínima (MIC ou seria CIM) | |
|------------------------|---|-----------------|
| | Voriconazol | Itraconazol |
| 6559 | SDD (4 µg/ml) | S (0,25 µg/ml) |
| 7315 | R (8 µg/ml) | S (0,25 µg/ml) |
| 6577 | R (8 µg/ml) | S (0,125 µg/ml) |
| 7020 | SDD (4 µg/ml) | S (0,125 µg/ml) |
| 6560 | I (1 µg/ml) | S (0,125 µg/ml) |
| 6577 | SDD (4 µg/ml) | S (0,125 µg/ml) |
| 7021 | SDD (4 µg/ml) | S (0,125 µg/ml) |
| 6326 | SDD (4 µg/ml) | S (0,125 µg/ml) |
| 6570 | SDD (4 µg/ml) | S (0,5 µg/ml) |
| AF/FR | SDD (4 µg/ml) | S (0,125 µg/ml) |
| 6571 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6568 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6568 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6573 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 7306 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6576 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6571 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6569, | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6534 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |

I: Intermediário; R: Resistente; S: sensível; SDD: Susceptível Dose Dependente URM, CIM

Fonte: o Autor (2018)

As linhagens mantidas na Micoteca URM de *Aspergillus fumigatus* registradas sob os números 6562, 6327, 6483, 6326 não cresceram em meio Batata dextrose Agar (BDA).

4.1.2 Análise proteômica

A identificação por MALDI-TOF MS ocorreu através dos espectros obtidos que foram analisados por um algoritmo, o qual foram comparados com os espectros brutos com os espectros da base de dados Biotyper™ versão 3.1, (BrukerDaltonics, Germany/USA) que identificou em nível de espécie todos os isolados testados de *Aspergillus fumigatus* com valores de registro (*score*) ≥ 2.0 . Quando a identificação apresentava um score abaixo de 2.0, foi realizada nova extração proteica do isolado para confirmação do resultado. O relatório de identificação dos isolados de *Aspergillus fumigatus* apresenta os melhores escores de 2,038 e 1,99 (Software MALDI Biotyper versão 3.1).

4.1.3 Detecção de resistência pelo maldi-tof MS

Todos os vinte *Aspergillus fumigatus* foram testados frente a onze diferentes concentrações de cada um dos antifúngicos (itraconazol e voriconazol), totalizando 22 condições experimentais distintas por fungos. A detecção foi realizada através da combinação do teste de susceptibilidade antifúngica padronizada pelo CLSI e o teste de susceptibilidade antifúngica por espectrometria de Massas. Os resultados estão expressos na Tabela 4, e os isolados que apresentaram discrepância em seu ponto de corte de acordo com cada metodologia, encontram-se destacados em negrito.

Tabela 3: Comparação da entre os *breakpoints* obtidos pelo método tradicional seguindo as recomendações do CLSI e utilizando a espectrometria de massas através do MALDI-TOF MS

| Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$) | | | | |
|---|--|---|---|--|
| Método de microdiluição em caldo | | | Método proteômico | |
| Numero de registro URM | Voriconazol | Itraconazol | Voriconazol | Itraconazol |
| 6559 | SDD(4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,25 $\mu\text{g/ml}$) | SDD(4 $\mu\text{g/ml}$) | SDD (2 $\mu\text{g/ml}$) |
| 7315 | R (8 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,25 $\mu\text{g/ml}$) | R (8 $\mu\text{g/ml}$) | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) |
| 7020 | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) |
| 6560 | SDD 1 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) | SDD (1 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) |
| 6577 | R (8$\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,25 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) |
| 7021 | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) |
| 6326 | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,25 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,25 $\mu\text{g/ml}$) |
| 6570 | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,5 μg $\mu\text{g/ml}$) | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,5 μg $\mu\text{g/ml}$) |
| AF/FR | SDD (4 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) | SDD (1 $\mu\text{g/ml}$) | S (0,125 $\mu\text{g/ml}$) |
| 6571 | S(<0.125 $\mu\text{g/ml}$) | S(<0.125 $\mu\text{g/ml}$) | S(<0.125 $\mu\text{g/ml}$) | S(<0.125 $\mu\text{g/ml}$) |

| | | | | Continuação |
|------|---------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------|
| 6568 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6573 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 7306 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | SDD (1 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) Continua |
| 6576 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6571 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6569 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |
| 6534 | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) | S(<0.125 µg/ml) |

I: Intermediário; R: Resistente; S: sensível; SDD: Susceptível Dose Dependente.

Fonte: o Autor (2018)

O número de isolados e o cálculo da reprodutibilidade, apresentando a comparação entre o percentual das duas metodologias, a fim de observar a eficácia e concordância dos dois testes, estão sumarizados na Tabela 5, onde a reprodutibilidade em comparação entre os dois testes variou de 83,3% a 88,8% dependendo da droga avaliada.

Tabela 4: O número de isolados sensíveis e o percentual de reprodutibilidade de acordo com as metodologias CLSI e MALDI-TOF frente a itraconazol e voriconazol.

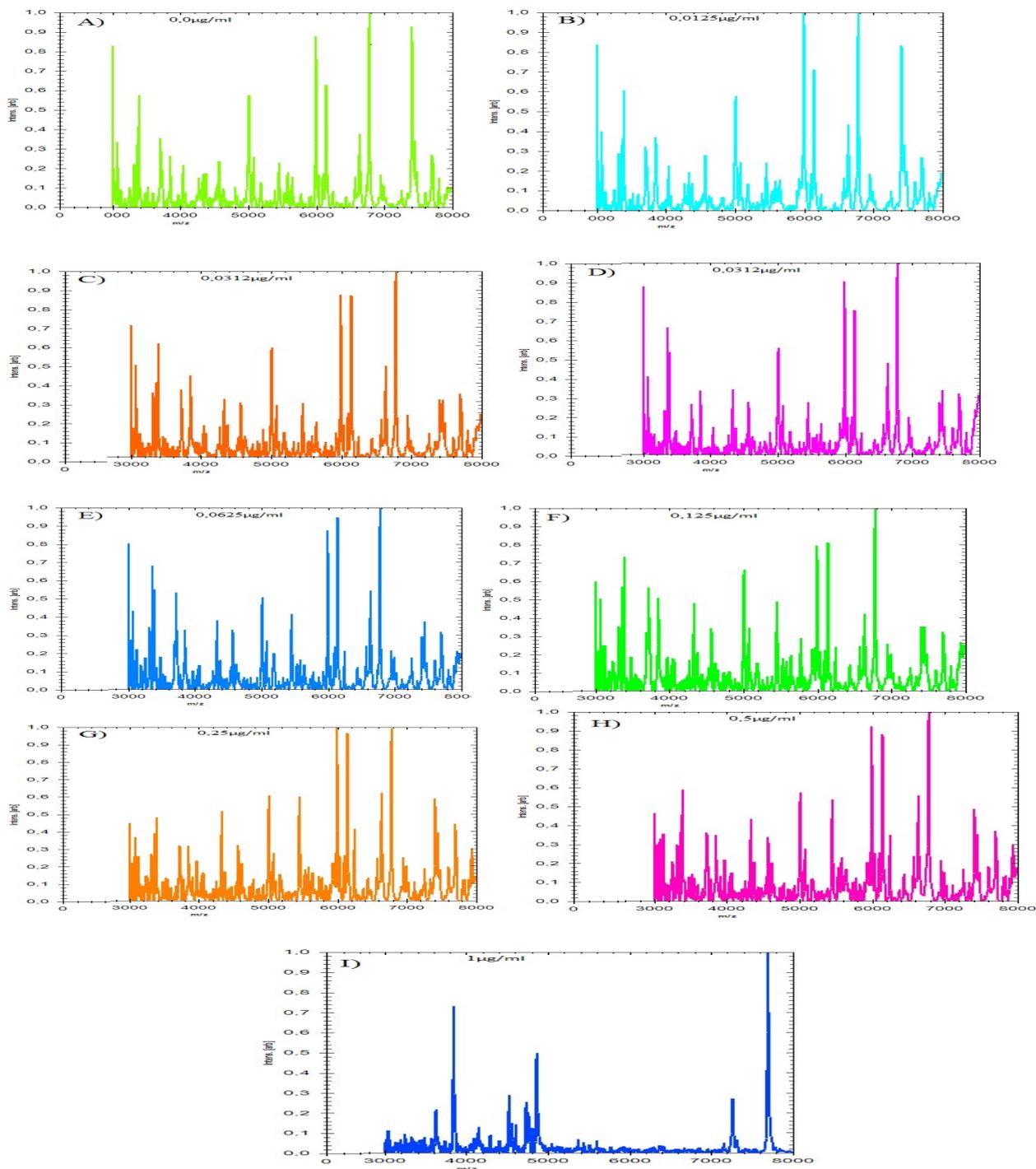
| Espécie | Número de linhagens sensível nos Métodos de Concentração Inibitória Mínima | | | | Reprodutibilidade em porcentagem das metodologias CIM e MPCC (%) | |
|------------------------------|--|-------------|-------------|-------------|--|-------------|
| | CIM | | MPCC | | Voriconazol | Itraconazol |
| | Voriconazol | Itraconazol | Voriconazol | Itraconazol | | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 9 | 18 | 10 | 16 | 85,71 | 90,47 |

