



Joana Rita dos Santos Valente

Licenciada em Biologia

Estudo molecular de estirpes de *Aspergillus fumigatus* isolados em aviários e em aves diagnosticadas com aspergilose. Possíveis implicações na Saúde Pública.

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Raquel Filipa Pinheiro Sabino, Posdoutoranda, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Co-orientador: Profa. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Vogais: Doutor Luís Filipe Sanches Goulão, Investigador Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical;

Profa. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014



Joana Rita dos Santos Valente

Licenciada em Biologia

Estudo molecular de estirpes de *Aspergillus fumigatus* isolados em aviários e em aves diagnosticadas com aspergilose. Possíveis implicações na Saúde Pública.

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Raquel Filipa Pinheiro Sabino, Pós-doutoranda, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Co-orientador: Profa. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Benilde Simões Mendes, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Vogais: Doutor Luís Filipe Sanches Goulão, Investigador Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical;

Profa. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa



Setembro 2014

Estudo molecular de estirpes de *Aspergillus fumigatus* isolados em aviários e em aves diagnosticadas com aspergilose. Possíveis implicações na Saúde Pública.

Copyright © Joana Rita dos Santos Valente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, FCT-UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A concretização de uma tese de mestrado, enquanto processo individual, não requer apenas dedicação, entusiasmo e força de vontade, apesar de se revelarem bons suportes. Aprendizagem de novos conhecimentos, alcance de objetivos propostos e formação pessoal englobam um conjunto de pessoas dispostas para que tal aconteça. Desta forma, transcrevo aqui os meus profundos e sinceros agradecimentos, a todos aqueles que contribuíram para a realização de mais uma etapa da minha formação académica.

Desde já, agradeço, à minha orientadora, Doutora Raquel Sabino, pela oportunidade e privilégio de realizar este projeto no grupo de Micologia, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, assim como, toda a sua disponibilidade, apoio, paciência, instrução, confiança e gentileza.

Quero também agradecer, a toda a equipa do grupo de Micologia, pela receptividade, simpatia e presteza, que possibilitou a realização deste projeto; á Dra. Cristina Veríssimo pelas sugestões dadas, prontidão e ensinamentos; á Dra. Helena Simões também pelos seus ensinamentos e simpatia; ao Dr. João Brandão pelos seus ensinamentos; à Sra. D. Assunção António e Sra. D. Paula Grilo pelo apoio e simpatia; á Soraia, Susana e Célia pelo companheirismo e simpatia.

Igualmente, quero agradecer á minha co-orientadora e Professora de Mestrado, Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, pela disponibilidade para me integrar no seu grupo de orientandos, assim como o apoio, presteza e formação académica.

Agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais, irmão e sua namorada, pelo incentivo, carinho e confiança transmitidos.

Agradeço também a todos os meus amigos, de longa data, da Licenciatura, de Mestrado e da Residência da FCT- UNL pelo apoio, amizade e companheirismo.

Por tudo, Muito Obrigada !

Aspergillus fumigatus é um agente etiológico fúngico disperso mundialmente por variados nichos ecológicos e o fungo patogénico que mais promove doenças respiratórias em aves e pessoas imunocomprometidas. A exposição a conídios deste fungo pode causar aspergilose invasiva, a doença mais frequente em variadas espécies ornitológicas, com elevada mortalidade e morbidade. Além disso, esta doença é um dos fatores que mais contribui para significativas perdas económicas na indústria avícola, bem como perdas de biodiversidade, em espécies selvagens. Neste contexto, *Aspergillus fumigatus*, que pertence ao complexo *Fumigati*, desenvolve-se facilmente no trato respiratório de aves e humanos, no solo, nas camas e ninhos das aves. Tem uma fácil aerolização e contamina os alimentos nos ambientes avícolas e produz uma micotoxina, gliotoxina, que invade o trato respiratório e é considerada como fator de virulência. A identificação exacta dos isolados fúngicos provenientes de aves é muito importante, para percepção da sua epidemiologia em aves, para pesquisa de espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus*, que podem desencadear as mesmas patologias mas apresentar diferentes resultados às mesmas terapêuticas antifúngicas. A análise molecular efectuada neste estudo permitiu atingir estes objectivos. Como tal, 108 isolados provenientes de diversificadas aves foram analisados por ferramentas moleculares para determinar a presença de espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus* e observar os seus diferentes perfis de susceptibilidade antifúngica ao itraconazol. Não foram detectadas espécies crípticas, mas foi possível corrigir duas identificações morfológicas erradas ao nível do complexo.

Apesar da emergência da resistência adquirida por *Aspergillus fumigatus* ao itraconazol, estar a emergir, não foram detectadas estirpes resistentes neste estudo. O conhecimento molecular deste agente etiológico responsável pela aspergilose invasiva em aves é importante para auxiliar a escolha de uma melhor terapêutica e futuros tratamentos para infeções oportunistas fúngicas, contribuindo assim para menos perdas na produção avícola e para uma melhoria da Saúde Pública.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; aspergilose invasiva; aves; espécies crípticas; estudos moleculares; terapias antifúngicas

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is an etiologic fungal agent worldwide widespread in different ecologic niches. It is a pathogenic fungus that causes respiratory diseases in birds and immunocompromised hosts. Exposition to its conidia can cause invasive aspergillosis, the most frequent disease in several avian species, causing high morbidity and mortality. Furthermore, this disease is one of the factors that most contributes for significant economic losses in poultry industries and also to biodiversity losses in wild species. *Aspergillus fumigatus*, which belongs to the complex *Fumigati*, grows easily in the avian and human respiratory tract, but also in soil, avian litters and nests. Due to its easy aerolization, it contaminates feedstuffs in poultry farms. It also produces a mycotoxin, gliotoxin, which helps in respiratory tract invasion and is considered as a virulence factor. Exact identification of the fungal isolates collected from birds is very important for understanding its epidemiology in birds, also researching *Aspergillus fumigatus* cryptic species. These might trigger the same pathologies, but exhibit different behaviours under the same antifungal therapeutics. The molecular analysis performed in this study allowed us to achieve these objectives. As such, 108 different avian isolates were analyzed by molecular tools in order to determine the presence of *Aspergillus fumigatus* cryptic species and to observe their antifungal susceptibility profiles to itraconazol. No cryptic species were found, but it was possible to identify two misidentifications at species complex level. Despite the emergence of *Aspergillus fumigatus* strains showing acquired resistance to itraconazole, no resistant strains to this antifungal were detected in this study. Molecular knowledge of this etiologic agent is important to choose therapeutic approaches and to implement protective or corrective measures, thus contributing to lower losses in poultry production and consequently, to improvements in Public Health.

Key-words: *Aspergillus fumigatus*; invasive aspergillosis; birds; cryptic species; molecular studies; antifungal drugs therapies

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS e SÍMBOLOS.....	xvii
I. OBJETIVO	1
II. INTRODUÇÃO	3
1. Género <i>Aspergillus</i>	3
1.1. Etiologia de <i>Aspergillus</i>	4
1.2. Características morfo-fisiológicas do género <i>Aspergillus</i>	6
1.3. <i>Aspergillus</i> do complexo <i>Fumigati</i>	8
1.3.1 Distribuição e epidemiologia de <i>Aspergillus</i> do complexo <i>Fumigati</i>	9
1.3.2 Estudo polifásico de isolados do complexo <i>Fumigati</i>	9
1.3.3 <i>Aspergillus fumigatus</i> sensu stricto.....	11
1.3.4 Espécies crípticas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
1.3.4.1 Identificação molecular de espécies crípticas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
2. Infecções causadas por <i>Aspergillus</i> spp.....	16
2.1 Aspergilose Invasiva por <i>Aspergillus</i> complexo <i>Fumigati</i>	17
2.1.1. Aspergilose Invasiva Aviária	19
2.1.2. Distribuição e epidemiologia da Aspergilose Invasiva Aviária	19
2.3. Metodologias de Diagnóstico de AI e detecção de <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
3. Tratamento	24
3.1 Antifúngicos.....	25
3.2 Resistência	27
3.2.1. Mecanismo de Resistência.....	28
III. MATERIAL E MÉTODOS	31
1. Identificação de espécies de 108 isolados de <i>Aspergillus</i>	32
(a) Isolamento e cultura em meio de malte com Cloranfenicol	32
(b, c) Análise Macro e Microscópica dos isolados de <i>Aspergillus</i>	35
(d, e) Suspensão dos esporos em PBST com Glicerol e PBS, com conservação a -70°C e 4°C .	35
(f) Extração de ADN	35
(g) Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR).....	35
i. Protocolo de PCR por <i>primers</i> ITS, β -tubulina e calmodulina.....	36
ii. Otimização das condições de PCR	39
(h) Electroforese em Gel de Agarose	40

(i) Purificação dos Produtos de PCR.....	40
(j) Sequenciação e Sequenciação por <i>Método de Sanger</i>	41
(j, k, l) Análise nucleotídica no <i>Chromas Lite</i> e Cruzamento de dados obtidos no <i>Chromas Lite</i> com as bases de dados <i>CBS Database</i> e <i>BLAST NCBI</i>	43
2. Testes de Suscetibilidade a Antifúngicos.....	44
a) Elaboração do meio de cultura de Agar - RPMI 1640 com ITC	44
b) Implementação dos testes de suscetibilidade sobre as estirpes selecionadas segundo o local de recolha/colheita	45
IV. RESULTADOS.....	47
1. Identificação de <i>Aspergillus</i> e deteção de espécies crípticas	47
2. Testes de Suscetibilidade a Antifúngicos	57
V. DISCUSSÃO.....	61
1. Identificação de <i>Aspergillus</i> e deteção de espécies crípticas	61
2. Antifúngicos e Vertente alimentar	66
VI. CONCLUSÃO.....	73
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS	75
VIII. REFEREÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
IX. ANEXO	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Esquematização das características microscópicas utilizadas na identificação de <i>Aspergillus</i>	7
Figura 2.2- Representação individual da cabeça aspergilar das espécies de <i>Aspergillus</i> de interesse clínico. a) <i>Aspergillus flavus</i> (conidióforo unisseriado); b) <i>Aspergillus flavus</i> (conidióforo bisseriado); c) <i>Aspergillus fumigatus</i> ; d) <i>Aspergillus nidulans</i> ; e) <i>Aspergillus niger</i>	8
Figura 2.3- Composição estrutural da parede celular de fungos de <i>Aspergillus</i>	8
Figura 2.4- Análise filogenética baseada nas sequências calmodulina de <i>Aspergillus</i> complexo <i>Fumigati</i> e construída segundo o algoritmo Neighbour-joining. Os valores acima de 70% são indicados e representam o método de <i>bootstrap</i>	10
Figura 2.5- Colônia de <i>Apergillus fumigatus</i> em MEA, após crescimento de 2 dias, a 27,5°C.	12
Figura 2.6- Técnica de PCR para amplificação do ADN.	15
Figura 2.7- Esquematização da região do ITS.....	15
Figura 2.8- Método de <i>Sanger</i> . Após PCR os produtos de fragmentos de ADN, complementados com os respectivos fluorocormos, atravessam um capilar através do qual passa um feixe luminoso que permite a obtenção da sequência de ADN.....	16
Figura 2.9- Modo de infecção por inalação de conídios de <i>Aspergillus fumigatus</i>	18
Figura 2.10– Anatomia do sistema respiratório das aves.	20
Figura 2.11– Patologias por <i>Aspergillus fumigatus</i> . A) Lesões nos sacos aéreos e difusão no sistema respiratório de granulomas de tons brancos em <i>Gallus gallus</i> ; B) Aspergilose em <i>Gallus gallus</i> , com granulomas distribuídos por toda a cavidade respiratória e observação de granulomas nos sacos aéreos; C) Lesões dérmicas localizadas na cabeça e costas de ave doméstica	21
Figura 2.12- Ovos contaminados pela presença de <i>Aspergillus fumigatus</i>	23
Figura 2.13– Evolução dos antifúngicos disponíveis de 1950 até 2000 (L-Amb: Anfotericina lipossomal; 5-FC: 5-Fluocitosina; ABCD: Anfotericina B Dispersão coloidal; ABLC: Anfotericina complexo lipídico.....	25
Figura 2.14– Esquema representando dos mecanismos de ação dos antifúngicos no tratamento de AI, com evidência de mecanismos de inibição da produção de ergosterol e β -(1-3)-glucano, pelos respectivos antifúngicos.	27
Figura 2.15- Mecanismos de resistência de <i>Cyp51A</i> de <i>Aspergillus fumigatus</i> sob ação de antifúngicos azóis.....	28
Figura 3.1- Purificação dos produtos de PCR por <i>ExoSAP-IT</i>	41
Figura 3.2– Análise computacional através da sequenciação surgindo ordenadamente por cor de fluorescência. A sequência da cadeia molde pode então ser lida. Os nucleótidos denominados com N que não puderam ser classificados	43

Figura 4.1- Ilustração do fungo patogénico <i>Aspergillus fumigatus</i> em cultura de Malte com Cloranfenicol, após crescimento de 3 dias, a 27,5°C. A1) Micélio aéreo <i>A. fumigatus</i> ; A2) Micélio vegetativo; B) Morfologia microscópica da estrutura de <i>Aspergillus fumigatus</i> por observação ao microscópio digital com ampliação de 400x.....	47
Figura 4. 2- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de <i>Aspergillus</i> pelos <i>primers cmd5</i> e <i>cmd6</i> (poços 1-15). Poço 1- Marcador ADN <i>Gene Ruler</i> ™ (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 15 - Produto PCR com ADN de <i>Aspergillus</i> ; Retângulo verde – região dos 500 pb amplificada; Retângulo vermelho – região não amplificada; Retângulo azul- resíduos da PCR.....	48
Figura 4. 3- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de <i>Aspergillus</i> pelos <i>primers BT</i> (poços 1-11). Poço 1- Marcador ADN <i>Gene Ruler</i> ™ (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 11 - Produto PCR com ADN de <i>Aspergillus</i> ; Retângulo vermelho – região amplificada se hibridização não específica do <i>primer BT</i>	49
Figura 4.4- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de <i>Aspergillus</i> pelo <i>primer BT</i> (poços 1-10). Poço 1- Marcador ADN <i>Gene Ruler</i> ™ (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 10 - Produto PCR com ADN de <i>Aspergillus</i> . Retângulo vermelho – região não amplificada do <i>primer BT</i>	49
Figura 4.5- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de <i>Aspergillus</i> pelos <i>primers cmd5</i> e <i>cmd6</i> (poços 1-14). Poço 1- Marcador ADN <i>Gene Ruler</i> ™ (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 14 - Produto PCR com ADN de <i>Aspergillus</i> ; Retângulo vermelho – região não amplificada do <i>primers cmd5</i> e <i>cmd6</i>	50
Figura 4.6- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de <i>Aspergillus</i> pelos <i>primers cmd5</i> e <i>cmd6</i> (poços 1-20). Poço 1- Marcador ADN <i>Gene Ruler</i> ™ (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 20 - Produto PCR com ADN de <i>Aspergillus</i> ; Retângulo verde – região dos 500 pb amplificada.	51
Figura 4.7- Electroferograma parcial do gene da calmodulina de uma estirpe de <i>Aspergillus</i> , obtido através do programa informático <i>Chromas Lite</i> , expondo os nucleótidos, segundo a sua cor de fluorescência e registo.	51
Figura 4.8- Teste de Suscetibilidade em placas de Petri com meio agár - RPMI 1640 com ITC com as estirpes inoculadas. A) Placas de Petri na fase de pré-inoculação das estirpes. B) Placas de Petri após uma semana de inoculação (27,5°C), retângulo verde evidenciando o controlo positivo assinalado....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1- Proveniência e descrição das micotoxinas de <i>Aspergillus</i>	6
Tabela 2.2- Espectro de doenças clínicas geradas por <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
Tabela 2.3- Sistema imunitário ornitológico.	22
Tabela 2.4- Fungicidas IsD agrícolas no mercado (compostos com atividade contra <i>Aspergillus fumigatus</i>).	29
Tabela 3.1a)- Discriminação de características das espécies em estudo e proveniência das estirpes clínicas.	32
Tabela 3.1b) Proveniência das estirpes ambientais.	34
Tabela 3.2- Condições reacionais de PCR para protocolos de <i>primers</i> ITS, β -tubulina e calmodulina.	36
Tabela 3.3- Composição das misturas reacionais para amplificação da região ITS.	37
Tabela 3.4- Condições de PCR para amplificação da região ITS.	37
Tabela 3.5- Composição das misturas reacionais para amplificação do gene que codifica a β -tubulina.	38
Tabela 3.6 -Condições de PCR para amplificação do gene que codifica a β -tubulina.	38
Tabela 3.7- Composição das misturas reacionais para amplificação do gene que codifica a calmodulina	39
Tabela 3.8- Condições de PCR para amplificação do gene que codifica a calmodulina.	39
Tabela 3.9- Condições reacionais de Sequenciação para protocolos de sequenciação utilizando os <i>primers</i> ITS, β -tubulina e calmodulina.	42
Tabela 3.10- Condições de Sequenciação do Produto de PCR para ITS	42
Tabela 3.11- Condições de Sequenciação do Produto de PCR para β -tubulina.	42
Tabela 3.12- Condições de Sequenciação do Produto de PCR para calmodulina.	42
Tabela 4.1- Caracterização das estirpes de <i>Aspergillus</i> , identificação morfológica e molecular das espécies crípticas.	52
Tabela 4.2- Estirpes manipuladas de acordo com os locais de colheita e resultados da suscetibilidade ao meio ao qual foram testadas.	58

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

A. fumigatus *Aspergillus fumigatus*

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARNr Ácido ribonucleico ribossomal

Af *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus sp. Espécie do género *Aspergillus*

Aspergillus spp. Várias espécies do género *Aspergillus*

a_w Atividade da água

BMD Método de microdiluição em meio líquido

BT Beta - Tubulina

CAST *Council for Agricultural Science and Technology*

CDC *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI *Clinical Laboratory Standards Institute*

Cmd Calmodulina

COV Compostos Orgânicos Voláteis

COVM Compostos Orgânicos Voláteis Microbianos

ddNTP Didesoxinucleótidos

DMSO Dimetilsulfóxido

dNTP Trifosfato de desoxinucleótido

EPA *Environmental Protection Agency*

EUCAST *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EUCAST-AFST *The European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing - Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing*

FAO *Food and Agriculture Organization*

FDA *Food and Drug Administration*

HR Humidade relativa

HSE *Health and Safety Executive*

INSA Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ITC Itraconazol

ITS *Internal Transcribed Spacers*

KOH Hidróxido de Potássio

McF *McFarland*

MEA *Malt Extract Agar*

MIC Concentração Mínima Inibitória

MOPs Ácido 4-morfolinopropanosulfónico ou Ácido 3- (N-morfolinopropanosulfónico)

pb Número de pares de bases de resíduos de nucleótidos (*base pairs*)

PBS Tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PBST *Phosphate Buffered Saline with Tween*

PCR Reação de cadeia catalisada pela enzima polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH Potencial hidrogeniônico

REV *Reverse*

RPMI 1640 *Roswell Park Memorial Institute 1640*

STPD Síndrome Tóxica das Poeiras Orgânicas

Taq *Thermus aquaticus*

UFC/m³ Unidades Formadoras de Colônias por metro cúbico

USDA *United States Departemant of Agriculture*

UTIQ Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA

V Volts

WHO *World Health Organization*

I. OBJETIVO

O presente trabalho envolve o estudo de um microrganismo patogénico - *Aspergillus*, mais concretamente *Aspergillus fumigatus*. Este estudo enquadra-se num contexto clínico, ambiental e alimentar. Discutem-se possíveis vias de transmissão e o seu impacto no ambiente, na agricultura, veterinária e Saúde Pública. A contextualização do estudo sobre este microrganismo patogénico, é corroborada por uma caracterização polifásica, que engloba a microbiologia molecular e convencional, determinando também a suscetibilidades a alguns antifúngicos.