Fonte: o Autor (2018)

Ao comparar as duas metodologias (Tabela 5), têm-se os seguintes resultados: 1) o MALDI-TOF para voriconazolevidenciou 10 amostras sensíveis (55%), uma amostra resistente (5%) e 5 amostras obtiveram concentrações doses dependentes(27%), enquanto que pelo CLSI, nove amostras foram sensíveis (50%), 2 amostras resistentes(11%) e 6 amostras obtiveram doses dependentes(33%). O MALDI-TOF para itraconazol foi sumarizado com 16 *Aspergillus fumigatus* sensíveis (88%)e 2 amostras obtiveram concentrações doses dependentes(11%), enquanto que para o CLSI foram obtidos 18 amostras sensíveis (100%).

A Figura 3 evidencia os espectros de massas do *Aspergillus fumigatus* de código AF/FR para a linhagem resistente e a mudança mínima no perfil proteico após exposição ao voriconazol. Observa-se a total alteração dos picos espectrais da menor concentração da droga para a concentração de 1µg/ml da droga, categorizando-o como dose-dependente.

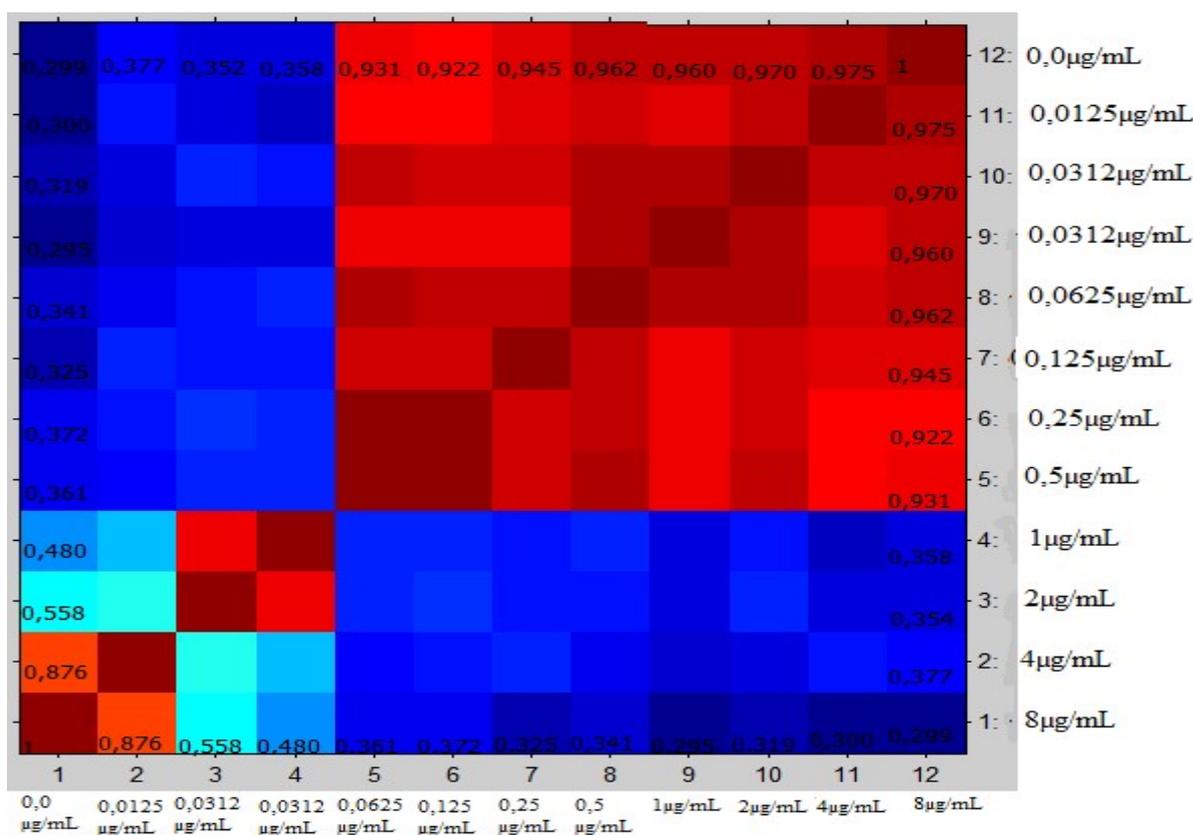
Figura 2: Espectros de Massas do *Aspergillus fumigatus* resistente AF/FR frente ao voriconazol evidenciando alteração no espectros após 3hs de exposição.



Fonte: o Autor (2018)

Todos os espectros do *Aspergillus fumigatus* resistente AF/FR foram correlacionados gerando uma matriz traduzida em mapa de calor (Figura 3) através de índices de correlação de composto (ICC). O ICC onde a matriz é derivada da seleção dos espectros de massas para *Aspergillus fumigatus* exposto por 3 horas a 37°C (CIM 1µg/mL) voriconazol (incluindo o valor nulo) de 8 - 0,0125 µg/mL. A correlação dos espectros e auto-correlações foram traduzidos em um mapa de calor onde os espectros relacionados são mostrados em cores quentes e os espectros não relacionados em cores frias. Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0

Figura 3: Mapa de calor traduzido a parti da matrizde correlação obtido através do índice de correlação de composto de *Aspergillus fumigatus* AF/FR frente ao voriconazol, após 3hs de exposição.



Fonte: o Autor (2018)

O quadro 2 apresenta os valores de índices de correlação de composto (ICC) máximo e ICC nulo, para cada concentração, que foram utilizados para gerar a matriz de correlação. Os valores de ICC nulo e ICC máximo para *Aspergillus fumigatus* AF/FR voriconazol frente a amostra a alteração do perfil proteico na concentração de 1 µg/mL (destaque em retângulo vermelho).

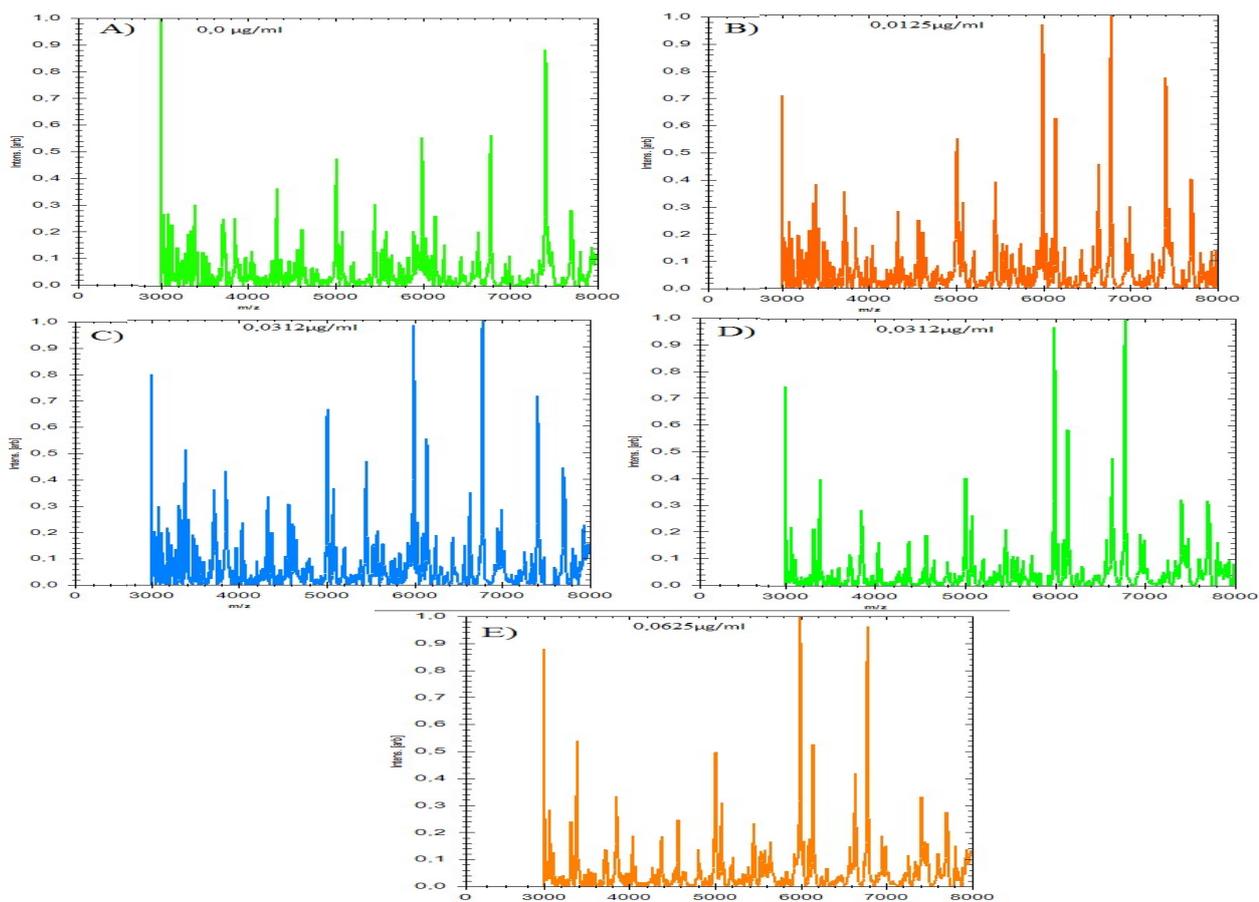
Tabela 5. Valores de correlação e auto-correlações para voriconazol.

| MPCC (µg/mL) | ICC nulo | ICC Maximo |
|--------------|----------|------------|
| 0,0 | 0,299 | 1,000 |
| 0,015625 | 0,300 | 0,975 |
| 0,03125 | 0,319 | 0,960 |
| 0,0625 | 0,295 | 0,962 |
| 0,125 | 0,341 | 0,945 |
| 0,25 | 0,372 | 0,922 |
| 0,5 | 0,361 | 0,931 |
| 1 | 0,480 | 0,358 |
| 2 | 0,558 | 0,354 |
| 4 | 0,876 | 0,377 |
| 8 | 1,000 | 0,299 |

Fonte: o Autor (2018)

A Figura 5 evidencia os espectros de massas do *Aspergillus fumigatus* de código AF/FR e a mudança mínima no perfil proteico (MMPP) após exposição ao itraconazol. Observa-se a total alteração dos picos espectrais da menor concentração da droga para a concentração de 0,0312 $\mu\text{g/ml}$, caracterizando sensibilidade.

Figura 4: Espectros de Massas do *Aspergillus fumigatus* AF/FR frente ao itraconazol xxxxx.....



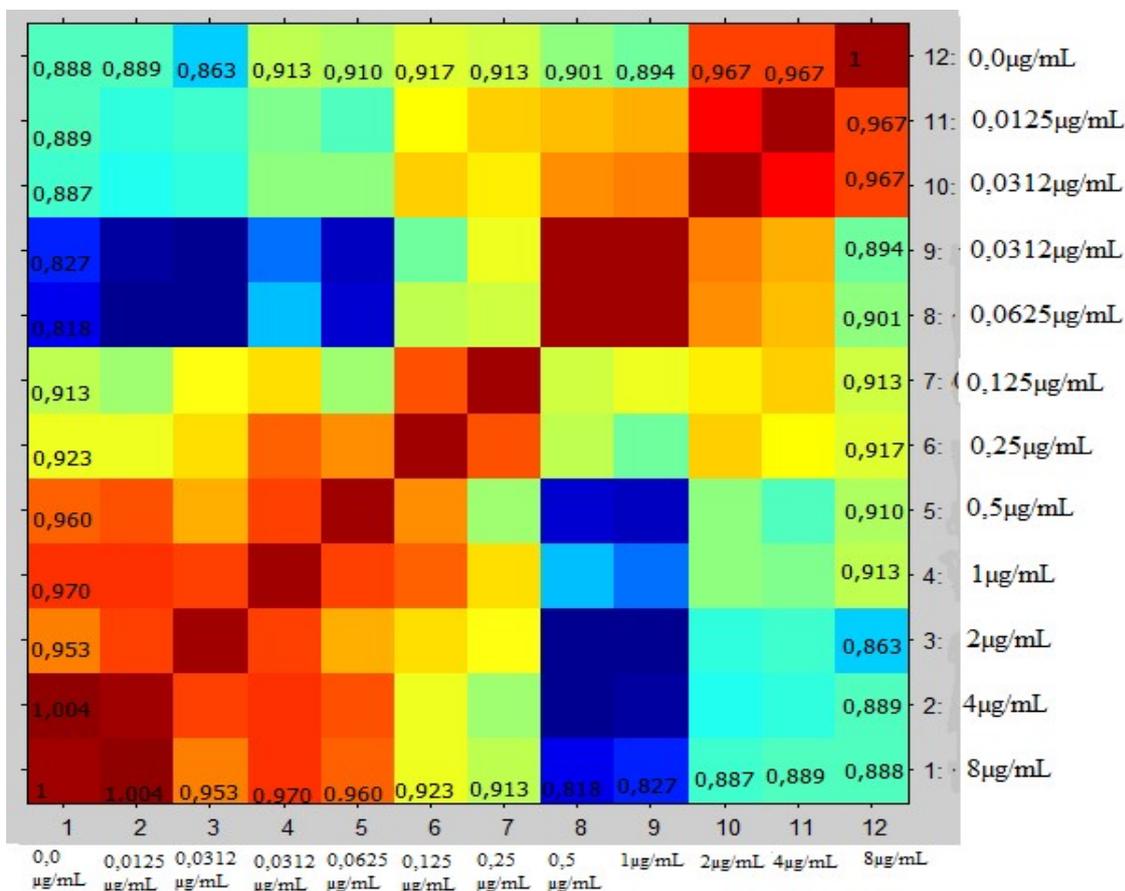
Fonte: o Autor (2018)

Todos os espectros do isolado foram correlacionados gerando uma matriz traduzida em mapa de calor (Figura 6) através de índices de correlação de composto (ICC). Após o cruzamento de cada concentração do espectro com uma das duas concentrações extremas, máxima ou nula, formou então a matriz ICC onde, ao lado direito do mapa de calor apresenta a concentração máxima e na parte inferior a concentração mínima ou nula, esses resultados foram expressos em uma tabela para cada fármaco avaliado.