Os objetivos específicos deste estudo compreenderam: i) a pesquisa de espécies crípticas em isolados de *Aspergillus* identificados como pertencentes ao complexo *Fumigati*, recolhidos em aves com aspergilose e do ambiente circundante; ii) a determinação da susceptibilidade aos azóis de alguns destes isolados, de forma a conhecer uma possível emergência de resistência a este grupo de antifúngicos.

Este estudo compreende a análise de vários parâmetros relacionados com *Aspergillus fumigatus*, especificamente a pesquisa de espécies similares a este, segundo apoio complementar de técnicas moleculares. Além disso, a partir do número significativo de amostras isoladas de diversas espécies ornitológicas (n=108) disserta-se sobre possíveis relações espaciais (diversidade de ecossistemas), inter e intraespecíficas. A partir dos resultados obtidos, pretende-se discutir diferentes contextos envolvendo *A. fumigatus* e nomeadamente afinidade da amostragem de avifauna (aves domésticas a aves selvagens) em abrigar este microrganismo; abordando os factores extrínsecos e intrínsecos do *habitat* da avifauna, mas também de toda a envolvência dos ambientes, quer interiores quer exteriores que potenciam o desenvolvimento deste agente; relações na interceção com a cadeia alimentar; patologias clínicas e veterinárias e metabolismos e requisitos de disseminação. Ao longo deste estudo será discutido o papel que o ambiente tende a ter como fator responsável por grande parte das questões pontuais apresentadas e a sua influência em contextos clínicos e alimentares. Perante isto, o conhecimento mais detalhado sobre esta espécie fúngica, sobre as suas condições e relações de proximidade e adaptação a diferentes espécies animais e ambientes, e a determinação ou identificação de características que poderão estar na base de possível virulência são factores essenciais para uma melhor prevenção das infeções causadas por *Aspergillus fumigatus*.

1. Género *Aspergillus*

O género *Aspergillus* possui uma grande diversidade de espécies, cerca de 250, com um vasto leque de impacto na Saúde Pública e com reconhecidos interesses clínicos (patogénicos oportunistas), industriais e biotecnológicos (*Aspergillus oryzae*, por exemplo, é utilizado em muitos processos de fermentação) e portanto, são grandes alvos de investigação. As espécies integrantes deste género são descritas como cosmopolitas, saprófitas, distribuídas mundialmente e podem ser encontradas em nichos ambientais muito diversificados. Estas espécies podem ser encontradas no ar, água, solo, vegetação em decomposição, alimentos para animais, em resíduos de vegetação, nos animais e até ambientes interiores (Latgé, 1999; Latgé, 2001; Pattron, 2006; Perrone *et al.*, 2007; Geiser *et al.*, 2009; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2012; Gavier-Widén *et al.*, 2012).

Até recentemente, com as regras da nomenclatura, as formas sexuadas, conhecidas como estados teleomórficos prevalecem sobre os estados anamórficos, formas assexuadas. Em 2011, na reunião científica intitulada “One Fungus One name” foi decidido que independentemente do estado (sexuado ou assexuado) o nome atribuído seria sempre apenas um (Taylor, 2011). A descrição imposta em 1965, por Raper e Fennell, originalmente dividida em subgéneros e grupos, atualmente apresenta uma classificação que substitui o "grupo" por "secção” ou “complexo de espécies” e este, por sua vez, é dividido nas diferentes espécies. Estes complexos de espécies englobam espécies muito semelhantes entre si. Esta alteração taxonómica baseia-se numa abordagem polifásica, que considera relevante para a identificação de espécies os dados morfológicos (micro e macroscópicos), fisiológicos, metabólicos e informações de ADN de diferentes regiões genómicas. Deste modo, elementos do grupo *aspergilli* que pertencem ao Reino *Fungi* são considerados componentes da Filo *Ascomycota*, género *Aspergillus*, sendo depois subdivididos em oito subgéneros ou complexos de espécies (*Aspergilli*, *Fumigati*, *Circumdati*, *Candidi*, *Terrei*, *Nidulantes*, *Warcupi* e *Ornati*) e estes em numerosas espécies, cuja identificação se baseia em todos os fatores referidos (Latgé, 1999; Balajee *et al.*, 2009; Geiser *et al.*, 2009; Samson & Varga, 2009; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2012; Gavier-Widén *et al.*, 2012; Krijgsheld *et al.*, 2013). O complexo *Fumigati* tem sido aquele que gera mais interesse clínico e veterinário. Por ser o objecto do estudo apresentado, este complexo será exposto de forma detalhada posteriormente (ponto 1.3).

O género *Aspergillus*, durante a última década, tem sido revisto através de análises moleculares que tencionam perceber de forma mais precisa as relações taxonómicas e filogenéticas presentes neste grupo (Krimitzas *et al.*, 2013). Esta revisão baseia-se, como foi referido, em abordagens polifásicas que incluem dados moleculares, bem como as características morfológicas, fisiológicas e ecológicas. A identificação molecular de espécies de *Aspergillus* é atualmente baseada em sequências das regiões de ADN ribossomal denominadas de ITS (Internal Transcribed Spacers) e também em sequências de genes

que codificam a β -tubulina, calmodulina e actina, entre outras. Os estudos filogenéticos de espécies de *Aspergillus*, auxiliados com estas e outras ferramentas moleculares, tentam decifrar as ambiguidades taxonómicas existentes dentro do género ou complexo de espécies para certificarem a possibilidade de ocorrerem evoluções taxonómicas e serem também detetadas espécies crípticas, que são espécies muito semelhantes morfológicamente e apenas distintas através de dados moleculares (Balajee *et al.*, 2005b; Hong *et al.*, 2005; Geiser *et al.*, 2007; Samson & Varga, 2009; Krimitzas *et al.*, 2013). Para analisar relações de proximidade filogenética de espécies, diminuindo assim a subjectividade de classificação, recorre-se aos marcadores moleculares anteriormente citados e a ferramentas bioinformáticas, de modo a dar ênfase há presença de caracteres comuns e derivados consoante o nível de detalhes nos grupos taxonómicos a estudar.

Presentemente, as infeções invasivas causadas por fungos filamentosos têm aumentado, conquistando uma grande relevância clínica. O número de infeções causadas por *Aspergillus* evoluiu devido à existência de um maior número de pacientes imunodeprimidos, propensos a um maior risco de exposição por parte destes agentes patogénicos oportunistas (Kleinkauf *et al.*, 2013), bem como ao aumento de procedimentos invasivos e antibioterapia intensiva.

1.1. Etiologia de *Aspergillus*

Os *Aspergillus* são designados como organismos eucarióticos, em geral multinucleados, heterotróficos e decompositores por excelência e que eficazmente reciclam o carbono e o azoto, a partir de recursos orgânicos, particularmente de vegetação em decomposição no solo ou da acumulação de compostos, pelo que se consideram fungos ubíquos na natureza. Todas as espécies de *Aspergillus* apresentam uma dispersão eficaz, quer a longas quer a curtas distâncias, devido às numerosas estruturas fúngicas produzidas e metabolicamente ativas. Estas estruturas conhecidas geralmente como esporos e mais especificamente como conídios, fazem do grupo *aspergilli* um dos grupos fúngicos mais dominantes no ar. As suas minuciosas características estruturais favorecem a aerolização e disseminação no ambiente e em qualquer nicho ecológico (Dagenais & Keller, 2009; McCormick *et al.*, 2010; Pasqualotto, 2010; Gavier-Widén *et al.*, 2012; Krijgheld *et al.*, 2013).

Numerosas espécies de *Aspergillus* têm sido reportadas como agentes de infeções oportunistas, devido à sua distribuição em numerosos ambientes (Patron, 2006; Falvey & Streifel, 2007; Dagenais & Keller, 2009; Samson & Varga, 2009). Os integrantes deste género podem apresentar impactos negativos para os humanos e animais, sendo considerados patogénicos; impactos no sector agrícola e ambiental, quando dizem respeito a contaminações de culturas e contaminações ambientais, respetivamente. No entanto, também apresentam impactos positivos, quando os seus metabolitos e produtos enzimáticos são utilizados em aplicações biotecnológicas, como por exemplo na indústria farmacêutica, alimentar, entre outras (Frisvad *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2007).

O interesse clínico neste grupo dos *aspergilli* advém do fato de possuírem um vasto conjunto de espécies patogénicas quer para humanos como para animais induzindo ao aparecimento de doenças. As espécies de maior interesse são *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger* (Latgé, 1999; Balejee *et al.*, 2007; Dagenais & Keller, 2009; Gavier-Widén *et al.*, 2012; Krijghsheld *et al.*, 2013). As vias de transmissão das infeções por *Aspergillus* podem ocorrer por contato direto (inalação ou contato dérmico), através de aerossóis do agente patogénico ou indiretamente, através de infeções alimentares, aquando as pessoas ou animais são expostas às suas micotoxinas (Bennett & Klick, 2003).

As micotoxinas são metabolitos secundários dos fungos, ou seja, metabolitos não essenciais ao crescimento e desenvolvimento normais destes microrganismos, de baixo peso molecular e de diversificadas estruturas químicas e propriedades biológicas (Leung *et al.*, 2006). Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), 25% das culturas mundiais são afetadas por micotoxinas, emergindo como preocupação mundial na área de Segurança Alimentar, Saúde Pública e Animal e com acentuadas perdas económicas e de produção (Hussein & Brase, 2001; Bhat *et al.*, 2010; Zain, 2011). A sua proveniência advém de distintas espécies fúngicas que podem estar presente nos alimentos e neste caso dá-se realce a *Aspergillus* (Tabela 2.1). Numerosos fatores influenciam a sua produção, tais como: distribuição geográfica; diversidades de culturas; práticas agronómicas e condições agroclimáticas favoráveis, como temperatura e humidade relativa (HR), em fases de pré e pós-colheita das culturas alimentares, precipitação, vento e insetos, enquanto vetores de dispersão, e até a água de abastecimento para regadio e alimentação animal, pois os níveis de segurança da água na agricultura pode ser consideravelmente menor e representar uma potencial via de contaminação (Paterson, 2006; Wang *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2010; Zain, 2011).

Assim, estes metabolitos secundários, enquanto componentes tóxicos e patológicos, originando efeitos agudos ou crónicos, para a Saúde Humana e Animal, contaminam as culturas e deterioram alimentos, em fases distintas, sendo designados como micotoxicoses, o "veneno derivado de produtos naturais" com análogas patologias à exposição a pesticidas ou resíduos de metais pesados (Melo dos Santos *et al.*, 2002; Bennett & Klick, 2003; Perronel *et al.*, 2007; Viegas *et al.*, 2014).

Tabela 2.1- Proveniência e descrição das micotoxinas de *Aspergillus* (Adaptado de Cast, 2003; Frisvad *et al.*, 2007; Huffman *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2010).

Toxinas	Doença	Espécies de Fungos	Dispersão	Alimentos contaminados	Seres Afetados	Classificação segundo IARC ^a
Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂)	Aflatoxicomicose	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Mundial	Amendoins, milho, soja, algodão, arroz, sorgo, milho, nozes, figos	Todas as aves de aviários, suínos e bovinos	Grupo 1 - Cancerígeno para os Humanos
	Síndrome hemorrágica das aves	<i>A. flavus</i> , <i>A. clavatus</i>	Mundial	Grão e farinhas	Aves de aviários e outras aves	Grupo 1 - Cancerígeno para os Humanos
Ocratoxina	Ocratoxicose	<i>A. ochraceus</i>	Mundial	Cevada, milho, aveia, trigo, uvas, frutos secos	Aves de aviário e suínos	Grupo 2B - Provável cancerígeno para os Humanos
Verruculogeno, Fumitremorgenos	Síndrome ataxia tremorgénos	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. clavatus</i>	Mundial	Alimentos com esporos de fungos	Todas as espécies animais	

De acordo, com a Tabela 2.1, as micotoxinas produzidas por *Aspergillus* podem observar-se em todo o mundo, sendo um problema que afeta variados setores, desde a suinicultura, avicultura e até agricultura. São adquiridas pelo Homem e animais, após ingestão, inalação ou absorção, causando sintomas que vão desde problemas gastrointestinais, diarreia e vômitos, até sintomas mais agressivos, como imunossupressão, lesões dérmicas, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, genotoxicidade e até morte para seres mais sensíveis (Melo dos Santos *et al.*, 2002; Bennett & Klick, 2003; Frisvad *et al.*, 2007; Bhat *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2010). No caso de *Aspergillus fumigatus*, uma das suas micotoxinas mais relevantes, a gliotoxina, pode ser encontrada como contaminante de matrizes alimentares de animais, tendo maior afinidade por gramíneas (milho, trigo, cevada, centeio, arroz, sorgo) do que por matrizes de leguminosas. A presença desta micotoxina enquanto contaminante, deve-se à já referida facilidade de dispersão dos seus esporos pelo ambiente e aumentando o risco de exposição a este, quer das aves de aviários, aves selvagens e humanos, enquanto trabalhadores, indivíduos saudáveis ou indivíduos imunossuprimidos (Boudra & Morgavi, 2005; Pena *et al.*, 2010).

1.2. Características morfo-fisiológicas do género *Aspergillus*

O género *Aspergillus* é composto por uma enorme variedade de espécies, distintas por análise macro e micromorfológica (Latgé, 1999; Latgé, 2001). A análise macroscópica baseia-se na análise das colónias fúngicas, observando-se pela sua taxa de crescimento, aspeto e cor (frente e reverso), variável

^a IARC - International Agency for Research on Cancer

de espécie para espécie e relacionada, por vezes, com a manifestação de formas sexuadas (observáveis microscopicamente). O estudo das características microscópicas de uma dada cultura, indispensáveis à identificação da espécie, deve ter em conta determinadas estruturas específicas da constituição dos *Aspergillus* (Figura 2.1) tais como o conidióforo, a vesícula, as fiálides e dois tipos de propágulos produzidos em *Aspergilli*, os conídios formados por mitose e/ou os ascósporos formados por meiose (nem sempre produzidos) (Latgé, 1999; Ferreira & Sousa, 2000).

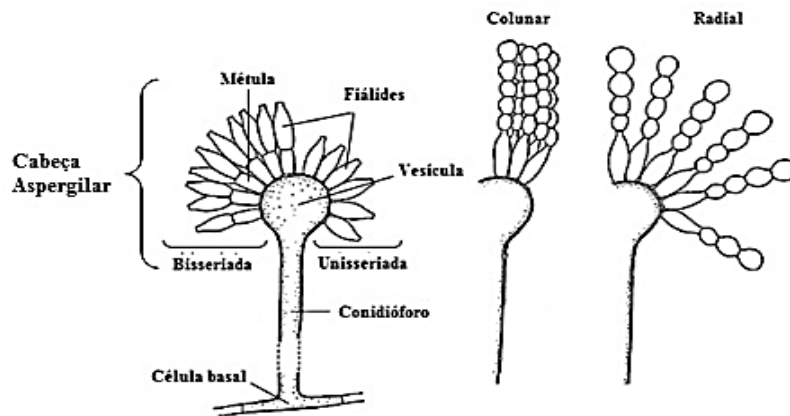


Figura 2.1- Esquemática das características microscópicas utilizadas na identificação de *Aspergillus* (Adaptado de Gavier-Widén *et al.*, 2012).

O fungo desenvolve um micélio formado por extensões apicais de células ramificadas, hifas septadas, dentro e fora do substrato nutritivo. A diferenciação destas hifas produz estruturas chamadas conidióforos. Estas estruturas são alongadas e assetadas e apresentam dimensões variáveis entre 40 a 300 μm , consoante a espécie. Os conidióforos podem exibir uma forma direita, sinuosa, lisa ou rugosa e uma cor própria (hialinos ou pigmentados). Na parte terminal desta estrutura, surge a vesícula, que pode ter várias formas, desde esférica, elíptica ou alongada pode ser hialina ou possuir a pigmentação. Inseridas nesta estrutura, encontram-se as células conidiogénicas, chamadas de fiálides, que dependendo da espécie podem ser uni ou bisseriadas (métula). Estas células unitárias são separadas e cada uma origina os conídios encontrados no seu *terminus*. A formação repetida de conídios produzidos por mitose a partir das fiálides resulta numa cadeia de conídios. Estes conídios podem ter dimensões de 2-5 μm , formas redondas ou alongadas, ornamentação da sua parede e cor variada que irá depender, mais uma vez, da espécie, e que também influenciará o tom da colónia. O conjunto da vesícula, fiálides e conídios denomina-se de cabeça aspergilar, cujas dimensões e cor são portanto indispensáveis para a identificação, dado que são variáveis, dependendo da espécie (Figura 2.2). Relativamente aos propágulos resultantes de meiose, os ascósporos, podem ser encontrados no interior de formas globulosas de dimensões entre 100 -300 μm designadas como cleistótecios (Latgé, 1999; Ferreira & Sousa, 2000; Pasqualotto, 2010; Gavier-Widén *et al.*, 2012).

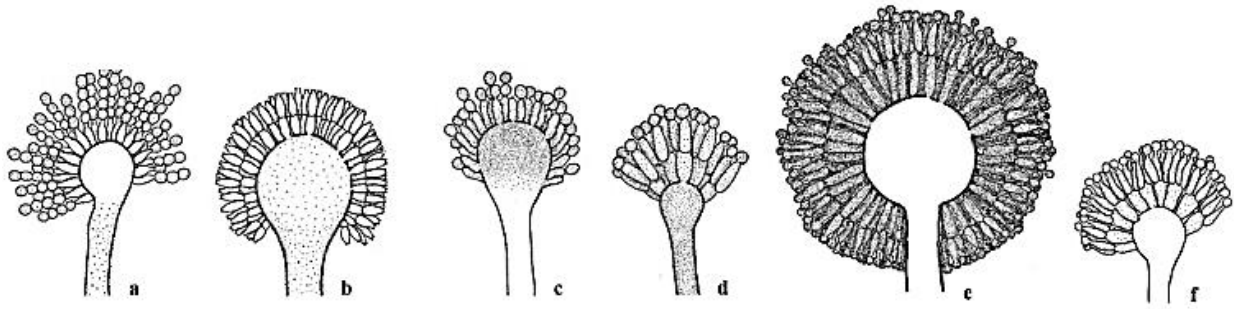


Figura 2.2- Representação individual da cabeça aspergilar das espécies de *Aspergillus* de interesse clínico. a) *Aspergillus flavus* (conidióforo unisseriado); b) *Aspergillus flavus* (conidióforo bisseriado); c) *Aspergillus fumigatus*; d) *Aspergillus nidulans*; e) *Aspergillus niger* (Adaptado de Pasqualotto, 2010).

A composição celular da parede fúngica pode variar entre diferentes isolados, dependendo das condições e fases de crescimento e apresenta uma complexa rede, tendo como base estrutural as glicoproteínas, glucano e quitina, sendo composto por ramificações de β -1-3-glucano-quitina no caso de *Aspergillus* (Figura 2.3) (Bowman & Free, 2006; Latgé, 2007).

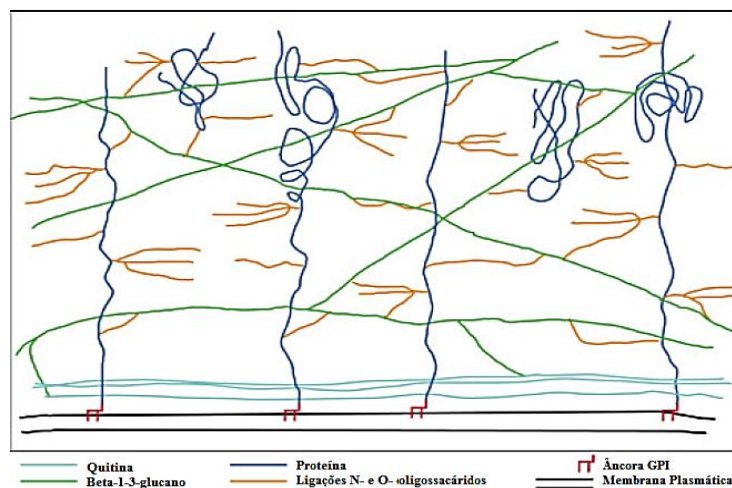


Figura 2.3- Composição estrutural da parede celular de fungos de *Aspergillus* (Adaptado de Bowman & Free, 2006).

1.3. *Aspergillus* do complexo *Fumigati*

Aspergillus fumigatus (Af) foi descrito pela primeira vez em 1863 por Johann B. G. W. Fresenius e é a espécie mais frequentemente isolada de produtos clínicos (Denning, 1998; Schmidt, 1998; Latgé, 1999; Walsh *et al.*, 2008). É considerado o maior e comum etiológico agente patogênico responsável pelas primeiras causas de morbidade e mortalidade e por 90% de infecções em variadas espécies de animais, com incidência especial em aves domésticas (frangos, perus, patos) e espécies de aves selvagens (Butcher *et al.*, 2003; Arné *et al.*, 2011; Huber & Bignell, 2014). Por sua vez, é classificado, segundo o ponto de vista de biossegurança, como integrante no grupo BSL 2 (nível de biossegurança 2), que compreende as espécies que causam infecções oportunistas consistentes, em pessoas com

perturbações graves no sistema imunológico e em aves susceptíveis, assim como, também é classificado como fator alergénico (Komilowicz-Kowalska & Kitowski, 2012).

1.3.1 Distribuição e epidemiologia de *Aspergillus* do complexo *Fumigati*

Tal como referido anteriormente, os *Aspergillus* do complexo *Fumigati* encontram-se distribuídos por todos os nichos ecológicos e são a maior preocupação clínica no que respeita à infeção fúngica de imunocomprometidos.

Num estudo Português analisando 246 isolados de *Aspergillus*, verificou-se que em 57 isolados clínicos, dos quais 37 provenientes de produtos respiratórios, se obteve uma prevalência de 54,1% do complexo *Fumigati* (Sabino *et al.*, 2014b).

Em ambientes interiores, quer na Europa e quer na América do Norte, também se tem verificado evidente presença percentual de compostos orgânicos voláteis (COV) e *Aspergillus* do complexo *Fumigati* bem como dos seus metabolitos tanto micotoxinas, como bioaerossóis. Alguns exemplos desses ambientes são edifícios, explorações agrícolas como suiniculturas ou de criação de animais, neste caso aviários, onde há grande exposição dos trabalhadores (Viegas *et al.*, 2014).

Apesar da imunidade do hospedeiro ser crucial para erradicar a infeção, não quer dizer que os indivíduos saudáveis estejam salvaguardados de inalarem conídios de *A. fumigatus*. A exposição contínua a um ambiente com presença de conídios e inalação constante destes afetará severamente indivíduos imunocomprometidos e saudáveis, que acabam por desenvolver hipersensibilidade por contato/exposição (reações alérgicas), como se tem observado na indústria avícola, que trabalhadores desta, sujeitos a uma exposição ocupacional revelam uma maior propensão de desenvolver doenças respiratórias associadas ao Af (Viegas *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014).

1.3.2 Estudo polifásico de isolados do complexo *Fumigati*

Relativamente aos membros do complexo *Fumigati*, com interesse no presente estudo, existe uma sobreposição de características morfológicas entre várias espécies geneticamente distintas (Balajee *et al.*, 2007), sendo impossível a identificação de espécies de *Aspergillus*, por procedimentos convencionais comumente utilizados em microbiologia clínica e ambiental e sem a referida abordagem polifásica. As ferramentas genéticas e moleculares, que envolvem a reação de cadeia catalisada pela enzima polimerase (PCR), análise de sequências de ADN e estudos de filogenia, permitem solucionar os problemas de dados atípicos que advém do elevado número de espécies neste complexo. A utilização de ferramentas, com observação do sucesso de diferenciação, individualização e correta identificação dos dados, passarão a ser aplicadas correntemente como ferramentas de primeira linha em laboratório (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008a; Serrano *et al.*, 2011).

Na Figura 2.4, pode observar-se a proximidade filogenética das diferentes espécies de *Aspergillus* do complexo *Fumigati* numa filogenia construída com base nas sequências do gene que codifica a calmodulina (de cada um dos isolados) (Samson *et al.*, 2007).

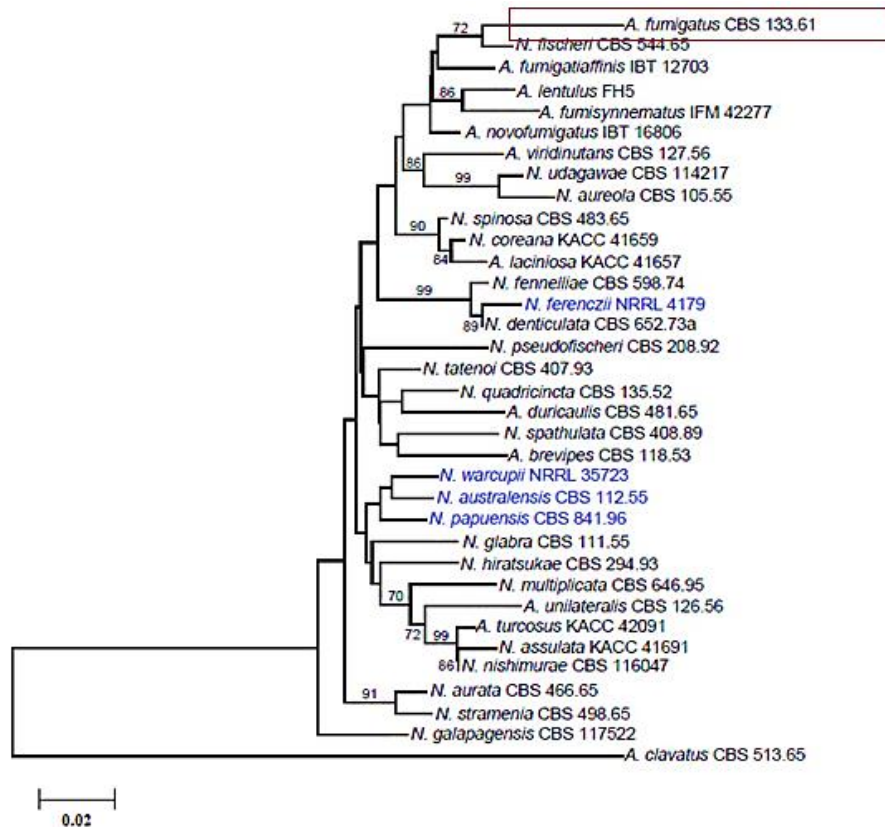


Figura 2.4- Análise filogenética baseada nas sequências calmodulina de *Aspergillus* complexo *Fumigati* e construída segundo o algoritmo Neighbour-joining. Os valores acima de 70% são indicados e representam o método de *bootstrap* (Adaptado de Samson *et al.*, 2007).

Esta análise filogenética demonstra a variabilidade e relação de espécies dentro do complexo *Fumigati*, com observação das espécies próximas a *Aspergillus fumigatus*.

Estudos recentes, recorrendo a metodologias moleculares, mostram que muitos isolados clínicos e ambientais identificados como *Aspergillus fumigatus* (Af) eram, de facto, espécies crípticas deste (exemplificando, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus fumigatiformis*, entre outros). Posteriormente, serão referidas mais pormenorizadamente algumas características e exemplos de espécies crípticas do complexo *Fumigati* (ponto 1.3.4).

A grande relevância da sua correta identificação prende-se com o facto de diferentes espécies dentro deste grupo terem diferenças na suscetibilidade aos antifúngicos, no modo de infeção e nos metabolitos produzidos, o que poderá influenciar quer a terapia, numa perspetiva clínica, quer a qualidade ambiental ou alimentar, numa perspetiva da Saúde Pública.

1.3.3 *Aspergillus fumigatus sensu stricto*

Este fungo é o agente patogénico mais prevalente, não transmissível de hospedeiro para hospedeiro, presente no ar de ambientes interiores como exteriores ocorrendo de forma natural por todo o mundo, com especial crescimento em ambientes quentes, no solo terrestre e marinho, vegetação em decomposição, compostagem, lixo residual, resíduos de vegetação presentes em ninhos e camas de animais, culturas agrícolas, materiais de construção, ambientes hospitalares e ambientes de produção animal, bem como nos sistemas de humificação dos locais anteriormente indicados (Denning, 1998; Latgé, 1999; Samson *et al.*, 2000; Latgé, 2001; Boudra & Morgavi, 2005; Hong *et al.*, 2005; Pringle *et al.*, 2005; Pattron, 2006; Perdelli *et al.*, 2006; Falvey & Streifel, 2007; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008a; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008b; Walsh *et al.*, 2008; Klich, 2009; McCormick *et al.*, 2010; Pasqualotto, 2010; Ok *et al.*, 2011; Sabino *et al.*, 2014b).

Os fatores de virulência expressos por *A. fumigatus sensu stricto*, definidos como os determinantes das suas infeções patogénicas num dado hospedeiro fazem dele um organismo biológico competente, como consequência da sua singular fisiologia e genética. São exemplos destes a capacidade de germinação, esporulação e pigmentação do fungo, assim como a termotolerância, a composição e manutenção da parede celular, a resistência às respostas imunológicas, absorção de nutrientes durante crescimento invasivo nas infeções e ainda devido aos alergénios e micotoxinas produzidas (Bok *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2010).

O sucesso garantido de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* como agente patogénico deve-se também aos seus reduzidos conídios, que por circulação no ar e posterior inalação pelos hospedeiros acabam por se acomodar e desenvolver (Latgé, 1999; Latgé, 2001; Pringle *et al.*, 2005; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008a; McCormick *et al.* & Pasqualotto, 2010; Ok *et al.*, 2011). Devido também à acumulação ou ação dos subprodutos (conídios, hifas e micotoxinas) deste agente patogénico, a manifestação de um largo espectro de doenças como aspergilose alérgica broncopulmonar (AABP), aspergilomas e aspergilose invasiva (AI) tem ganho um pertinente cariz na investigação (Latgé, 1999; Stevens *et al.*, 2000; Perfect *et al.*, 2001; Dagenais & Keller, 2009; McCormick *et al.*, 2010; Pasqualotto, 2010).

Como referido anteriormente, o estudo polifásico é fundamental para a identificação de uma espécie e *A. fumigatus* não é exceção. As colónias deste fungo, aquando a presença de condições propícias, em meios de cultura de MEA e a temperaturas correspondentes ao seu ótimo desenvolvimento (de 25 a 37°C) permitem a observação macroscópica das suas particularidades. Deste modo, este fungo apresenta-se como um fungo filamentosos, com conidióforos hialinos e hifas aéreas do mesmo tom branco-esverdeado, dependendo do grau de maturação da colónia, sendo também reconhecido pelo seu rápido crescimento. Quando madura, tem uma coloração típica verde-azulada (Figura 2.5). Microscopicamente, *A. fumigatus* apresenta as mesmas características descritas em 1.2 e observadas pela representação da Figura 2.2 c), no entanto, dispõe de conidióforos curtos, lisos sem irregularidades, hialinos e de dimensões de 100-500 x 5-8 µm; as vesículas são subglobosas com fiáides com disposição

colunar e unisseriadas (sem a presença de métula) e hialinas, com dimensões de 20-30 μm . Os seus conídios (unidade reprodutiva assexuada) são pequenos, incolores e com uma forma globosa, de tamanho 2-5 μm (Latgé, 1999; Ferreira & Sousa, 2000; Samson *et al.*, 2000; Snelders, 2012).

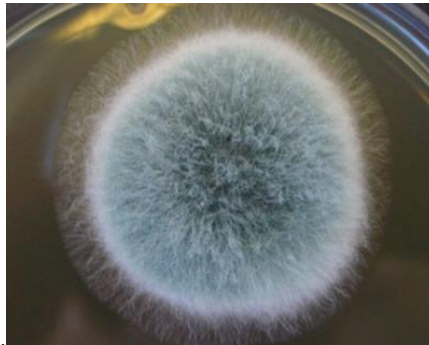


Figura 2.5- Colônia de *Apergillus fumigatus* em MEA, após crescimento de 2 dias, a 27,5°C.