A representação do Índice de Correlação do Composto (ICC) onde a matriz é derivada da seleção dos espectros de massas para *Aspergillus fumigatus* exposto por 3 horas a 37°C (CIM 1 $\mu\text{g/mL}$) itraconazol (incluindo o valor nulo) de 8 - 0,0125 $\mu\text{g/mL}$. A correlação dos espectros e

auto-correlações foram traduzidos em um mapa de calor onde os espectros relacionados são mostrados em cores quentes e os espectros não relacionados em cores frias.

Figura 5: Matriz do índice de correlação de composto de *Aspergillus fumigatus* AF/FR frente a itraconazol.



Fonte: o Autor (2018)

O quadro 3 apresenta os valores de índice de correlação de composto (ICC) máximo e ICC nulo, para cada concentração, que foram utilizados para gerar a matriz de correlação. Os valores de ICC nulo e ICC máximo para itraconazol (0,0625 µg/mL) frente ao *Aspergillus fumigatus* AF/FR mostra a alteração do perfil proteico (destaque em retângulo vermelho).

Tabela 6: Valores de correlação e auto-correlações para Itraconazol.

| MPCC (µg/mL) | ICC nulo | ICC Maximo |
|--------------|----------|------------|
| 0,0 | 0,888 | 1 |
| 0,015625 | 0,889 | 0,967 |
| 0,03125 | 0,887 | 0,967 |
| 0,0625 | 0,827 | 0,894 |
| 0,125 | 0,818 | 0,901 |
| 0,125 | 0,913 | 0,913 |
| 0,25 | 0,923 | 0,917 |
| 0,5 | 0,960 | 0,910 |
| 1 | 0,970 | 0,913 |
| 2 | 0,953 | 0,863 |
| 4 | 1,004 | 0,889 |
| 8 | 1,000 | 0,888 |

Fonte: o Autor (2018)

5 DISCUSSÃO

A rápida e correta detecção de resistência de espécies de *Aspergillus fumigatus* é de grande importância para a sobrevivência dos pacientes e principalmente para implantação de medidas eficazes para o controle terapêutico da doença. A espectrometria de massas tem sido proposta como uma alternativa promissora, reduzindo o tempo para detecção de resistência e identificação do patógeno, assim favorecendo a escolha clínica quanto as drogas disponíveis e o tempo de resposta terapêutica. Os isolados utilizados neste estudo foram provenientes da Micoteca URM (UFPE) tanto de amostras clínicas quanto de amostras ambientais. Como esperado, a base TSA-CLSI pode detectar a resistência de um isolado, independentemente do mecanismo de resistência. No entanto, a resistência detectada por MALDI-TOF MS é possível quando a quantidade de proteína modificada é expressa nas células suficientemente para ser discriminados (MEDEIROS, 2016).

A falha no tratamento contra a infecção causada pelo *Aspergillus fumigatus*, vem causando preocupações emergentes em diversos países devido o alto índice de mortalidade associada, esta referida falha no tratamento pode estar associada à resistência clínica do patógeno. Relatada por diversos autores em diversos países, a resistência a antifúngicos azólicos, esta sendo descrita como uma mutação que contém grande poder migratório ao redor do globo (MORIO et al. 2012; LE PAPE et al. 2015; LAVERGNE et al. 2015; WIEDERHOLD et al. 2016). MORIO et al. (2012) relatam o primeiro caso de resistência de *Aspergillus fumigatus* a voriconazol no Brasil.

No presente estudo, os isolados de *Aspergillus fumigatus* não demonstraram resistência a itraconazol, contudo 2 (9,5%) foram resistentes para voriconazol. Assim, sugerindo a existência da mutação no gene CYP51 no Brasil e comprovando a necessidade de estudos futuros para comprovação da referida mutação.

Recentes estudos demonstram a eficácia do MALDI-TOF MS, no estudo realizado por Vella et al. (2013) que utilizaram leveduras de *Candida* e demonstraram a possibilidade da utilização desta técnica físico-química como alternativa para a rápida identificação de possíveis resistências a antifúngicos. Assim como também foi proposto a utilização de fungos de espécies de *Aspergillus* por

De Caroliset al. (2012), os autores sugerem que a técnica proteômica é um método alternativo para a detecção de resistência, e por consequência sua utilização para diagnósticos microbiológicos de rotina em hospitais. No estudo de DeCaroliset al. (2012) o fungo foi exposto a droga por 15 horas, e no presente estudo foi possível diminuir o tempo de exposição do *Aspergillus fumigatus* a droga para 3 horas.

Lavergneet al. (2015) relatam que a mutação no gene CYP51, confere ao fungo a resistência a drogas azólicas, quando relatam um caso de um homem de 23 anos, que tinha fibrose cística, este paciente apresentou índices elevados de IgE e IgE específico para aspergilose, e foi diagnosticado com aspergilose bronco pulmonar, e a cepa isolada deste paciente tinha altos índices de resistência a voriconazol (CIM \geq 32 μ g/ml) e a itraconazol (CIM \geq 8 μ g/ml) assim foi possível através deste isolado o estudo e confirmação da mutação no gene CPY51. Morioet al., (2012) quando testaram 142 amostras de esputo e lavado bronco aveolar de 50 pacientes, isolaram 85 cepas de *Aspergillus fumigatus* e concluem que em media 9,4% dos micro-organismos isolados eram resistente a drogas azólicas.

Otimizações para futura aplicação dos testes devem ser realizadas, já que podem existir alguma(s) falha(s) na padronização da quantidade de proteínas expostas, assim, as alterações proteômicas devem ser quantitativamente detectadas pelo MALDI-TOF MS, visto que, algumas leveduras após a exposição aos fármacos podem não expressar de maneira considerável as alterações no perfil proteico (MARINACH et al., 2009; DE CAROLIS et al., 2012; VELLA et al., 2013; SARACLI et al., 2015).

Para as 21 amostras de *Aspergillus fumigatus* analisadas frente as duas formulações das drogas azólicas, foi possível observar a mudança mínima no perfil espectral para a maioria, no entanto alguns resultados não foram tão sugestivos, embora cada droga já tenha seus *breakpoints* definidos pelo teste padrão do CLSI.