Particularmente, este fungo requer condições físico-químicas e nutricionais específicas para se desenvolver. Cresce a temperaturas ótimas de 37°C, mas que podem variar entre extremos térmicos entre 10-55°C. *Aspergillus fumigatus sensu stricto* é a única espécie, dentro do *complexo Fumigati*, que consegue crescer a 55°C, pelo que esta característica é também um fator importante para a sua correta identificação. Necessita ainda de pH ótimo de 5,5-6,5, que podem variar entre extremos entre 3,0-8,0; uma a_w mínima de 0,82 e uma a_w máxima de 0,97 e ainda uma humidade relativa ótima de 98-99%, podendo alcançar mínimos de 85% (Abad *et al.*, 2010; Kleinkauf *et al.*, 2013). Com estas características, que se tornam similares às condições atmosféricas, o desenvolvimento e existência de *A. fumigatus* no ambiente torna-se muito corrente.

De fato, a termotolerância de *A. fumigatus sensu stricto* é considerada um fator de virulência, aumentando a sua capacidade de infetar mamíferos e aves até temperaturas de 70°C, devido adaptações metabólicas e genéticas dado que os padrões génicos compostos por genes *heat shock-responsive* têm um papel no controlo térmico perante *stresses* ambientais (Nierman *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2010).

Aspergillus fumigatus, produz micotoxinas que contaminam alimentos destinados à alimentação animal e humana, forragens, flora residual dos ninhos e *habitats* das aves quando em condições propícias de pH, hipoxia, HR e temperaturas (Samson *et al.*, 2000; Melo dos Santos *et al.*, 2002; Bok *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2010).

De entre as micotoxinas mais produzidas por *A. fumigatus sensu stricto* encontram-se os termogéneos (fumitermorgéneos B e C), alcaloides calvines (fumigaclavines B e C), verruculogéneo, ácidos helvolicos, fumitoxinas e a gliotoxina, como toxina valorizada no contexto deste estudo (Samson *et al.*, 2000; Boudra & Morgavi, 2005; Samson *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2010).

A gliotoxina (GT), um metabolito de *A. fumigatus sensu stricto* é libertada pelas hifas, pode ser identificada nos conídios em aerossolização e demonstra efeitos imunossupressores e geno e citotóxicos sobre as células do sistema imunitário de um dado hospedeiro (Samson *et al.*, 2000; Klich, 2010; Pena

et al., 2010). As gamas de temperatura ideais para a biossíntese da maior parte das micotoxinas enquadra-se na gama de temperaturas mesófilas, 20 a 30°C, mas a capacidade de crescer a temperatura corporais humanas, 37°C, surge como claro requisito de infeções micóticas sistémicas, neste caso a GT, em humanos e aves e suscita síndromes neurológicas em trabalhadores expostos a esta (Hussein & Brase, 2001; Pena *et al.*, 2010).

1.3.4 Espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus*

A identificação de espécies crípticas revela-se um parâmetro fundamental para o conhecimento epidemiológico de espécies de *A. fumigatus sensu stricto*, através de ferramentas moleculares (enunciadas no ponto 1.3.2 e discriminadas com maior detalhe no ponto 1.3.4.1) que clarificam desta forma a identificação das espécies estritamente relacionadas com o complexo *Fumigati*. Estas espécies semelhantes surgem devido talvez ao fato deste complexo dispor de sólidos genomas e pode ter ocorrido adaptação do modo de vida destes fungos a diferentes variações ambientais (Montenegro *et al.*, 2009; Kelkar & Ochman, 2011; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2012). O complexo *Fumigati* envolve, pois, espécies análogas de taxas de crescimento (idênticas a 37°C) e ao desenvolvimento de patologias, como infeções fúngicas patogénicas (AI), mas com diferentes suscetibilidades aos antifúngicos e divergentes efeitos de virulência (Balajee *et al.*, 2005a; Balajee *et al.*, 2005b; Pringle *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2005; Montenegro *et al.*, 2009; Sabino *et al.*, 2014b). Juntamente com a observação de dados terapêuticos, que anunciam uma resistência adquirida de *A. fumigatus* a vários azóis e que as espécies crípticas assumem uma baixa sensibilidade a ação dos antifúngicos, quando comparadas a Af (Serrano *et al.*, 2011; Van der Linden *et al.*, 2011a; Van der Linden *et al.*, 2011b), acresce à problemática destas espécies poderem também adquirir uma dada resistência a múltiplas terapias fúngicas, bem como sofrerem mutações e se tornarem resistentes, mantendo-se presentes em isolados clínicos e patologias.

Aspergillus fumigatus apresenta numerosas espécies crípticas como *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus fumigatiffinis*, *Aspergillus novofumigatus*, entre outras (Hong *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2011; Van der Linden *et al.*, 2011a; Van der Linden *et al.*, 2011b). Estas são portanto, variantes atípicas com diferenças fenotípicas/morfológicas mínimas, que causam algum cepticismo comparativamente a *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (Balajee *et al.*, 2005b). Visto que as condições de interpretação da identificação polifásica não sustentam tais dúvidas, a aplicação de ferramentas moleculares torna-se imprescindível para uma identificação correta e para uma avaliação eficaz da infeção/contaminação em estudo. Deste modo, observou-se por auxílio destas ferramentas, que espécies atípicas presentes nos mesmos isolados clínicos, por exemplo exsudado respiratório, e também em ambientais são morfologicamente indistinguíveis, apenas com anotações de um retardamento na esporulação, irregularidades nas formas das vesículas, ausência de crescimento a temperaturas de 48-50°C e produção de diferentes metabolitos. Ao analisá-las molecularmente, verificaram-se variabilidades de posições

nucleotídicas, diferenças essas que justificavam ser espécies diferentes (Balajee *et al.*, 2005a; Pringle *et al.*, 2005; Howard *et al.*, 2009; Montenegro *et al.*, 2009).

A espécie críptica *A. lentulus* tem uma distribuição geográfica mundial, podendo ser encontrada em solos, ar, mas também em produtos clínicos como do trato respiratório humano resultando AI. Esta espécie apresenta resistência ou menor suscetibilidade à ação de vários antifúngicos. A distinção de *A. fumigatus sensu stricto* e *A. lentulus* resulta portanto da aplicação de marcadores, que permitem o estudo das relações filogenéticas que separam as espécies de forma evidente impedindo erros de identificação (Balajee *et al.*, 2005b; Hong *et al.*, 2005; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008a). O papel da análise molecular do ADN por parte de marcadores moleculares, quer ITS, β -tubulina e calmodulina é inquestionável e fundamental. De acordo com alguns estudos, apenas o gene calmodulina assume rigor para determinar as espécies crípticas, com melhores resultados e uma maior discriminação (Hong *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2011). Para complementar esta caracterização de espécies crípticas, a avaliação dos perfis de suscetibilidade de espécies crípticas a antifúngicos comparativamente à espécie original, emerge como boa preferência. Assim, os estudos moleculares são fundamentais para descobrir e reconhecer estas espécies enigmáticas e, possibilitar, através da correta caracterização destes fungos, a compreensão de que pequenas diferenças genotípicas entre estirpes podem resultar de microevoluções associadas a co-infeções e representarem a policlonalidade existente em *A. fumigatus*. O interesse no significado clínico, microbiológico e epidemiológico destas espécies é, pois, um assunto bastante em foco (Balajee *et al.*, 2005b; Pringle *et al.*, 2005).

1.3.4.1 Identificação molecular de espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus*

Os métodos moleculares, tais como métodos de comparação de sequências oferecem rapidamente a identificação de espécies com a capacidade de detetar diferenças em nucleótidos e diferenciar isolados fúngicos até ao nível da espécie, sendo que desde a última década estas novas técnicas tem sido complementadas com métodos convencionais (Pasqualotto, 2010). O tamanho do genoma de *A. fumigatus* enquadra-se entre 29 e 37 Mb, apresenta-se dividido em 8 cromossomas, cada com tamanho correspondente a 1,8-4,9 Mb (Gavier-Widén *et al.*, 2012).

Para a pesquisa de espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus* recorreu-se a metodologias moleculares, como PCR, análise de sequências de ADN e Método de Sanger, de modo a individualizar e identificar da forma mais correta e universal os resultados a obter.

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma metodologia revolucionária efetuada *in vitro* e desenvolvida por Kary Mullis, em 1980. Esta baseia-se no uso da ADN polimerase e dois *primers* oligonucleotídicos, que permitem sintetizar sequências de ADN específicas (uma nova cadeia de ADN) complementar com as cadeias de ADN molde. A primeira demonstração do processo de PCR foi realizada por Saiki e colaboradores em 1985. Em 1988, a técnica de PCR foi modificada, através da

introdução na reação de uma polimerase termoestável (Saiki *et al.*, 1988). No final da reação de PCR, a sequência específica terá acumulado milhares de milhões de cópias (amplicões) (Figura 2.6).

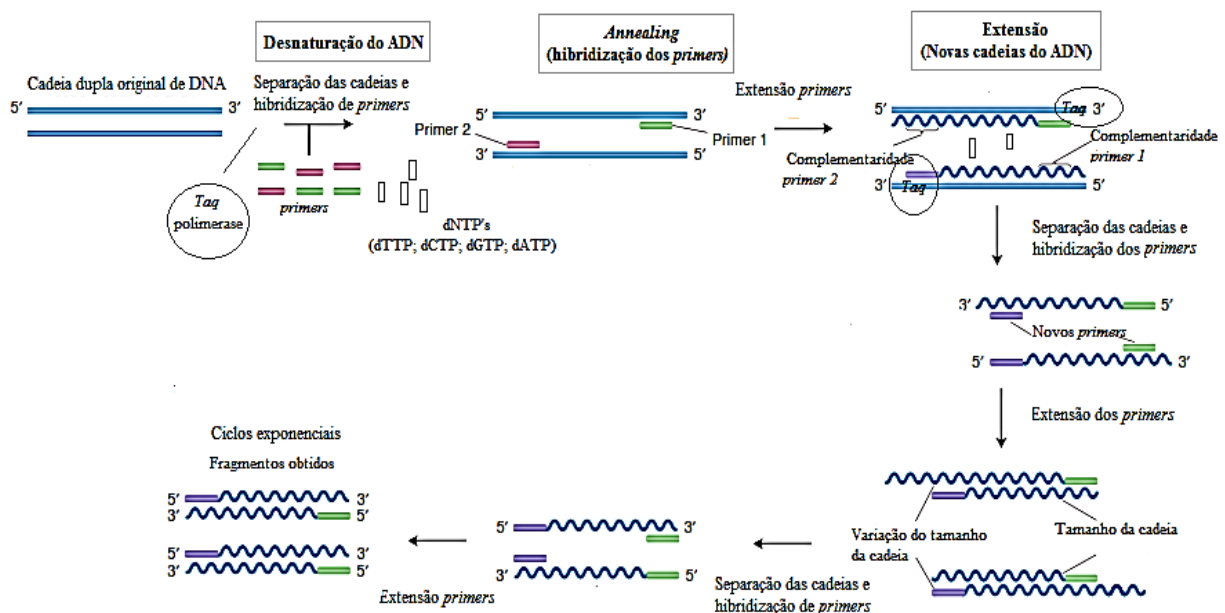


Figura 2.6- Técnica de PCR para amplifica o do ADN (Adaptado de Griffiths *et al.*, 2005).

Para a identifica o correta de espécies de *Aspergillus*, efetua-se uma análise polifásica do isolado de *Aspergillus*: inicialmente realiza-se uma identifica o de características macro e micro morfológicas, seguida da sequencia o de genes com fun oess essenciais no metabolismo ou estrutura celular, como os genes que codificam a β -tubulina e a calmodulina (Hong *et al.*, 2005). Mas não são estes genes permitem estudos baseados na análise do ADN, a compara o de sequências deste podem ser efetuadas pela compara o de subunidades mitocondriais do ARNr e regiões nucleares do ARNr, muito úteis para determinar rela oess entre g neros e espécies de fungos. Esta região   designada como ITS (Internal Transcribed Spacers), que cont m o gene 5.8 S do ARNr, normalmente acompanhado por uma bipartilha o do ITS, de duas regi oess transcritas internas, o ITS1 e ITS2 (Figura 2.7) (O'Donnell, 1992; Glass & Donaldson, 1995). A sequencia o desta região (que compreende toda a região ITS1 e ITS2 bem como o gene 5.8 S do ARNr)   considerada como a metodologia *Gold Standard* para a identifica o molecular de fungos filamentosos, de forma geral (O'Donnell, 1992; Glass & Donaldson, 1995). Para alguns g neros fúngicos específicos, como o *Aspergillus*, são utilizados outros alvos moleculares, já referidos, dado que a região ITS não tem poder discriminatório suficiente para conseguir fazer a identifica o de espécies crípticas.



Figura 2.7- Esquematiza o da região do ITS (Adaptado de Glass & Donaldson, 1995).

A ferramenta molecular que permite a análise de sequências de ADN é o Método de *Sanger*, método de sequenciação de ADN, normalmente usado para determinar a sequência exacta de ADN até aos 500 nucleótidos. Esta técnica consiste num processo misto, que envolve a síntese de um ADN complementar por o uso de desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs normais), após desnaturação e hibridação por um *primer* oligonucleótido, na PCR, e extensão pela ação de ADN polimerase, e a síntese de uma cadeia de terminação trifosfato didesoxinucleótidos (ddNTPs) pela ação da mesma enzima. A desnaturação dos fragmentos de ADN de dupla cadeia origina cadeias molde para a síntese *in vitro* de ADN.

Para uma sequenciação por *Sanger*, a inclusão de marcadores fluorescentes com diferentes cores para cada tipo de ddNTP distingue as cadeias cortadas (isto é, o polipeptídeo foi cortado e acrescentado um nucleótido) pela respetiva fluorescência. Assim, quando estes fragmentos marcados passarem na região de detecção, os fluoróforos são excitados pelo laser, que injeta um feixe luminoso, no sequenciador de ADN, produzindo assim, emissões de fluorescência de quatro cores diferentes, que correspondem às bases do ADN (Figura 2.8). A deteção da fluorescência distingue os 4 marcadores fluorescentes dos outros ddNTPs. A ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detetor de fluorescência indicam a sequência da cadeia de ADN complementar à cadeia usada como molde, ou seja, a sequência obtida não é a da cadeia molde, mas sim a da sua cadeia complementar (Metzker, 2005).

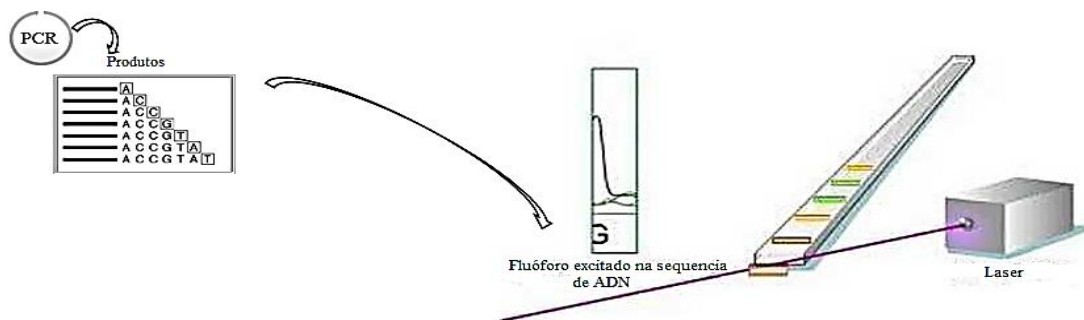


Figura 2.8- Método de *Sanger*. Após PCR os produtos de fragmentos de ADN, complementados com os respetivos fluorocormos, atravessam um capilar através do qual passa um feixe luminoso que permite a obtenção da sequência de ADN (Secuenciación automática de ADN basada en técnica de Sanger <http://www.youtube.com/watch?v=ujhxO6dPsX0>).

2. Infecções causadas por *Aspergillus* spp.

Durante o processo de germinação e colonização do fungo, os conídios reestruturam a sua parede celular e com isto, alteram a sua capacidade de agregação e de invasão dos hospedeiros. Esta reestruturação envolve vários factores como a resistência às condições atmosféricas, mesmo extremas, e às condições favoráveis nutricionais, melhorando assim agregação dos constituintes α -1-3-glucanos e proteínas hidrofóbicas da parede celular, quer em *A. fumigatus* quer em outros *Aspergillus* spp. (Beauvais & Latgé, 2001; Fontaine *et al.*, 2010; Pasqualotto, 2010; McVey *et al.*, 2013).

Uma das manifestações clínicas de *Aspergillus*, a aspergilose invasiva (AI), é atualmente a doença fúngica sistémica mais comum no mundo (Balajee *et al.*, 2007; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008a; Dagenais & Keller, 2009; Serrano *et al.*, 2011; Dimopoulos *et al.*, 2012). Este grupo fúngico está ainda na base de outras patologias importantes, apresentadas na Tabela 2.2, descritas segundo três categorias, infeções invasivas, representadas por crescimento das hifas do fungo no interior do tecido; colonização, alojamento do fungo nas superfícies das mucosas ou cavidades corporais e ainda reações de hipersensibilidade, definidas pela resposta imunitária desencadeada (Latgé, 1999; Stevens *et al.*, 2000; Perfect *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2005; Dagenais & Keller, 2009; Park & Mehrad, 2009).

Tabela 2.2- Espectro de doenças clínicas geradas por *Aspergillus fumigatus* (Adaptado de Park & Mehrad, 2009; Kousha *et al.*, 2011).

Categoria	Doenças específicas	Falhas na defesa Imunitária
Sem manifestação de doença		Sem falhas - Indivíduos Saudáveis
Infeção Invasiva	Aspergilose Invasiva (AI); Rinosinusite Invasiva; Aspergilose Traqueobronquial e Aspergilose Crónica das cavidades pulmonares	Sistema imunitário afetado (mediação por células imunitárias inatas)
Colonização	Doença Pulmonar Crónica Obstrutiva (DPCO)	Sistema imunitário da mucosa afetada
Hipersensibilidade	Asma; Aspergilose Alérgica Broncopulmonar (AABP); Sinusite Alérgica e Pneumonia hipersensível	Desequilíbrios da imunidade adquirida

A AI foi descrita pela primeira vez em 1953 e desde então, a sua incidência tem sido crescente (Kousha *et al.*, 2011; Dimopoulos *et al.*, 2012).

A presença de *A. fumigatus* afeta severamente indivíduos com o sistema imunitário deficiente, designados como imunocomprometidos. A AI, nos casos de indivíduos imunodeprimidos, pode apresentar taxas de mortalidade superiores a 50% (McNeil *et al.*, 2001; Balajee *et al.*, 2007; Falvey & Streifel, 2007; Hohl & Feldmesser, 2007; Kousha *et al.*, 2011; Juvvadi *et al.*, 2013).

2.1. Aspergilose Invasiva por *Aspergillus* complexo *Fumigati*

A AI causada por *Aspergillus* do complexo *Fumigati* inicia-se pela produção (assexuada) de conídios, com tamanho 2-5 µm (Latgé, 1999; Ferreira & Sousa, 2000), que fácil e velozmente dispersam no ar (Figura 2.9) assegurando a sua presença em ambientes exteriores e interiores (Dagenais & Keller, 2009). Deste modo, a principal via de contaminação advém da inalação dos esporos em aerolização (mas também podem incorporar-se se existirem ferimentos ou durante cirurgias).

Estima-se uma variação de 0,2 a 15 conídios e 10⁶/m³, 10⁹/m³ (conídios) em ambientes hospitalares, agrícolas e de compostagem, respetivamente, e uma inalação média de centenas de propágulos infecciosos por dia pela população em geral (Latgé, 2001; Park & Mehrad, 2009). Em seguida, os

conídios inspirados vão contatar diretamente com o epitélio terminal das vias respiratórias e depositar-se entre as lacunas do revestimento do epitélio dos brônquios e dos alvéolos (Lalgé, 1999; Dagenais & Keller, 2009; Park & Mehrad, 2009). Nesta fase, as defesas imunológicas iniciam-se pelas barreiras físicas, mecânicas e anatómicas das vias do trato respiratório (Dagenais & Keller, 2009; Park & Mehrad, 2009; Reiss *et al.*, 2012). Os reduzidos conídios de *Aspergillus fumigatus*, com 2-5 μm , atravessam prontamente todo o sistema respiratório (Reiss *et al.*, 2012), pelo que a defesa mecânica só é eficaz, quando acompanhada pela acção dos macrófagos alveolares que fagocitam e destroem os conídios, pois as barreiras físicas permitem a passagem de partículas com diâmetros de 2-10 μm . Estes agentes de defesas, ao exercerem acção fagocítica sobre os conídios, iniciam uma resposta pré-inflamatória que recruta os neutrófilos para agirem contra as hifas de Af (Dagenais & Keller, 2009; Park & Mehrad, 2009; Rodland *et al.*, 2010; Kousha *et al.*, 2011; Reiss *et al.*, 2012).

Em indivíduos imunocomprometidos, os conídios inalados alcançariam e acumular-se-iam nos pulmões (órgão-alvo), onde se iniciaria uma inflamação, acompanhada por libertação de enzimas fúngicas gerais (elastases, proteases e fosfolipases), bem como produção de gliotoxina, específica de *A. fumigatus sensu stricto* (a sua detecção foi verificada em 93% dos isolados clínicos com AI comprovada) (Kupfahl *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2010) resultando danos nos tecidos e disseminação para outros órgãos através da circulação sanguínea, gerando AI e outras doenças (Lalgé, 1999; Lalgé, 2001; Park & Mehrad, 2009; Ok *et al.*, 2011; Bayry *et al.*, 2012).

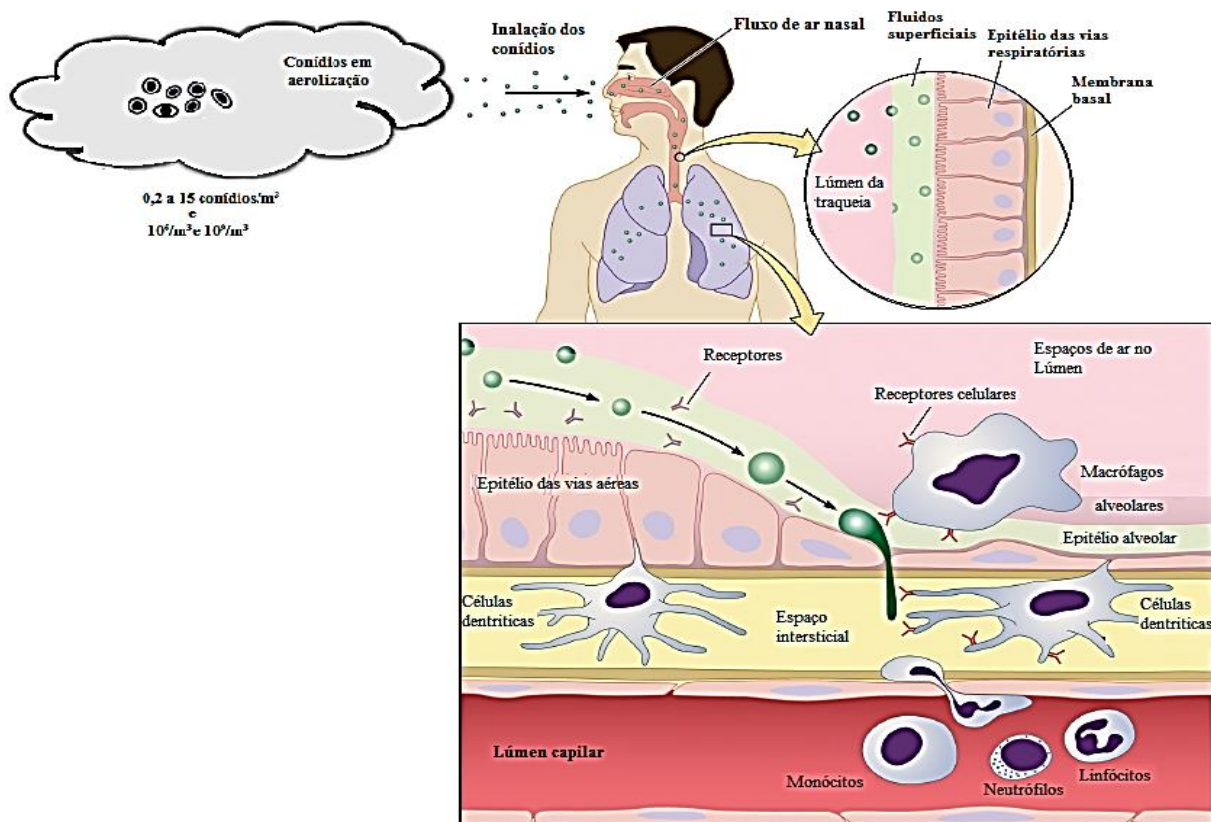


Figura 2.9- Modo de infecção por inalação de conídios de *Aspergillus fumigatus* (Adaptada de Park & Mehrad, 2009).

2.1.1. Aspergilose Invasiva Aviária

No de ano de 1800, a presença de *Aspergillus* spp. foi descrita como patogénica em aves selvagens na Europa, dado existirem no ambiente de forma comum (Femenia *et al.*, 2007). *Aspergillus fumigatus* foi considerado o maior e frequente patogénico respiratório de aves, identificado pela primeira vez nos sacos aéreos de *Otis tarda* (Abetarda-comum) em 1863 por Fresenius (Arné *et al.*, 2011). Desde então, a doença causada por *Aspergillus fumigatus* tem sido descrita em todo o mundo em muitas espécies ornitológicas, que posteriormente desenvolvem aspergilose invasiva. Pensa-se que provavelmente todas estas aves são susceptíveis à infeção do fungo e ao desenvolvimento de infeções respiratórias ou mesmo AI (Femenia *et al.*, 2007; Arné *et al.*, 2011; Olias *et al.*, 2011; Komilowicz-Kowalska & Kitowski, 2012).

A infeção fúngica decorre da exposição das aves aos conídios, micotoxinas e alergénios de Af que se depositam essencialmente no trato respiratório, sacos aéreos, mas também no sistema nervoso central (SNC). A exposição intensiva e contínua à micoflora patogénica é um requisito para o desenvolvimento de futuras doenças em animais, que apesar de estar relacionada com a presença dos microrganismos, quer no ambiente, quer nas camas (palha, papel, aparas de madeira, entre outras) e nos seus alimentos, depende das flutuações sazonais relacionadas com o aumento significativo da concentração dos esporos dos fungos infecciosos (Arné *et al.*, 2011; Dhama *et al.*, 2013; McVey *et al.*, 2013).

A AI apresenta taxas de mortalidade de aves estimada na ordem dos 30%, o que origina perdas financeiras muito significativas e dispendiosas na indústria avícola (Zafra *et al.*, 2008; Thierry *et al.*, 2010; Ceolin *et al.*, 2012; Reza *et al.*, 2013).

2.1.2. Distribuição e epidemiologia da Aspergilose Invasiva Aviária

A Aspergilose invasiva (AI) é a mais importante infeção respiratória fúngica em aves, selvagens, de cativeiro, de parques zoológicos, em reabilitação e para produção alimentar, sendo a maior causa de mortalidade nestas aves e de distribuição mundial. A doença no setor avícola pode ter diferentes manifestações: os surtos agudos, com alta morbilidade e alta mortalidade em aves jovens, e o surto crónico (esporadicamente), que afeta aves adultas, por disseminação invasiva (sistema pulmonar ou sacos aéreos) ou de forma localizada (cutânea, nasal, oftalmológica e traqueal) (Denning, 1998; Stevens *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2005; Dagenais & Keller, 2009; Alvarez-Perez *et al.*, 2010; Thierry *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011; Beernaert *et al.*, 2011; McVey *et al.*, 2011; Reza *et al.*, 2013).

A informação da prevalência de AI entre aves selvagens é fragmentada e mostra ampla variação entre espécies ornitológicas, também associada às migrações. Os casos mais reportados em aves selvagens envolvem aves aquáticas, patos, gansos (Família Anatidae), gaiotas (Família Laridae) e aves de rapina (Família Accipitridae e Falconidae), refletindo que a AI afeta diferentes espécies. No caso da AI em aves domésticas (canários, araras) e avícolas (frangos, perus, patos), esta é reportada como uma doença aguda, com elevadas taxas de mortalidade nos primeiros dias de vida e elevadas taxas de penetração em

ovos durante a incubação. Após investigação por técnicas analíticas, consegue-se verificar a qualidade do ovo e identificar a presença de fungos, o que gera uma elevada mortalidade embrionária dos ovos em fases iniciais do desenvolvimento. Deste modo, a indústria avícola apresenta perdas económicas acentuadas, baixa produtividade e elevada mortalidade (natural ou por abate) (Beernaert *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011; Ceolin *et al.*, 2012; Gavier-Widén *et al.*, 2012; Suleiman *et al.*, 2012; McVey *et al.*, 2013; Reza *et al.*, 2013).

O ambiente, tanto nos casos de AI em aves selvagens ou domésticas, é considerado como condutor de transmissão de doenças infecciosas, levando ao aparecimento de surtos. O ambiente é, pois, o agente mais amplo que afeta a sobrevivência, transmissão e sazonalidade deste patogénico, afeto a fatores bióticos e abióticos que o caracterizam. São deles exemplos o *stress*, clima, a meteorologia, química da água e do ar, práticas agrícolas e uso dos solos, ninhos e palhas secas dos aviários, ambientes exteriores ou interiores (aviários, cativeiros, reabilitação) e ventilação e práticas higiénico-sanitárias destes (Nardoni *et al.*, 2006; Cacciuttolo *et al.*, 2009; Beernaert *et al.*, 2010; Sehgal, 2010; Van Waeyenberghe *et al.*, 2012; Dhama *et al.*, 2013; McVey *et al.*, 2013).

A principal via de transmissão dos conídios, quer em aves quer nos humanos, continua a ser o ar, que predispõem as aves para a infeção. A infeção das aves é distinta da infeção dos seres humanos. Enquanto nos humanos, os conídios colonizam o trato respiratório gerando infeções pulmonares em indivíduos imunocomprometidos, nas aves, a AI desenvolve-se por penetração dos esporos inalados que contactam com a superfície epitelial do aparelho respiratório e pulmonar, essencialmente a laringe, traqueia, tubos bronqueais, sacos aéreos colonizando-os e por condições ideais acabam por germinar e disseminar para o sistema circulatório, articular e renal originando infeções também nos olhos, sistema cardiovascular e sistema nervoso central (SNC) de aves saudáveis e doentes (estas afetadas mais severamente) (Figura 2.10), pois todas as aves parecem ter uma grande susceptibilidade para a infeção por *Aspergillus* (Nardoni *et al.*, 2006; Femenia *et al.*, 2007; Cacciuttolo *et al.*, 2009; Beernaert *et al.*, 2010; Thierry *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011; Olias *et al.*, 2011; Suleiman *et al.*, 2012; Thierry *et al.*, 2013; Reza *et al.*, 2013).

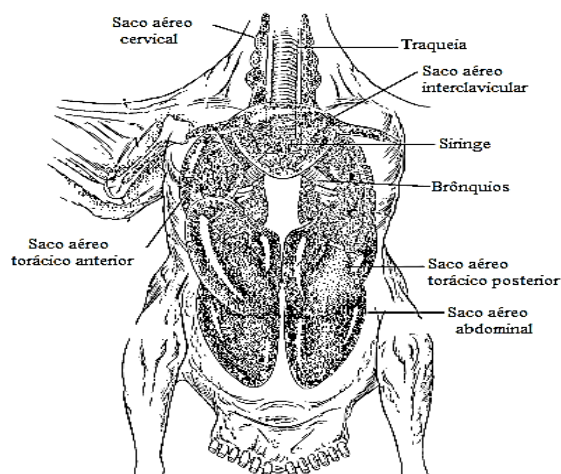


Figura 2.10– Anatomia do sistema respiratório das aves (Adaptado de Jacob *et al.*, 2011).

A colonização pelos conídios de Af e o desenvolvimento da infecção (Figura 2.11) são muitas vezes caracterizados, histopatologicamente *post-mortem* por dois modelos de lesões: a forma nodular (hifas septadas internamente, que se desenvolvem na área sem espaços do parênquima) e as formas granulomatosas (sugerem a esporulação do fungo (pela cor cinza-esverdeada) localizada nos sacos aéreos (Nardoni *et al.*, 2006; Femenia *et al.*, 2007; Cacciuttolo *et al.*, 2009; Beernaert *et al.*, 2010; Prester *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011; Thierry *et al.*, 2013). Mais uma vez e tal como no Homem, *A. fumigatus* apresenta mecanismos que facilitam a infecção, como conídios de dimensões pequenas, <5 µm de diâmetro, que facilmente ultrapassam o sistema respiratório das aves e se depositam neste, originando as patologias referidas. Paralelamente à germinação de Af há aumento do alergénico Asp1, que também contribui para um contexto infeccioso (Prester *et al.*, 2010).

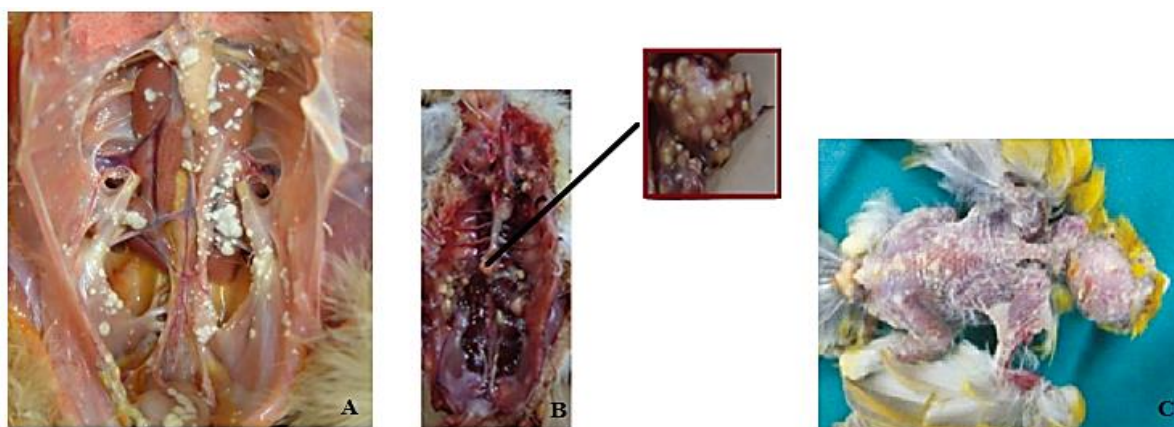


Figura 2.11– Patologias por *Aspergillus fumigatus*. A) Lesões nos sacos aéreos e difusão no sistema respiratório de granulomas de tons brancos em *Gallus gallus*; B) Aspergilose em *Gallus gallus*, com granulomas distribuídos por toda a cavidade respiratória e observação de granulomas nos sacos aéreos; C) Lesões dérmicas localizadas na cabeça e costas de ave doméstica (Adaptado de Cacciuttolo *et al.*, 2009; Ceolin *et al.*, 2012; Reza *et al.*, 2013).