A reprodutibilidade do TSA pelo MALDI-TOF MS ainda é um tanto laboriosa, no entanto, mostra-se confiável quando à comparamos com o TSA pelo CLSI. Além disso, é necessário que sejam realizados mais testes com outros gêneros de fungos filamentosos patogênicos associados a outros fármacos, para que então, o TSA pelo MALDI-TOF MS seja utilizado como rotina em laboratórios de microbiologia (VELLA et al., 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados demonstraram ser sensíveis ao itraconazol de acordo com CLSI e dois (9,5%) demonstraram ser resistentes ao voriconazol de acordo com CLSI, contudo o MALDI-TOF MS obteve uma singularidade media de 85% como o teste CLSI, sendo assim possível prever que esta técnica é capaz de determinar o *breakpoint* do *Aspergillus fumigatus* após 3 horas de exposição ao antifúngico sendo assim o Teste de sensibilidade antifúngica pelo MALDI-TOF MS permite prever a melhor escolha antifúngica para pacientes críticos com aspergilose invasiva.

REFERÊNCIAS

Artigos:

- ASSIS, D. M., Juliano, L., & Juliano, M. A. (2011). A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos [http://dx. doi. org/10.5892/ruvrv. 2011.92. 344355](http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.344355). **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 9(2), 344-355.
- BARNES PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infect Dis Clin North Am**. 2006;20(3):545-61, vi.
- Buchheid D, Baust C, Skladny H, Ritter J, Suedhoff T, Baldus M, et al. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2- step polymerase chain reaction: clinical results. **Clin Infect Dis**. 2001 Aug 15;33(4):428-35.
- CHOWDHARY, Anuradha et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 555-557, 2014.
- DE CAROLIS, Elena et al. (2012). Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 5, p. 475-484.
- DEGAND, N., CARBONNELLE, E., DAUPHIN, B., BERETTI, J. L., LE BOURGEOIS, M., SERMET-GAUDELUS, I. & FERRONI, A. (2008). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, 46(10), 3361-3367.
- DENNING, D. W. 1998. Invasive aspergillosis. **Clin. Infect. Dis**. 26:781–805.
- DENNING, D. W., RIBAUD, P., MILPIED, N., CAILLOT, D., HERBRECHT, R., THIEL, E., ... & LODE, H. (2002). Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. **Clinical infectious diseases**, 34(5), 563-571.
- FRISVAD, J. C., and R. A. SAMSON. 1990. Chemotaxonomy and morphology of *Aspergillus fumigatus* and related taxa, p. 201-208. In R. A. Samson and J. I. Pitt (ed.), *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. **Plenum Press**, New York, N.Y..
- HAINES, J. 1995. *Aspergillus* in compost: strawman or fatal flaw. **Biocycle** 6:32–35.
- HERBRECHT, R., DENNING, D. W., PATTERSON, T. F., BENNETT, J. E., GREENE, R. E., OESTMANN, J. W., ... & SYLVESTER, R. (2002). Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. **New England Journal of Medicine**, 347(6), 408-415.
- HILLENKAMP, F., KARAS, M., BEAVIS, R. C., & CHAIT, B. T. (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical chemistry**, 63(24), 1193A-1203A.

- HOSTETLER, J. S., J. HEYKANTS, K. V. CLEMONS, R. WOESTENBORGH, L. H. HANSON, and D. A. STEVENS. 1993. Discrepancies in bioassay and chromatographic determinations explained by metabolism of itraconazole to hydroxylitraconazole: studies of interpatient variations in concentrations. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37:2224–2227
- HOWARD, A., HOFFMAN, J., & Sheth, A. (2008). Clinical application of voriconazole concentrations in the treatment of invasive aspergillosis. **Annals of Pharmacotherapy**, 42(12), 1859-1864.
- JURINKE, Christian; OETH, Paul; VAN DEN BOOM, Dirk. MALDI-TOF mass spectrometry. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 147-163, 2004.
- KARAS, Michael; HILLENKAMP, Franz. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988
- KAISER, L., T. HUGUENIN, P. D. Lew, B. Chapuis, and D. Pittet. 1998. Invasive aspergillosis. Clinical features of 35 proven cases at a single institution. **Medicine** 77:188–194.
- KOSMIDIS, Chris; DENNING, David W. Republished: the clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Postgraduate medical journal**, v. 91, n. 1077, p. 403-410, 2015.
- Karim, M., M. Alam, A. A. Shah, R. Ahmed, and H. Sheikh. 1997. Chronic invasive aspergillosis in apparently immunocompetent hosts. **Clin. Infect. Dis.** 24:723–733.
- Krappmann, Sven. How to invade a susceptible host: cellular aspects of aspergillosis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 136-146, 2016.
- LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.
- Latgé, Jean-Paul. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.
- LATGÉ, Jean-Paul; BEAUVAIS, Anne; CHAMILOS, Georgios. The cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, organization, immune response, and virulence. **Annual review of microbiology**, v. 71, n. 1, 2017.
- LAVERGNE, R. A., MORIO, F., FAVENNEC, L., DOMINIQUE, S., MEIS, J. F., GARGALA, G., & LE PAPE, P. (2015). First description of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 59(7), 4331-4335.
- MADAN, T., P. EGGLETON, U. KISHORE, P. STRONG, S. AGRAWAL, P. U. SARMA, and K. B. M. REID. 1997. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. **Infect. Immun.** 65:3171–3179.
- MARINACH, C., ALANIO, A., PALOUS, M., KWASEK, S., FEKKAR, A., BROSSAS, J. Y., ... & Datry, A. (2009). MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. **Proteomics**, 9(20), 4627-4631

- MATSUDA, H., S. KOHNO, S. MAESAKI, H. YAMADA, H. KOGA, M. TAMURA, H. KURASHI, and J. SUGIYAMA. 1992. Application of ubiquinone systems and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus*. **J. Clin. Microbiol.**30:2005.
- MELLADO, E. et al. Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2431-2438, 2001.
- MORENO-GONZÁLEZ, Gabriel et al. Invasive pulmonary Aspergillosis with disseminated infection in immunocompetent patient. **Canadian respiratory journal**, v. 2016, 2016.
- Morio, F., Aubin, G. G., Danner-Boucher, I., Haloun, A., Sacchetto, E., Garcia-Hermoso, D., ...& Le Pape, P. (2012). High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, dks160.
- NIERMAN, William C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1151-1156, 2005.
- PATTERSON, T. F., THOMPSON III, G. R., DENNING, D. W., FISHMAN, J. A., HADLEY, S., HERBRECHT, R., ...&SEGAL, B. H. (2016). Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, 63(4), e1-e60.
- PFEIFFER CD, FINE JP, SAFDAR N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. **Clin Infect Dis**. 2006 May 15;42(10):1417-27.
- RAPER, K. B., and D. I. FENNELL. 1965. *Aspergillus fumigatus* group, p. 238– 268. In K. B. Raper and D. I. Fennell (ed.), *The genus Aspergillus*. The William & Wilkins Co., Baltimore, Md
- ROSENBERG, M., R. PATTERSON, R. MINTZER, B. J. COOPER, M. ROBERTS, and K. E. HARRIS. 1977. Clinical and immunological criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Ann. Intern. Med.** 86:405–414
- RUSSCHER, A., VAN PAASSEN, J., DOFFERHOFF, P. A., & KUIJPER, E. J. (2014). High azole resistance rate of *Aspergillus fumigatus* at intensive care unit in a Dutch tertiary hospital. **NedTijdschr Med Microbiol**, 22, S121.
- SALES, Maria da Penha Uchoa. Aspergillosis: from diagnosis to treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1238-1244, 2009.
- SARAVOLATZ, L. D., JOHNSON, L. B., & KAUFFMAN, C. A. (2003). Voriconazole: a new triazole antifungal agent. **Clinical Infectious Diseases**, 36(5), 630-637.
- SHERF, A. F. (1943). A method for maintaining *Phytoplasma pedionica* in culture for long periods without transfer. **Phytopathology**, 33, 330-332.
- SKLADNY, Heyko et al. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3865-3871, 1999.