Tal como os seres humanos, para minimizar e contrariar a infecção nas aves, e apesar de anatomicamente divergentes, estas possuem um sistema imunitário que opera de igual forma em indivíduos saudáveis e competentes imunologicamente. As aves apresentam nove sacos aéreos que movimentam o ar e as vias respiratórias são cobertas por epitélios ciliados, auxiliadas pela produção de um muco quase vestigial, como barreiras físicas iniciais para a entrada dos conídios. Aliás, o sistema imunitário das aves, como por exemplo da galinha (*Gallus gallus*), colabora com os mecanismos básicos na depuração dos conídios (Arné *et al.*, 2011; Jacob *et al.*, 2011). Este sistema está dividido em dois mecanismos: não específico e específico, em que no primeiro as aves resistem às doenças e no segundo, em que as aves possuem mecanismos imunológicos específicos que lhes permitem tentar debelar a infecção (sistema de aquisição), caracterizados por especificidade e heterogeneidade, e subdividido em sistema celular e componente não celular (humoral) (Tabela 2.3) (Jacob *et al.*, 2011).

Tabela 2.3- Sistema imunitário ornitológico (Adaptado de Jacob *et al.*, 2011).

Mecanismos Não específico	Mecanismos Específico	
Factores genéticos	Celular	Não Celular
Temperatural Corporal	Linfócitos B	Imunoglobulinas
Características Anatômicas (revestimento dérmico e das mucosas)	Linfócitos T	
Microflora Inata		
Proteção ciliar no Sistema Respiratório		

As defesas mecânicas (mecanismos não específicos) das aves estão aptas para destruir os conídios coadjuvadas aos mecanismos de primeira linha, macrófagos, linfócitos e fagócitos do lúmen das vias respiratórias, mas no momento da infecção, a disponibilidade destes componentes está praticamente ausente e a superfície epitelial fica desprovida de um mecanismo mucociliar, a ação de defesa não é eficaz. Deste modo, o ciclo de infecção e o sucesso de Af acaba sempre por superar estes mecanismos, mesmo que as aves disponham de um sistema imunológico e barreiras físicas iniciais competentes, pois há uma falha no recrutamento dos macrófagos e uma predisposição muito elevada para albergar os conídios de Af no seu trato respiratório, devido não só às suas pequenas dimensões, mas também devido ao fato do fluxo de ar presente nos sacos aéreos orientar para a deposição de partículas (Femenia *et al.*, 2007; Arné *et al.*, 2011; Jacob *et al.*, 2011). A temperatura média corporal das aves, 43°C, também contribui para albergar o patogénico e permitir a sua germinação. Dada as suas características de termotolerância, Af tem as características ideais para se desenvolver nas aves, ao contrário de outros fungos e apesar ainda de se distanciar da temperatura óptima de crescimento do fungo verificada nos humanos, 37°C (Ibrahim-Granet *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2010; McCormick *et al.*, 2010).

A manifestação física da infecção por Af e posterior condição de AI inclui sinais que compreendem a diminuição de apetite, apatia, perda de peso, dispneia, muitas vezes diarreia, febre e comportamento e postura anormal, dificuldade de respiração, inflamação dos olhos, do cérebro e das membranas que envolvem o cérebro, resultando em aumento da morbidade e mortalidade, que chega a valores da ordem dos 50% em espécies jovens. As iniciativas para a conversão alimentar e taxas de crescimento na recuperação das aves é normalmente mal sucedida, levando a muitos abates. A evolução da doença ocorre em dias ou semanas, após curtos períodos de exposição (Arné *et al.*, 2011; Gavier-Widén *et al.*, 2012; Thierry *et al.*, 2013).

Todas estas manifestações podem ser observadas nas aves selvagens, nos seus próprios *habitats*, mas também em cativeiro e especialmente em aves de aviário. Cada vez mais há a utilização de aves, nomeadamente galinhas (*Gallus gallus*) como modelo animal para o estudo de diagnóstico e tratamento da AI (Thierry *et al.*, 2013). Estas espécies aviárias domésticas integram a alimentação humana e são severamente afetadas por *Aspergillus fumigatus*, pelo que os estudos nesta área se revestem de grande importância. Com os estudos fisiopatológicos das aves surgem também os estudos sobre a ecologia dos

ambientes avícolas que as rodeiam, que já são conhecidos por serem uma possível fonte de contaminação. Esta poderá dever-se a condições deficitárias, tais como inadequados sistemas de ventilação e limpeza dos filtros, fracas revisões de regulamentos higiênico-sanitários; elevadas temperaturas, HR e concentrações de bioaerossóis, poeiras e compostos orgânicos voláteis (COV), nos ambientes de aviário e também nas incubadoras destes espaços. Nas incubadoras, *Aspergillus fumigatus* poderá contaminar os ovos, tornando-os inviáveis. Por falhas higiênico-sanitárias, de controlo da qualidade e segurança, os seus conídios acabam por germinar no interior dos ovos, causando elevadas perdas de viabilidade (Figura 2.12). Por outro lado, os conídios de Af também podem ser aerotransportadas do exterior para o interior, as condições de seca podem também promover há persistência e domínio do fungo *Aspergillus fumigatus*. A sobrelotação de espaços de criação das aves, alimentação, presença de pragas, baixa qualidade alimentar, fracas condições de armazenamento e conservação dos alimentos levam ao aumento da concentração de esporos e ao desencadeamento de produção de micotoxinas (Alvarez-Perez *et al.*, 2010; Prester *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011; Khan & Karuppayil, 2012; Viegas *et al.*, 2012; Thierry *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014).



Figura 2.12- Ovos contaminados pela presença de *Aspergillus fumigatus* (*The poultry site* - <http://www.thepoultrysite.com/articles/1048/what-measures-can-be-taken-to-keep-the-hatchery-free-of-the-fungus-aspergillus>).

Como já foi referido, os ambientes interiores de aviários são um reservatório oportuno para a germinação de hifas, conídios e outros componentes de Af como (1-3)- β -D-glucano, ergosterol, VOCs e micotoxinas, que podem depositar-se nas formulações alimentares, alimentos e água, gerando deficiências no armazenamento e conservação dos alimentos e/ou inadequada qualidade da água, assim como promove a distribuição do agente patogénico, leva ao desenvolvimento de surtos de AI, apresentando-se como um risco para a manutenção da Saúde Pública e Ambiental. A exposição ocupacional a ambientes avícolas, por avicultores e outros trabalhadores pode produzir efeitos adversos, aquando inalação ou ingestão (principais vias de exposição), levando ao desenvolvimento de hipersensibilidades, alergias ou pneumonias e asma derivada de uma baixa resposta imunitária; ou, num estado mais avançado, a toxicidade por micotoxinas e infeções por esporos fúngicos inalados, que escaparam à fagocitose e começam a germinar (Abad *et al.*, 2010; Prester *et al.*, 2010; Khan & Karuppayil, 2012; Viegas *et al.*, 2012).

Como controlo desta “praga” fúngica, a opção do uso de antifúngicos surge como primeira linha de combate da AI por Af, no entanto, a prevenção surge como melhor opção através da aplicação de protocolos e de medidas de biossegurança, monitorização nos ambientes avícolas.

2.2. Metodologias de Diagnóstico de AI e detecção de *Aspergillus fumigatus*

O diagnóstico de AI e detecção do patogénico *A. fumigatus* pode ocorrer *ante-mortem* e *post-mortem* (mais frequente, como atrás referido). Os testes de diagnóstico *ante-mortem* incluem testes bioquímicos, hematológicos, radiográficos, laparoscopia ou endoscopia, métodos utilizados para aves selvagens e não para aves de produção avícola, sendo que para estas a suspeita de AI deve identificar-se por alterações explícitas, já referidas anteriormente (diminuição de apetite, apatia, perda de peso, comportamento e postura anormal, dificuldade de respiração, entre outros). Após recolha de exsudados ou amostras histopatológicas, um diagnóstico decisivo baseia-se na identificação do fungo por isolamento e observação em culturas de meio seletivo, crescimento, análise microscópica e detecção do ADN por PCR (Nardoni *et al.*, 2006; Femenia *et al.*, 2007; Cacciuttolo *et al.*, 2009; Beernaert *et al.*, 2010).

3. Tratamento

A cura e o tratamento de AI em aves tem sido suplantada com inúmeros protocolos suportados pela aplicação de antifúngicos, uma vez não estar disponível nenhuma vacina que o faça. Perante a estagnação científica, a medida mais sensata e prudente para evitar aparecimento da doença é a prevenção quer em aves, quer no Homem ou mesmo em outras espécies de animais.

Nas aves, o objecto deste estudo, as terapias antifúngicas apresentam muitas vezes falhas, pois o tratamento aviário é um enigma, devido há limitação de farmacocinética dos antifúngicos em diferentes espécies ornitológicas, há incidência no foco alvo do fármaco sobre lesões nodulares e granulomatosas, obtendo-se um diagnóstico tardio de AI nas aves (Rochette *et al.*, 2003; Beernaert *et al.*, 2010). Como último recurso, nem sempre bem conseguido, recorre-se à remoção das lesões presentes nas vias respiratórias, dificultada pela localização e inacessibilidade das lesões, acopladas a uma terapia antifúngica sistémica agressiva, que pode deixar contusões cirúrgicas ou anestésicas (Beernaert *et al.*, 2010). Como tal, a única solução disponível para o tratamento de lesões em aves é a terapia antifúngica e para o aparecimento desta é a prevenção. Esta terapia é administrada de diferentes formas, se se tratar de uma terapia tópica administra-se por nebulização ou pulverização (inalação) irrigação cirúrgica das cavidades abdominais e lavagem dos sacos aéreos, se se tratar de uma terapia sistémica é aplicada por via intravenosa e oral (Rochette *et al.*, 2003; Beernaert *et al.*, 2010). Visto, o tratamento de AI em aves ser árduo, o controlo do ambiente como forma de prevenção da aspergilose aviária, é essencial, pelo que é também pertinente o estudo de isolados ambientais de *Aspergillus* para melhores soluções terapêuticas.

Já no caso do Homem tem-se verificado que a taxa de incidência de infeções fúngicas aumentou de forma abrupta, como aumento de infeções nosocomiais em pacientes de UCI e em pacientes com sistemas imunológicos debilitados, acompanhados também pela administração de antifúngicos profiláticos de largo espectro que podem promover a emergência de espécies ou estirpes mais resistentes (Sheehan *et al.*, 1999).

3.1 Antifúngicos

A indústria farmacêutica, na década de 1990, confrontada com o aumento da incidência de infeções fúngicas superficiais e sistémicas respondeu a esta problemática com a formulação de novos antifúngicos. O número destes agentes tem aumentado significativamente e progressos significativos foram feitos para determinar a aplicação em clínica, mas algumas infeções ainda se encontram difíceis de tratar e a emergência da resistência não têm ajudado (Sheehan *et al.*, 1999; Sobel & The Mycoses Study Group, 2000). O tratamento de infeções fúngicas encontra-se também um pouco limitado devido a questões relacionadas com a segurança, resistência e eficácia do fármaco. A evolução durante as duas últimas décadas mostrou avanços muito significativos na micologia médica (Figura 2.13).

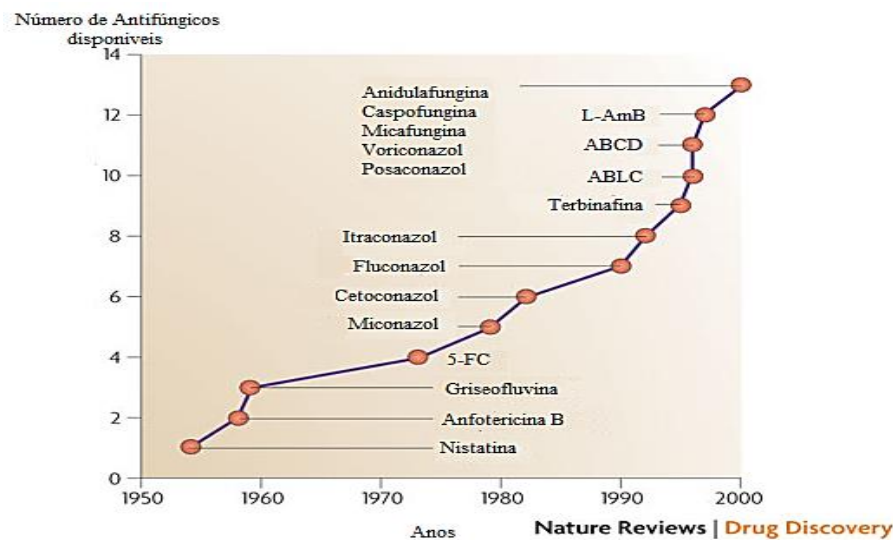


Figura 2.13– Evolução dos antifúngicos disponíveis de 1950 até 2000 (L-Amb: Anfotericina lipossomal; 5-FC: 5-Fluorocitosina; ABCD: Anfotericina B Dispersão coloidal; ABLC: Anfotericina complexo lipídico (Adaptado de Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010).

No combate à infeção por *Aspergillus* e tratamento da aspergilose invasiva são usadas várias classes de antifúngicos: do grupo das equinocandinas (inibidores da síntese de glucano) como por exemplo caspofungina, anidulafungina e micafungina, que tem mostrado alguns resultados promissores *in vivo* e *in vitro*, mas especialmente do grupo dos azóis (inibidores da síntese do ergosterol) (Patron, 2006; Fang *et al.*, 2013).

De facto, os azóis têm sido largamente utilizados no tratamento da AI quer no Homem (itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol), quer nas aves (clotrimazol, fluconazol, cetoconazol, miconazol, enilconazol e, mais frequentemente, itraconazol) (Snelders *et al.*, 2012; Gisi, 2013).

Dos antifúngicos mais usados, o enilconazol tem uma ação potente sobre os conídios de *A. fumigatus* e reduz a morbilidade das aves de aviário e pode também ser utilizado para tratamento tópico e ainda aplicado como desinfectante do ambiente, ar e incubadoras de ovos; o cetoconazol usa-se para infeções fúngicas sistémicas (não engloba AI) e localizadas, com bons resultados e o itraconazol comparado com os outros azóis é o que apresenta uma actividade mais eficaz contra Af, aplica-se não só a aves de aviário como também a aves de rapina e aquáticas, sem reacções de toxicidade (Rochette *et al.*, 2003).

Os triazóis de segunda geração, voriconazol, posaconazol e ravuconazol, caracterizam-se por terem maiores espectros de ação e actividade contra patógenos resistentes e emergentes pertencentes ao género *Aspergillus* (Snelders *et al.*, 2012).

Além da aplicação clínica e veterinária, o grupo dos azóis tem sido ainda empregado extensivamente na agricultura, dado serem eficazes na eliminação de fungos fitopatogénicos (Howard & Arendrup, 2011; Chowdhary *et al.*, 2013; Gisi, 2013). Os azóis de segunda geração, os triazóis, itraconazol, voriconazol e posaconazol, são fármacos recomendados e licenciados para o tratamento e profilaxia de aspergilose, prevenção e tratamento de doenças por parte de *Aspergillus* spp. Em 1992, o itraconazol (ITC), enquanto triazol de largo espectro, foi aprovado pela FDA e em comparação com outros azóis, mostrava um elevado espectro de ação contra espécies de *Aspergillus* e outras espécies de fungos, tendo sido usado como antifúngico profilático (Sheehan *et al.*, 1999; Maertens, 2004). No entanto, o itraconazol é actualmente desaconselhado como tratamento das infeções por *Aspergillus*, dada a elevada percentagem de resistência a este antifúngico (Pascual *et al.*, 2008; Chowdhary *et al.*, 2013; Gisi, 2013; Kleinkauf *et al.*, 2013).

Os azóis são antifúngicos com capacidade de inibir a via enzimática que sintetiza ergosterol, principal componente das membranas celulares fosfolipídicas dos fungos, a partir do lanosterol (Figura 2.14), pela inibição da enzima 1,4- α -dimetilase que é codificada, em *A. fumigatus*, pelo gene *Cyp51A* (codifica um precursor do citocromo P450), sendo que *Cyp51B* pode servir para funções redundantes. Dado que o ergosterol é um dos principais componentes envolvidos em funções biológicas, essencial para a regulação da fluidez, atividade e distribuição de proteínas e integridade celular, quando a síntese do ergosterol é inibida, por inibição de uma proteína pertencente à cascata enzimática cujo precursor é o gene *Cyp51A* (1,4- α -dimetilase), ocorre consequentemente a inibição do crescimento e proliferação celular do fungo. Esta inibição interfere com o transporte de alguns nutrientes, com a síntese da quitina e pode promover acumulação de intermediários tóxicos, pelo que o fungo se torna inviável (Denning *et al.*, 1998; Sheehan *et al.*, 1999; Waterman & Lepesheva, 2005; Alcazar-Fuoli, 2008b; Pfaller, 2012; Snelders, 2012).