- SNELDERS, Eveline et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e219, 2008.
- SOUBANI, Ayman O.; CHANDRASEKAR, Pranatharthi H. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Chest Journal**, v. 121, n. 6, p. 1988-1999, 2002.
- GRESNIGT, Mark Sebastiaan. **Recognition and cytokine signalling pathways in host defence against *Aspergillus fumigatus***. [Sl: sn], 2015.
- TÂNASE AD, COLIȚĂ A, MĂRCULESCU A, BERTEANU C, STREINUCERCEL A, STOICA M, et al. Using the galactomannan antigen assay in the diagnosis of invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. **Rom J Morphol Embryol**. 2012;53(2):379-82.
- VAN DER LINDEN, J. W. et al. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised patients with invasive aspergillosis. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 1, p. 158-159, 2016.
- VELLA, A., De CAROLIS, E., VACCARO, L., POSTERARO, P., PERLIN, D. S., KOSTRZEWA, M., ... & Sanguinetti, M. (2013). Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry analysis. **Journal of clinical microbiology**, 51(9), 2964-2969.
- WALSH TJ, Anaissie EJ, DENNING DW, HERBRECHT R, KONTOYIANNIS DP, MARR KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**. 2008;46(3):327-6
- WALSH, T. J., ANAISSIE, E. J., DENNING, D. W., HERBRECHT, R., KONTOYIANNIS, D. P., MARR, K. A., ... & VAN BURIK, J. A. (2008). Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, 46(3), 327-360.
- WESSELS, J. G. H. 1993. Wall growth, protein excretion, and morphogenesis in fungi. **New Phytol**. 123:397–413.
- WHITE, P. Lewis; PARR, Christian; BARNES, Rosemary A. Predicting Invasive Aspergillosis in Hematology Patients by Combining Clinical and Genetic Risk Factors with Early Diagnostic Biomarkers. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 1, p. e01122-17, 2018.

Livros:

- DIXON, D. D., and T. J. Walsh (1992). Human pathogenesis. In J. W. Bennett and M. A. Klich (ed.), *Aspergillus, biology and industrial application*. **Butterworth-Heinemann, Boston, Mass.** p. 249–267
- KLICH, Maren. A., (2002). *Identification of Common Aspergillus Species*. First edition. New Orleans, Louisiana USA, United States Department of agriculture.
- PITT, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage* Blackie Academic & Professional. *New South Wales, Australia*.

PITT, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage* Blackie Academic & Professional. *New South Wales, Australia*.

KLICH, Maren. A., (2002). *Identification of Common Aspergillus Species*. First edition. New Orleans, Louisiana USA, United States Department of agriculture.

THAU, N., M. Monod, B. Crestani, C. Rolland, G. Tronchin, J. P. Latg'e, and S. Paris. (1994). rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 62:4380–4388

TRONCHIN, G., J. P. Bouchara, J. P. Latg'e, and D. Chabasse. (1992). Application of a Lowicryl K4M embedding technique for analysis of fungal adhesins. *J. Mycol. Me'd.* 3:74–79.

Livro de Editora não convencional:

Capítulos de livro:

SALES, M. D. P. U. (2009). Capítulo 5-Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. *J. bras.pneumol*, 35(12), 1238-1244.

LACAZ, C. da S. et al. *Tratado de micologia médica*. 2002.

SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

HILLENKAMP, Franz; JASKOLLA, Thorsten W.; KARAS, Michael. The MALDI process and method. **MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods, and Applications, Second Edition**, p. 1-40, 2014.

Capítulo em livro de Evento ou Resumo:

Manuais e outros:

BRANDÃO, I. D. S. L. (2012). Análise comparativa entre métodos laboratoriais para diagnóstico da aspergilose pulmonar.

CASSAGNE, C., Normand, A. C., L'Ollivier, C., Ranque, S., & Piarroux, R. (2016). Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*.

WAYNE, P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. *CLSI document M27-A3 and Supplement S*, 3.

Documentos eletrônicos:

CLAUDIA M. L. Maffei. 2006. Agentes antifúngicos. Disponível em: <<http://rbp.fmrp.usp.br/sites/default/files/antifungicos.pdf>> acesso em: 26 de abril de 2016'

**ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CIENTIFICA “MEDICAL
MYCOLOGY”**

**PROTEIN PROFILE OF RESISTANCE OF *Aspergillus fumigatus* TO ITRACONAZOLE AND
VORICONAZOLE.**

Eduardo marques de Araujo¹;
Programa de pós graduação em biologia de fungos-UFPE¹
Edumarques-3@hotmail.com¹

Keywords: Filamentous fungi; Antifungal resistance; azole; Antifungal activity; MALDI-TOF.

ABSTRACT

The resistance of *Aspergillus fumigatus* to azole drugs constitutes an emergency health problem, The rapid and correct diagnosis for this type of infection is essential. the technique of MALDI-TOF MS (laser desorption assisted by ionizing matrix-mass spectrometry by flight time) reduces the diagnostic time in comparison to routine methods is already a reality, however They point the capacity of this technique to identify resistant fungi by detecting minimal changes in the protein profile of the strain after exposure to the antimycotic. Therefore, the object of this research is to know the minimum inhibitory concentration of itraconazole and voriconazole, the protein profile of *Aspergillus fumigatus* and to relate it to fungal resistance. Isolates stored in the URM (UFPE) Collection and University of Nantes (France) were tested for antifungal sensitivity by CLSI against itraconazole and voriconazole. the detection of resistance through the minimal change of the protein spectral plane obtained in MALDI-TOF MS was possible after the crossing of each concentration of the spectrum, where a matrix was formed from the Index of Composite Correlation (ICC) used to generate heat maps. in this work, Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Change in Protein Profile obtained through CLSI and MALDI-TOF, showed concordance of 83.3% and 88.8% for voriconazole and itraconazole, respectively and 9.57% *Aspergillus fumigatus* isolates are Voriconazole-resistant. MALDI-TOF MS is able to determine the MIC of a filamentous fungus after 3 hours of exposure to the antifungal and allows to predict the best antifungal choice for patients with invasive aspergillosis.

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus is the most prevalent fungal pathogen in developed countries, probably because of the ease of dissemination of its conidia, causing invasive aspergillosis (AI) in immunocompromised patients or with other risk factors, whereas 79.1% of these people develop this disease. Is rapid progression, which in 85% of cases are fatal (WHITE, 2018). They germinate and produce a filamentous and septa vegetative mycelium resulting from the production of fungal proteins that promote their invasion in the respiratory tract and their growth in the lung parenchyma in the host. Various degrees of immunosuppression in the organism predispose to the establishment of this infection, from the adhesion of the fungus, the dissemination and nutrients necessary for its growth, besides predisposing factors intrinsic to the progression of the disease that can confer resistance to the host's antifungal mechanisms, evidencing a circumstantial pathogen emergent circumstantial (LATGÉET AL., 2001; MORIO, 2012).

Aspergillosis is the treatment of the use of azole drugs (Sales, 2009), which inhibit non-competitively and reversibly enzymes that participate in the final stages of ergosterol biosynthesis. The main inhibited enzyme is lanosterol 14-demethylase, a cytosolic enzyme of cytochrome P-450 (CYP51 gene), encoded by the ERG11 gene, complexed to a flavoprotein (CLAUDIA, 2006). However, this emerging public health concern has been taking on greater proportions with the characterization of azole-resistant species, which is closely linked to the mode of action of the drug (Gene CYP51) (Russcher, 2014). This type of resistance mutation was detected in four countries in Europe, Asia, Africa, and more recently in America suggesting a large geographic migration of the resistance mechanism (WIEDERHOLD, 2016).

At the present time the most widely used method in the world for susceptibility testing with *Aspergillus fumigatus* in research laboratories is the CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly the National Clinical Laboratory for Clinical Laboratory) which together with genetic tools are used in laboratory routines for confirmation of antibiotic resistance, however, aspergillosis proves to be an infection of rapid clinical progression, thus making these tests slow.

It is clear that the selection and dissemination of drug-resistant strains of pathogens over the past 50 years has become a major public health problem and there is a need for rapid results. The drug susceptibility test of pathogenic microorganisms is an indispensable and challenging tool in the fight against infectious diseases, even though its recent use in microorganisms is the MALDI-TOF MS, has helped to identify fungi species in shorter periods of time, and recently has determined the protein resistance profile (CASSAGNE, 2016). There are still few studies related to filamentous fungi, if there is a relation of the protein profile to the resistance to the antifungals used in the therapeutics. However, the spectrum of the proteins by MALDI - TOF MS can be readily established to describe the resistance proteomic profile of *Aspergillus fumigatus*, decreasing the time and improving the precision of the diagnosis in order to be of benefit, for clinical trials and to monitor the emergence of drug resistance.

Materials and methods

Fungus Cultures

For the development of the project, 20 (twenty) *Aspergillus fumigatus* cultures from the URM Micoteca of the Department of Mycology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil, were used. and a fungus crop from the University of Nantes (France)

In Vitro sensitivity test for antifungals

The technique used followed the protocol M38-A2 (CLSI, 2008) with modifications. The culture medium used was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) with L-glutamine and without sodium bicarbonate, pH 7.0 ± 0.1 , with morpholinopropanesulfonic acid (MOPS; 0.165 mol.L-1; Sigma-Aldrich). The culture medium will be sterilized on 0.22 μm membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). The commercial antifungal agent used was itraconazole and voriconazole (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium). Itraconazole and voriconazole was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) and concentrations were prepared in the ranges of 0.0313 to 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. For the preparation of suspensions *Aspergillus fumigatus* was cultured on potato-dextrose agar for seven days, then the colonies should be covered with approximately 1 ml of sterile 0.85% saline

solution and prepare a suspension by gently stirring the colonies with the tip of a pipette transfer. Add one drop (approximately 0.01 ml) of Tween 20 which will facilitate the preparation of the inocula. The resulting mixture of conidia and hyphae fragments was withdrawn and transferred to a sterile test tube. When the heavier particles settle to the bottom after 3 to 5 minutes, the upper homogeneous suspension was transferred to a sterile tube, the cap closed tightly, and homogenized on a tube shaker for 15 seconds.

The densities of conidial suspensions were read and adjusted to an optical density (OD) 0.15 to 0.17 (transmittance 68-70%), dilutions of inoculo 1: 50 correspond to 2X the required density of 0.4×10^4 to 5×10^4 CFU / mL, approximately. The inoculum can be quantified 0,01mL placing a dilution of 1: 100 inoculum adjusted in a Sabouraud dextrose agar plate to determine the viable number of CFU per milliliter. The plates were incubated at 28 to 30 ° C and observed daily to verify the presence of fungal colonies. The colonies were counted as soon as possible after 24h growth becomes visible, each well must be inoculated with 0.1 ml of 2X suspension of conidia inoculum. Preliminary data indicate that high MIC values of itraconazole ($> 8\mu\text{g} / \text{mL}$) are associated with clinical resistance to this agent.

For itraconazole and voriconazole the end point of the reaction is generally set easily and MIF may be read as the lowest concentration of drug that provides any degree of discernible growth (100% inhibition or numerical score of 0). In general, no trailing ends of the reaction are found.

For the sensitivity test, 96-well flat microtiter plates were used. The inoculum was added to wells with drug to be tested, and the plates were incubated at 35 ° C for 46 to 50 hours to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) .The test is performed in triplicate, suspension without the addition of antifungal be used as negative control.

Proteomic analysis

For identification, the samples without antifungal additive used in the In Vitro sensitivity test were used. The fungal propagules were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes mixed completely in 300 μL of distilled and sterilized water and agitated to the vortex. Then 900 μL absolute ethanol was added, the contents were thoroughly homogenized and then centrifuged at 12,000 g for 2 min; the supernatant was discarded and the pellet dried at room temperature. The pellet was mixed with 50 μL of formic acid (70%), taken to the vortex, then 50 μL of acetonitrile was added and homogenized on the vortex.

The solution was then centrifuged at 12,000g for 2 min, and 1 μL of the supernatant was placed in duplicate on a steel plate, dried at room temperature at 25 ° C. Thereafter, each sample was coated with 1 μL matrix solution, which consisted of a saturated α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (HCCA) solution in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid (final concentration: 10 mg HCCA / ml) and dried at 25 ° C W. The MALDI-TOF MS polished steel target plate was subsequently introduced into the mass spectrometer to obtain the protein spectra.

The spectra for the determination of the isolates from each protein profile were obtained by a 1064nm Nd: YAG (neodymium-doped yttrium aluminum garnet; Nd: Y3Al5O12) laser, where the laser intensity was adjusted slightly above the threshold for production of ions. A protein calibration kit (Bruker Daltonics, Bilerica, MA, USA) with known mass values of proteins was used for calibration. The mass variation between 3000 and 8000 Da was recorded using linear mode with pulse of 104 ns at a voltage of +20 kV. Final spectra were generated through the sum of 300 accumulated laser shots per profile and eight profiles produced per sample, leading to a total of 2,400 laser shots added per spectrum. The list of peaks obtained was exported to Biotyper™ software (Biotyper system, version 3.0) where the final identifications were determined. Identification through Biotyper™ software was based only on the presence or absence of each peak in the spectrum.

Detection of antifungal resistance by MALDI-TOF MS (TSA-MS)

The TSA-MS was performed according to Marinachet al. (2009) with modifications. Protein extracts from the clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* will be obtained from a suspension of 107 CFU / ml, cultured in RPMI medium for 12 h at a temperature of 37 ° C under agitation, after growth was dispensed into microtiter plates containing serial dilutions of Itraconazole and

Voriconazole (8-0.03135 μ g / mL) and maintained at 37°C under agitation for 3h. Suspension in RPMI without addition of antifungal will be used as negative control. The suspensions were washed twice in sterile water and resuspended in 10% formic acid. One microliter of each suspension of fungal cells is dispensed directly in duplicate onto the ring of the polished steel plate (BrukerDaltonics, Bremen, Germany), and then 1 μ L of absolute ethanol and 1 μ L of saturated acid solution α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and 50% acetonitrile; 2.5% trifluoroacetic acid, allowed to dry at room temperature.

Spectral measurements were performed with the equipment (BrukerDaltonics) within a mass variation of 3,000 to 8,000 Da and recorded in positive linear mode (De Carolis et al., 2012). For each experiment, spectra will be obtained from the total of fourteen concentrations of each of the three antifungal and drug free controls, to be imported and analyzed to MALDI Biotyper 3.0 software (BrukerDaltonics; DeCarolis et al., 2012). The MALDI Biotyper tool named Compound Correlation Index (ICC) was used as a statistical method to analyze the relationship between the spectra (Degand et al., 2008).

The crude spectra will be divided into equal dose intervals (417 Da each) and the composition of cross correlations and auto correlations of all intervals in terms of geometric means was used as a parameter of distance between the spectra (Vella et al. , 2013). ICC values close to one represent high spectrum compliance, while values around zero indicate a clear diversity among the spectra (Vella et al., 2013).