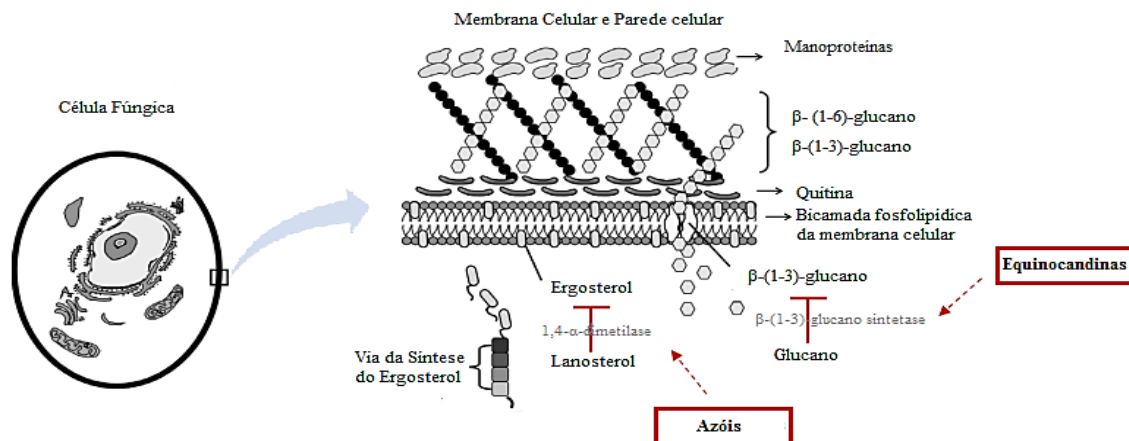


Figura 2.14– Esquema representando dos mecanismos de ação dos antifúngicos no tratamento de AI, com evidência de mecanismos de inibição da produção de ergosterol e β -(1-3)-glucano, pelos respectivos antifúngicos (Adaptado de Ashley *et al.*, 2006).

Deste modo, este mecanismo de ação promove o tratamento de AI, administrado quer por via intravenosa quer por via oral, sendo um instrumento de morte indireto para Af por aplicação de concentrações adequadas e eficazes.

3.2 Resistência

Durante algum tempo, o fenómeno de resistência adquirida por parte da aplicação dos antifúngicos azóis no tratamento de *Aspergillus spp.* foi desconhecido, mas esta evidência e prevalência tem evoluído nas últimas décadas, revelando ineficácia no combate do patogénico Af (Snelders *et al.*, 2008; Pfaller, 2012; Denning & Bowye, 2013). A resistência antifúngica pode ser descrita como uma resistência microbiológica ou clínica, ou a junção de ambas. A resistência microbiológica ocorre quando o crescimento do organismo patogénico é inibido na presença de uma elevada concentração do agente antimicrobiano e a resistência clínica é definida por uma alta probabilidade de falha terapêutica do agente antimicrobiano que inibe o organismo patogénico (Pfaller, 2012).

A resistência ao ITC é conhecida desde meados de 1990 (Alanio *et al.*, 2011). A resistência a triazóis por *Aspergillus fumigatus* foi descrita pela primeira vez em 1997, observada em isolados recolhidos na Califórnia no final de 1980. Em 1999 surge o relato da ocorrência de uma resistência a multiazóis em isolados de Af na Holanda, observada em isolados clínicos de pacientes portadores de AI (Verweij *et al.*, 2009b).

A prevalência da resistência de ITC em isolados clínicos, provenientes da Holanda, foi observada ao longo dos tempos, em que durante um período de 1994-1999, as estirpes de Af apresentavam resistências de 0% e num período de oito anos, essa prevalência aumentou para 6%, sendo que resultados *in vitro* se relacionam com resultados *in vivo* (Snelders *et al.*, 2008; Verweij *et al.*, 2009b; Pfaller, 2012). A emergência desta e de isolados resistentes a multi-azóis e ao ITC têm portanto evoluído (Verweij *et al.*, 2009b; Arendrup *et al.*, 2010; Alanio *et al.*, 2011; Pfaller, 2012; Chowdhary *et al.*, 2013; Kleinkauf, *et*

al., 2013). Este fato foi também identificado em outros países além da Holanda, como o caso de Canadá, Índia, China e Estados Unidos, talvez devido à aplicação de profilaxias antifúngicas (Howard & Arendrup, 2011).

Em suma, a resistência a determinados antifúngicos de azóis por *Aspergillus fumigatus* atualmente é vista como emergente e preocupante e cada vez mais como um proeminente problema clínico, veterinário e agrônomico, e portanto, com elevado impacto na Saúde Pública. Como tal, a emergência desta tem requerido a necessidade da aplicação de metodologias *in vitro* utilizadas como testes de suscetibilidade a antifúngicos, de modo a compreender quais as razões de propagação deste agente etiológico. Os testes de suscetibilidade permitem a aquisição de dados epidemiológicos, bem como novas abordagens em estudos ambientais, estudos de mecanismos moleculares e de ação, e efeitos e evoluções terapêuticas em isolados clínicos.

3.2.1. Mecanismo de Resistência

A resistência de *Aspergillus fumigatus* aos azóis deriva de um mecanismo de "defesa" associado a uma exposição contínua e prolongada a moléculas de azóis do ambiente (Figura 2.15). Os mecanismos moleculares que originam estas resistências têm-se observado em diversos estudos descritos na literatura. Os mais frequentes descrevem a ocorrência de uma mutação do gene *Cyp51A* em conjunto com uma repetição tandem (TR) em cadeia de 34-pb na região do promotor, combinada com uma mutação pontual do codão 98 no gene *Cyp51A*, conduzindo assim, a uma alteração do aminoácido, em que há substituições de uma leucina por uma histidina. Estas mutações conjuntas, TR34/L98H, alteram a proteína CYP51A, pelo que o fungo não se torna inviável na presença dos azóis.

Pensa-se que um dos factores que pode ter influenciado a emergência destes mecanismos de resistência é a exposição aos antifúngicos aplicados na agricultura (Snelders *et al.*, 2008; Howard *et al.*, 2009; Verweij *et al.*, 2009a; Verweij *et al.*, 2009b; Bueid *et al.*, 2010; Arendrup, 2011; Pfaller, 2012; Snelders *et al.*, 2012; Linden *et al.*, 2013; Kleinkauf *et al.*, 2013).

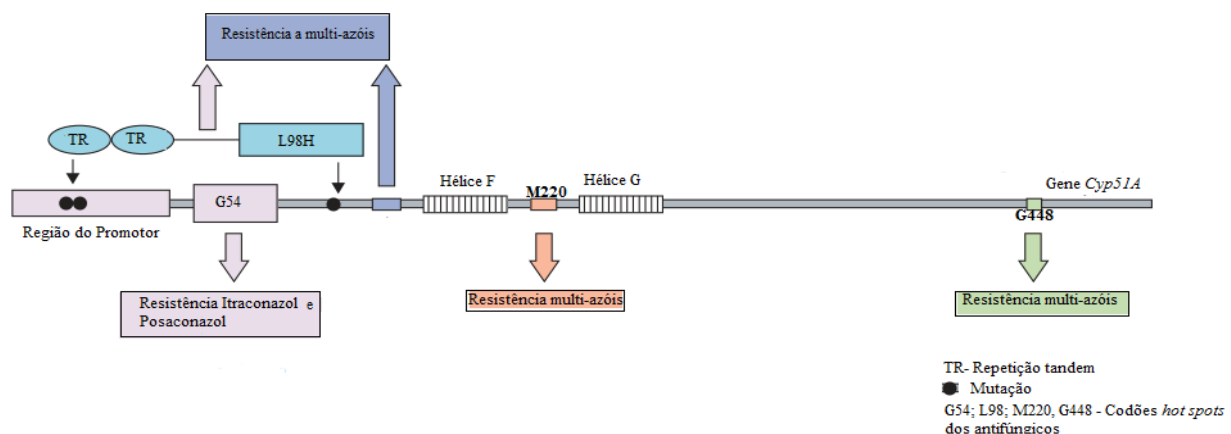


Figura 2.15- Mecanismos de resistência de *Cyp51A* de *Aspergillus fumigatus* sob ação de antifúngicos azóis (Adaptado de Verweij *et al.*, 2009b).

Estes mecanismos de resistência preocupam, não só a farmacocinética e terapêuticas médicas, como também a agronomia, devido às possíveis resistências que podem advir por uso de fitofarmacêuticos de azóis aplicados para proteção de plantas para controlar fungos em vegetais, frutas e frutos, cereais, leguminosas e em solos agrícolas (Denning & Bowye, 2013; Kleinkauf *et al.*, 2013). Estas aplicações levam indiretamente à dispersão e acumulação em diferenciados ambientes/nichos ecológicos (desde solo, ar a ambientes aquáticos) destas moléculas químicas de azóis, ao aumento gradual da resistência em Af, aumenta os custos na Saúde Pública. Os azóis fitofungicidas (essencialmente triazóis) compartilham a mesma procedência dos antifúngicos médicos e o mesmo mecanismo de inibição, descritos como inibidores de dimetilase (IsD) (Snelders *et al.*, 2008; Verweij *et al.*, 2009a; Verweij *et al.*, 2009b; Arendrup *et al.*, 2010; Chowdhary *et al.*, 2013; Denning & Bowye, 2013; Gisi, 2013; Kleinkauf *et al.*, 2013). O mecanismo de resistência atrás referido - de mutação TR34/L98H em *Cyp51A* - tem apresentado cruzamento de resistências, não só para os três triazóis, como de modo similar para os cinco fungicidas IsD agrícolas, propiconazol, bromuconazol, tebuconazol, epoxiconazol e difenoconazol (Tabela 2.4) (Chowdhary *et al.*, 2013; Denning & Bowye, 2013; Gisi 2013).

Tabela 2.4– Fungicidas IsD agrícolas no mercado (compostos com atividade contra *Aspergillus fumigatus*) (Adaptado de Chowdhary *et al.*, 2013; Denning & Bowye, 2013; Gisi, 2013).

Período de introdução	Agricultura	Medicina e Medicina Veterinária
1970 -1979	Imazalil ^b Propiconazol ^c	Econazol ^b
1980-1989	Prochloraz ^b Tebuconazol, difenoconazol ^c	Enilconazol (veterinária) ^b Cetoconazol (veterinária/clinica) ^c
1990 - 1999	Metconazol ^b Bromuconazol ^c	Itraconazol (sistémico/clinica/veterinária) ^b Saperconazol ^c (veterinária/clinica)
2000 - 2009		Voriconzol; Posaconazol; Ravaconazol (todos sistémicos) ^b (veterinária/clinica)

Os antifúngicos aplicados em agro-culturas podem ser aplicados, juntamente com outros fungicidas ou individualmente, antes das culturas das sementes, sobre estas e nos solos para proteção destes contra patogénicos e pragas; pós-colheita para proteção da deterioração alimentar, durante a cadeia transportadora e armazenamento para proteção de possíveis desenvolvimentos de fungos e metabolitos secundários. Não só em culturas estes azóis são aplicados, também em tratamentos veterinários com bastante frequência para o controlo da Saúde Animal, como já referido anteriormente, como por exemplo aplicação de enilconazol, ou o imazalil aplicado não só na agricultura, mas também usado na proteção das aves de aviários contra Af e ao qual foi verificada a resistência em aves portadores de AI (Beernaert *et al.*, 2009; Gisi, 2013). A aplicação destes IsD carece de alguma preocupação, pois

^b Forte atividade

^c Moderada atividade

como são usados para fins curativos da Saúde Animal, Humana e da produção agrícola, a sua administração nestes ambientes pode causar uma pressão selectiva de estirpes resistentes de origem ambiental ou animal e, conseqüentemente, induzir o aumento de prevalência de isolados resistentes. Estes, por sua vez, ao encontrar os requisitos favoráveis ao crescimento de Af (referidos anteriormente) vão disseminar no ambiente (Reis *et al.*, 2012; Snelders *et al.*, 2012; Gisi, 2013; McVey *et al.*, 2013).

Como reportado recentemente, a problemática da resistência aos antifúngicos azóis (médicos, veterinários e agrícolas) por *Aspergillus fumigatus* e nomeadamente o mecanismo de resistência molecular de TR34/ L98H pode continuar a espalhar-se mundialmente, como se tem verificado por estudos de epidemiologia molecular de resistências a azóis em alguns países europeus como Alemanha (dados de 2010 e 2012), Holanda, Áustria e Espanha (dados de 2010), Áustria, Bélgica, França e Itália (dados de 2009) (Mortensen *et al.*, 2010; Kleinkauf *et al.*, 2013). As pressões exercidas pelo e sobre o ambiente devido ao uso de fitofármacos como moléculas análogas aos azóis clínicos levam a que isolados de Af exibam resistências adquiridas quando eram intrinsecamente susceptíveis (por pressão selectiva ambiental, como atrás referido), podendo gerar um aumento da prevalência de resistências de *A. fumigatus sensu stricto*. Por outro lado, pode também induzir um aumento das populações de espécies crípticas do complexo *Fumigati*, descritas com uma reduzida susceptibilidade aos antifúngicos, ou mesmo de *A. lentulus* (já detetado no ambiente em vários estudos) apresenta uma resistência primária para triazóis, *in vivo* e *in vitro* (Snelders *et al.*, 2008; Mortensen *et al.*, 2010; Alanio *et al.*, 2011; Van der Linde *et al.*, 2011a; Van der Linde *et al.*, 2011b; Kleinkauf *et al.*, 2013).

Como verificado, estudos sobre a eficácia da terapêutica fúngica e sobre os mecanismos de resistência de Af e aos azóis devem ser efetuados para impedir a ocorrência de efeitos adversos e irreversíveis. Para melhorar esta problemática, a aplicação de metodologias *in vitro* utilizadas para determinação de testes de susceptibilidade aos antifúngicos, determinando de forma mais apropriada, a sensibilidade ou resistência de espécies de *Aspergillus* de isolados clínicos e ambientais e aplicação de métodos moleculares podem permitir a deteção destes mecanismos de resistência e seleção dos agentes com actividade para uma determinada infeção adequando, assim, melhor a terapêutica (Mortensen *et al.*, 2010; Pfaller, 2012; Kleinkauf *et al.*, 2013). Pode ser aplicada uma metodologia de *screening*, em que se utiliza um meio de cultura com antifúngico (a determinada concentração), verificando-se depois a ocorrência ou não de crescimento das estirpes, evidenciando assim, resistência ou sensibilidade, respectivamente, a esse antifúngico.

Podem também ser aplicados métodos de referência, como a metodologia estipulada pela *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2008), ou estipulada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (M38-A method), sendo que existem outras metodologias disponíveis, como o método Etest® (AB bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (Alanio *et al.*, 2011) que detetam a sensibilidade de fungos filamentosos e leveduriformes, permitindo, de forma precisa e reprodutível, o conhecimento referente há sensibilidade dos fungos isolados e assim, conduzir para melhor opção clínica (Rex *et al.*, 2001; Johnson, 2008; Cannon *et al.*, 2009; Kleinkauf *et al.*, 2013).

III. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de investigação conducente à presente tese de mestrado foi realizado no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Departamento de Doenças Infeciosas, Unidade de Referência de Doenças Sistémicas e Zoonoses, Laboratório de *Candida*, *Aspergillus*, Dermatófitos e outros fungos emergentes.

No projeto de investigação proposto foi efetuado o estudo molecular de espécies crípticas de *Aspergillus*, a partir de isolados fúngicos recolhidos de amostras biológicas de aves com aspergilose e também de diferentes ambientes. Os 108 isolados fúngicos foram recolhidos pelo Veterinary Department da University of California, Davis (Califórnia, EUA) e processados inicialmente no Centre of Investigation and Medical Research (San Jose, Califórnia, EUA). Posteriormente, os isolados recolhidos foram enviados adsorvidos em discos de papel de filtro (com um diâmetro de 2 cm) para o INSA. Aqui, foi efetuada a metodologia considerada de referência para a identificação de *Aspergillus* e deteção de espécies crípticas.

Por conseguinte, realizaram-se vários procedimentos com vista à identificação das espécies em questão e que envolvem:

- a) Cultura dos discos com suspensão de esporos em meio de Agar Malte com Cloranfenicol a 0,05%;
- b) Análise macro e microscópica das colónias fúngicas obtidas após incubação a 27,5°C durante 3 - 5 dias;
- c) Confirmação da pureza das colónias e das características esperadas para o género *Aspergillus*;
- d) Suspensão dos esporos em meio PBST (*Phosphate Buffered Saline with Tween*) com Glicerol e conservação dos mesmos a -70°C;
- e) Suspensão dos esporos em meio PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Denning, *et. al.*, 1992), com conservação dos mesmos a 4°C;
- f) Extração do ADN a partir da suspensão de esporos em PBS;
- g) Realização de PCR (Técnica de polimerização de ADN em cadeia - *Polymerase Chain Reaction*) para amplificação das regiões ITS, genes que codificam a β -tubulina ou a calmodulina;
- h) Electroforese em gel de agarose;
- i) Purificação dos produtos de PCR;
- j) Sequenciação pelo *Método de Sanger*, na Unidade de Tecnologia e Inovação (UTIQ) do INSA;
- k) Análise do electroferograma no programa de análise *Chromas Lite* e obtenção da sequência de ADN corrigida do fragmento amplificado;
- l) Cruzamento das sequências obtidas no *Chromas Lite* com as bases de dados *CBS Database KNAW* (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>) e *BLAST NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Comparação da sequência obtida com as depositadas nas bases de dados e seleção da mais apropriada e com maior homologia.

Por analogia testou-se a suscetibilidade aos antifúngicos de 108 isolados de *Aspergillus*, após confirmação da sua identificação por sequenciação.