The results were visualized in a correlation matrix and translated into a "heat map", where closely related spectra were identified in "warm" colors and unrelated spectra in cold colors, based on their high and low ICC values, respectively. Then, the spectral peak sensitivity of each concentration was compared against maximal and drug free concentration. Finally, it is possible to determine the minimum concentration to alter the profile for the evaluated antifungal. A value defined as the lowest drug concentration at which a spectral peak is similar to that observed at the maximum concentration than the observed spectral peak at the absence of drug (De Carolis et al, 2012).

Results

In Vitro sensitivity test for antifungals

The in vitro antifungal susceptibility test was performed with two antifungals, Itraconazole and Voriconazole, using the M38-A2 protocol (CLSI, 2008), compared to 21 *Aspergillus fumigatus* that developed in BDA medium. All *Aspergillus fumigatus* (100%) were sensitive to Itraconazole; For Voriconazole, ten (47.61%) were sensitive, seven (33.33%) were dose-dependent susceptible and two (9.52%) isolates showed resistance. All sensitivity tests were performed in duplicate for each *Aspergillus fumigatus*.

Proteomic analysis

The identification by MALDI-TOF MS occurred through the obtained spectra that were analyzed by an algorithm, which compared the raw spectra with the spectra of the database Biotyper™ version 3.1 (Bruker Daltonics, Germany / USA) that identified at species level all tested isolates of *Aspergillus fumigatus* with a score ≥ 2.0 . When the identification presented a score below 2.0, a new protein extraction of the isolate was performed to confirm the result.

Detection of resistance by maldi-tof MS

All twenty-one *Aspergillus fumigatus* were tested against eleven different concentrations of each of the two drugs (Itraconazole and Voriconazole), totaling 22 different experimental conditions by fungi. The analyzes were performed in duplicate. Detection was performed through the combination of the CLSI-standardized Antifungal Susceptibility Test and the Mass Spectrometry Antifungal Susceptibility Test. Similar conditions of inoculum preparation and incubation temperature were used for the twenty *Aspergillus fumigatus* evaluated as described by the CLSI in order to allow a better comparison between the two methods.

When comparing the two methodologies, the following results were obtained: 1) MALDI-TOF for voriconazole showed 10 sensitive samples (55%), a resistant sample (5%) and 5 samples obtained dose-dependent concentrations (27%), whereas by CLSI, 9 samples were sensitive (50%),

2 resistant samples (11%) and 6 samples were given dependent doses (33%). MALDI-TOF for itraconazole was summarized with 16 *Aspergillus fumigatus* sensitive (88%) and 2 samples obtained dose-dependent concentrations (11%), whereas for the CLSI 18 sensitive samples (100%) were obtained.

Discussion

The rapid and correct detection of resistance of species of *Aspergillus fumigatus* is of great importance for the survival of the patients and mainly for implantation of effective measures for the control of the disease. Mass spectrometry has been proposed as a promising alternative, reducing the time for resistance detection and identification of the pathogen, thus reducing medical errors regarding drug use. The isolates used in this study were derived from the URM (UFPE) as well as environmental samples. As expected, the TSA-CLSI base can detect the resistance of an isolate, regardless of the resistance mechanism; However, the resistance detected by MALDI-TOF MS spectra is possible when the amount of modified protein is expressed in cells sufficiently to be discriminated (Medeiros, 2016).

Failure to treat *Aspergillus fumigatus* infection has been causing emerging concerns in several countries because of the high mortality rate associated with this failure, which may be associated with clinical resistance of the pathogen. (Morio et al.2012, Lavergne et al.2015, Wiederhold et al.2016), reported by several authors in several countries, resistance to azole antifungal is being described as a mutation that contains large (Morio et al., 2012) in this present work we have

In this present study, isolates of *Aspergillus fumigatus* did not show resistance to itraconazole, however 2 (9.5%) were resistant to voriconazole (the first report of *Aspergillus fumigatus* resistant to voriconazole reported in Brazil). Thus, suggesting the existence of the mutation in the *cyp51* gene in Brazil and proving the need for future studies to prove this mutation.

Recent studies demonstrate the efficacy of this technique in the study carried out by Vella et al. (2013) who used fungi of the genus *Candida* and demonstrated the possibility of using the MALDI TOF MS technique as an alternative for the rapid identification of possible resistance to antifungal agents. As well as the use of fungi of the genus *Aspergillus* by De carolis et al. (2012) who also suggested that the MALDI TOF technique is an alternative method for the detection of resistance, and consequently its use for routine microbiological diagnoses in hospitals. In the study by De carolis et al. (2012) the fungus is exposed to the drug for 15 hours, in the present study it was possible to reduce the exposure time of *Aspergillus fumigatus* to the drug for 3 hours.

Lavergne et al. (2015) reported that the mutation in the *cyp51* gene confers to the fungus resistance to azole drugs, when it reported a case of a 23-year-old man with cystic fibrosis, this patient had elevated IgE and IgE ispecific indexes for aspergillosis, and was diagnosed with bronchopulmonary aspergillosis, and the isolated strain of this patient had high indices of resistance to voriconazole (MIC > 32 µg / ml) and itraconazole (MIC > 8 µg / ml). mutation in the *cp51* gene. Morio et al. (2012) also reached this conclusion when he tested 142 sputum and aveolar bronchial lavage samples from 50 patients, thus isolating 85 strains of *Aspergillus fumigatus*, proving that on average 9.4% of the isolated microorganisms were resistant to azole drugs. Optimizations for future application of the tests should be performed, as there may be some failure to standardize the amount of proteins exposed, thus proteomic changes must be quantitatively detected by MALDI-TOF MS, since some yeasts after exposure to the drugs may not significantly express changes in the protein profile (Marinach et al., 2009; Carolis et al., 2012, Vella et al., 2013).

For the 21 samples of *Aspergillus fumigatus* analyzed against the two formulations of the azolic drugs, it was possible to observe the minimum change in the spectral profile for the majority, however some results were not so suggestive, although each drug already has its breakpoints defined by the standard test of the CLSI.

The reproducibility of TSA by MALDI-TOF MS is still somewhat laborious; however, it is reliable when compared to TSA by CLSI. In addition, further testing with other pathogenic filamentous fungi associated with other drugs is required, so that TSA by MALDI-TOF MS is routinely used in microbiology laboratories (Vella et al., 2013).

References

Latgé, Jean-Paul. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends in microbiology, v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.

- WU, Junqi et al. Molecular docking, design, synthesis and antifungal activity study of novel triazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 143, p. 1840-1846, 2018.
- SALES, Maria da Penha Uchoa. Aspergillosis: from diagnosis to treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1238-1244, 2009.
- Russcher, A., van Paassen, J., Dofferhoff, P. A., & Kuijper, E. J. (2014). High azole resistance rate of *Aspergillus fumigatus* at intensive care unit in a Dutch tertiary hospital. *Ned Tijdschr Med Microbiol*, 22, S121.
- Marinach, C., Alanio, A., Palous, M., Kwasek, S., Fekkar, A., Brossas, J. Y., ... & Datry, A. (2009). MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics*, 9(20), 4627-4631
- DE Carolis, Elena et al. (2012). Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection*, v. 18, n. 5, p. 475-484.
- Degand, N., Carboneille, E., Dauphin, B., Beretti, J. L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I. & Ferroni, A. (2008). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3361-3367.
- Vella, A., De Carolis, E., Vaccaro, L., Posteraro, P., Perlin, D. S., Kostrzewa, M., ... & Sanguinetti, M. (2013). Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of clinical microbiology*, 51(9), 2964-2969.