1. Identificação de espécies de 108 isolados de *Aspergillus*

(a) Isolamento e cultura em meio de malte com Cloranfenicol

As suspensões de esporos adsorvidas aos 108 discos (proveniência de espécies Tabela 3.1a e 1b)) enviados foram processadas colocando cada disco individualmente em caixas de Petri com meio de malte agar (MEA) com Cloranfenicol (0,05 g/L) – (Glucose 1% (p/v); Extrato de levedura 0,3 (p/v); Peptona 0,5% (p/v); Extrato de malte 0,3% (p/v); agar 2% (p/v) e água desionizada q.b.; ao meio liquefeito adicionou-se 0,05% (p/v) de Cloranfenicol diluídos em 0,5% (v/v) de etanol. Adição do Cloranfenicol tem com base a inibição do desenvolvimento bacteriano, evitando assim, contaminações deste género. A inoculação dos meios de cultura com os discos ocorreu em diferentes fases (20 discos por lote) para aperfeiçoar a técnica e para evitar as contaminações cruzadas. Estas inoculações foram efetuadas na Câmara de Segurança Biológica #1 (TradeLabor). Posteriormente, ocorreu a incubação dos meios de cultura inoculados durante 3-5 dias na estufa a 27,5°C (LabMetro).

A Tabela 3.1a) dispõe a caracterização das espécies dos 108 isolados, segundo análise de algumas fontes, como *Clements Checklist, 2007; Bird Guide - The Cornell lab of Ornithology; Animal Diversity Web; National Audubon Society Birds* e *Matias et al., 2007*, de modo a intercepar fatores existentes nos nichos ecológicos específicos com a existência de IA.

Tabela 3.1a)- Descriminação de caraterísticas das espécies em estudo e proveniência das estirpes clínicas.


Família	Proveniência das Estirpes	Imagem	Distribuição	Tipo de Ave	Produto
Accipitridae	Águia-de-cabeça-branca <i>Haliaeetus leucocephalus</i> (n=1)		Costa do Alasca, Canadá; Norte do Oceano Pacífico e Atlântico	Zona costeira	Saco aéreo
	Águia-real <i>Aquila chrysaetos</i> (n=2)		América do Norte; Europa (Norte a Sul de Portugal)	Distribuição variada do Ártico ao Deserto	Saco aéreo; Lesão
	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i> (n=10)		América do Norte; Norte do Oceano Pacífico e Atlântico	Terrestre	Pulmão; Saco aéreo; Massa; Aglomerados traqueais

Tabela 3.1a)- Descriminação de características das espécies em estudo e proveniência das estirpes clínicas (continuação).










Família	Proveniência das Estirpes	Imagem	Distribuição	Tipo de Ave	Produto
Accipitridae	Gavião-papa-gafanhoto <i>Buteo swainsoni</i> (n=1)		Noroeste da América; Argentina, Brasil e Paraguai (Inverno)	Terrestre	Saco aéreo
	Falcão vermelho <i>Buteo lineatus</i> (n=1)		Noroeste da América; Califórnia	Terrestre	Aglomera- do traqueal
	Ave sem especificação (n=1)				Baço
	Ave sem especificação (n=3)				Pulmão
Alcidae	Airo (comum) <i>Uria aalge</i> (n=9)		Norte do Oceano Pacífico e Atlântico; Europa (Sul e Norte de Portugal); Mediterrâneo	Marinha	Pulmão; Saco aéreo cervical e abdominal; Lavado traqueal
	Papagaio-do-mar <i>Fratercula corniculata</i> (n=2)		Norte do Oceano Pacífico; Sul da Califórnia; Este da Sibéria; Japão	Marinha	Saco aéreo; Rim direito
Anatidae	Pato-de-rabo-alçado-americano <i>Oxyura jamaicensis</i> (n=1)		América do Norte e Sul; Europa (Portugal)	Estuarina, ribeirinha	Esterno
Ardeidae	Goraz <i>Nycticorax nycticorax</i> (n=1)		América do Norte; Europa (Centro e Sul de Portugal); Norte do Oceano Índico	Zonas húmidas, águas doces e salobras; Pântanos	Massa pulmonar
Cacatuidae	Caturra <i>Nymphicus hollandicus</i> (n=2)		Austrália; Portugal (Centro e Sul)	Costeira e tropical	Pulmão; Traqueia
Falconidae	Falcão-peregrino <i>Falco peregrinus</i> (n=1)		América do Norte; Europa (Norte a Sul de Portugal)	Costeira	Saco aéreo
	Ave sem especificação (n=1)				Saco aéreo
Gaviidae	Mobelha-pequena <i>Gavia stellata</i> (n=2)		América do Norte; Norte do Oceano Pacífico e Atlântico; Europa (Sul e Norte de Portugal); Mediterrâneo	Marinha	Saco aéreo abdominal; Saco aéreo

Tabela 3.1a)- Descriminação de características das espécies em estudo e proveniência das estirpes clínicas (continuação).










Família	Proveniência das Estirpes	Imagem	Distribuição	Tipo de Ave	Produto
Laridae	Gaivota ocidental <i>Larus occidentalis</i> (n=1)		Zona Costeira do Pacífico	Marinha	Saco aéreo cervical
	Gaivota-de-bico-riscado <i>Larus delawarensis</i> (n=1)		América do Norte; México, Bahamas e Antilhas; Europa (Norte a Sul de Portugal)	Marinha e terrestre	Lavado traqueal
Phalacrocoracidae	Biguá-sargento <i>Phalacrocorax penicillatus</i> (n=2)		Zona Costeiras do Pacífico; Norte da Califórnia	Marinha	Lavado traqueal; Saco aéreo cervical
	Corvo-marinho-d'orelhas <i>Phalacrocorax auritus</i> (n=2)		Norte da América; Norte do Oceano Atlântico e Pacífico	Ribeirinha de água doce	Saco aéreo; Esfregaço oral
Phasianidae	Galinha <i>Gallus gallus</i> (n=1)		Norte da Ásia (Nativa); Distribuição Mundial	Doméstica e de criação	Baço
Pelecanidae	Pelicano pardo <i>Pelecanus occidentalis</i> (n=1)		Oeste e Sul da Califórnia; Costa do México; Venezuela e Colômbia	Costeira	Lavado traqueal
Psittacidae	Arara azul grande <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (n=1)		Brasil, Noroeste e adjacente ao Paraguai; Bolívia	Tropical	Abcesso/tumor
	Arara-canindé <i>Ara araraun</i> (n=2)		América Central e do Sul	Tropical	Aglomerado e lavado traqueal
	Ave sem especificação (n=2)				Saco aéreo; Lavado traqueal
Strigidae	Coruja águia da Virgínia <i>Bubo virginianus</i> (n=1)		Norte da América; Brasil; México, Argentina	Tropical; tundras	Olho

Tabela 3.1b) Proveniência das estirpes ambientais.

Proveniência das estirpes		Amostras (n=53)
Ambiente	Água	4
	Ar	49

(b, c) Análise Macro e Microscópica dos isolados de *Aspergillus*

A colónia fúngica obtida a partir de crescimento dos discos foi sujeita a observação macroscópica, de forma a confirmar as características específicas e assegurar a inexistência de fungos contaminantes. Para tal, foram tidas em conta as seguintes características: cor da colónia (frente e reverso), textura, elevação, margens e produção de pigmento.

Paralelamente analisou-se as características microscópicas utilizando o microscópio óptico (Leitz). Esta análise foi concretizada por observação de cortes microscópicos efetuados com lanceta e corados com azul de lactofenol (Lactophenol Blue Solution, Fluka). As características microscópicas (cor das hifas, estruturas de reprodução sexuada e assexuada: conidióforo, conídios, presença de métula, localização das fiáides) foram comparadas com atlas de identificação (Campbell *et al.*, 1996).

(d, e) Suspensão dos esporos em PBST com Glicerol e PBS, com conservação a -70°C e 4°C

Decorrido o período de crescimento das colónias e após confirmação das características morfológicas coincidentes com o género *Aspergillus*, procedeu-se ao armazenamento e conservação de uma suspensão de esporos do fungo, possibilitando o enriquecimento da coleção de culturas do laboratório e permitindo futuras utilizações desta estirpe.

Da cultura dos fungos retirou-se uma quantidade de esporos com uma zaragatoa estéril embebida em PBST na Câmara de Segurança Biológica #1. Seguidamente, suspendeu-se os esporos recolhidos na zaragatoa num volume de 450 µL de PBST para criotubo de 2 mL, ao qual se adiciona, no final, 2 gotas de glicerol estéril (87 % p/p). Os criotubos foram armazenados a -70°C no Ultracongelador (REVCO).

Da mesma cultura recolheu-se ainda uma nova quantidade de esporos, com uma nova zaragatoa embebida em PBS (pH 7,5). Os esporos foram suspensos num volume de 450 µL de PBS, presente num *eppendorf* de 1,5 mL e os *eppendorfs* foram posteriormente conservados a 4°C. A suspensão de esporos assim preparada em *eppendorfs* foi utilizada para a extração de ADN das espécies em análise.

(f) Extração de ADN

A extração do ADN dos esporos de *Aspergillus* realizou-se através de um *kit* de extração de ADN “High Pure PCR Template Preparation Kit” sustentado pelo de versão Julho 2007, Categoria Número 11 796 828 001, referente á Seção 2.6 e 2.8, disponível em https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11796828001_en_10.pdf.

(g) Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR)

A amplificação por processo PCR (esquematização ponto 1.7.1, Fig. 3.1) do ADN extraído baseou-se em três protocolos diferentes. Nos três protocolos de reação de PCR foram realizados, em simultâneo, um controlo negativo, constituído por uma mistura reacional semelhante à das reações de PCR, mas

contendo água ultrapura em substituição ao ADN. Idêntica e simultaneamente para cada reação de PCR foi realizado um controlo positivo constituído por uma mistura reacional semelhante à das reações de PCR, mas contendo ADN de uma estirpe de referência. Ambos os controlos foram sujeitos às mesmas condições das outras amostras de PCR e efectuados para detectar a existência de possíveis contaminações e de inibições da reação de PCR, assim como assegurar a qualidade dos reagentes, meios de cultura, o controlo da precisão da preparação dos agentes antifúngicos e a reprodutibilidade dos testes.

i. Protocolo de PCR por *primers* ITS, β -tubulina e calmodulina

Um dos protocolos inicialmente aplicado utiliza os *primers* que permitem a amplificação da região ITS, para a leitura das cadeias de ADN, suportado pelo protocolo referenciado por Henry *et al.*, 2000. Embora utilizado no estudo da amplificação da região do ADN para o estudo das espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus*, este não foi suficientemente discriminatório para tal finalidade. Como remediação aplicou-se outros dois protocolos, um deles utiliza os *primers* de β -tubulina referenciado por Ana Alastruey Izquierdo (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008a) e o outro protocolo usa *primers* de calmodulina referenciado por Hong *et al.*, 2005. As condições reacionais de PCR podem ser observadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Condições reacionais de PCR para protocolos de *primers* ITS, β -tubulina e calmodulina.

<i>Oligonucleótidos iniciadores</i>	<i>Sequência nucleotídica (5' → 3')</i>
<i>primer forward -ITS1</i>	(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3')
<i>primer reverse -ITS4</i>	(5'- AGGAGGTGATAACTATCG -3')
<i>primer forward -Btb2a</i>	(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')
<i>primer reverse -Btb2b</i>	(5'- TGGGAGTCACATCATAGGGAACCG -3')
<i>primer forward -Cmd5</i>	(5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3')
<i>primer reverse -Cmd6</i>	(5'- GGCTATCTCCAGTATTGCACC -3')

As reações de PCR baseadas no protocolo do ITS foram preparadas com um volume final de 50,00 μ L. Na Câmara de Segurança Biológica #2 (TELSTAR BIO-II-A) foram colocados 45,00 μ L da mistura reacional, num *eppendorf*, composto pelos reagentes expostos na Tabela 3.3 e os restantes 5,00 μ L de composto advieram do ADN de cada estirpe adicionadas na Câmara de Adição do ADN (TradeLabor (IPAC)).

Tabela 3.3- Composição das misturas reacionais para amplificação da região ITS.

Reagentes	Concentração Final dos Reagentes	Volume para cada amostra (µL)
ITS1- Sequência oligonucleotídica iniciadora (Fw)	0,3 µM	1,50
ITS4-Sequência oligonucleotídica iniciadora (Rev)	0,3 µM	1,50
dNTP	0,1 µM (cada)	2,00
MgCl ₂	1,5 mM	3,00
<i>Taq polimerase</i>	1,5 U	0,30
Tampão	1x (5 mM Tris-HCl ; pH 8,3; 25 mM KCl; 0,75 mM MgCl ₂)	5,00
Água (H ₂ O)		29,00
ADN	10 - 50 ng/µL	5,00
Volume final amostra		50,00

As reações de PCR foram processadas num termociclador (LabMetro, BioRad) durante um período de 180 minutos e acompanhadas por uma ventilação externa do ar condicionado, a 17°C para promover um ambiente apropriado a este processo. As condições utilizadas apresentam-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4- Condições de PCR para amplificação da região ITS.

<i>Fase de PCR</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Δt</i>	<i>Nº de ciclos</i>
Desnaturação inicial	95	4,5 min	1
Desnaturação	95	30 seg	
Hibridação	50	30 seg	40
Extensão	72	1 min	
Extensão Final	72	3 min	1

As reações de PCR baseadas no protocolo da β-tubulina foram preparadas com um volume final de 25,00 µL. Na Câmara de Fluxo Laminar #2 (TELSTAR BIO-II-A) foram colocados 21,00 µL de mistura reacional, num *ependorf*, composto pelos reagentes expostos na Tabela 3.5 e os restantes 4,00 µL de composto advieram do ADN de cada estirpe adicionadas na Câmara de Adição do ADN (TradeLabor (IPAC)).

Tabela 3.5- Composição das misturas reacionais para amplificação do gene que codifica a β -tubulina.

Reagentes	Concentração Final dos Reagentes	Volume para cada amostra (μ L)
Btb2a - Sequência oligonucleotídica iniciadora (Fw)	0,4 μ M	1,20
Btb2b - Sequência oligonucleotídica iniciadora (Rev)	0,4 μ M	1,20
dNTP	0,2 μ M (cada)	1,25
MgCl ₂	2 mM	1,00
<i>Taq polimerase</i>	1 U	0,30
Tampão	1x (5 mM Tris-HCl ; pH 8,3 ; 25 mM KCl ; 0,75 mM MgCl ₂)	2,50
Água (H ₂ O)		13,55
ADN	10-50 ng/ μ L	5,00
Volume final amostra		25,00

As reações de PCR foram processadas num termociclador (LabMetro, BioRad) durante um período de 180 minutos e acompanhadas por uma ventilação externa do ar condicionado, a 17°C para promover um ambiente apropriado a este processo. As condições utilizadas apresentam-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 -Condições de PCR para amplificação do gene que codifica a β -tubulina.

<i>Fase de PCR</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Δt</i>	<i>Nº de ciclos</i>
Desnaturação inicial	94	5min	1
Desnaturação	94	30 seg	
Hibridação	55	45 seg	32
Extensão	72	2 min	
Extensão Final	72	5 min	1

As reações de PCR baseadas no protocolo de calmodulina foram preparadas com um volume final de 25,00 μ L. Na Câmara de Segurança Biológica #2 (TELSTAR BIO-II-A) foram colocados 21,00 μ L de mistura reacional, num *ependorf*, compostos por os reagentes expostos na Tabela 3.7 e os restantes 4,00 μ L de composto advieram do ADN de cada estirpe adicionadas na Câmara de Adição do ADN (TradeLabor (IPAC)).

Tabela 3.7- Composição das misturas reacionais para amplificação do gene que codifica a calmodulina

Reagentes	Concentração Final dos Reagentes	Volume para cada amostra (µL)
Cmd5 - Sequência oligonucleotídica iniciadora (Fw)	0,3 µM	1,50
Cmd6 - Sequência oligonucleotídica iniciadora (Rev)	0,3 µM	1,50
dNTP	0,1 µM (cada)	2,00
MgCl ₂	1,5 mM	3,00
<i>Taq polimerase</i>	1,5 U	0,30
Tampão	1x (5 mM Tris-HCl ; pH 8,3 ; 25 mM KCl ; 0,75 mM MgCl ₂)	5,00
Água (H ₂ O)		29,00
ADN	10- 50 ng/µL	5,00
Volume final amostra		50,00

As reações de PCR foram processadas num termociclador (LabMetro, BioRad) durante um período de 180 minutos e acompanhadas por uma ventilação externa do ar condicionado, a 17°C para promover um ambiente apropriado a este processo. As condições utilizadas apresentam-se na Tabela 3.8.

Tabela 3.8- Condições de PCR para amplificação do gene que codifica a calmodulina.

Fase de PCR	T (°C)	Δt	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	10 min	1
Desnaturação	95	30 seg	
Hibridação	55	30 seg	38
Extensão	72	1 min	
Extensão Final	72	5 min	1

ii. Otimização das condições de PCR

Inicialmente, durante vários ensaios, usou-se os protocolos de β-tubulina e calmodulina, mas devido a resultados insatisfatórios houve necessidade de otimizar as condições das reações de PCR. Portanto, a otimização dos requisitos considerados para um melhor rendimento da reação do ADN dos *Aspergillus* consistiu em empregar *beads* (illustra™, GE Healthcare), pequenas esferas brancas compostas por concentrações de MgCl₂ (15 mM), dNTP's (200 µM em 10 mM Tris-HCl, pH 9) e KCl (50 mM), adaptadas a este ADN e aliadas à exclusividade de uso dos *primers* Cmd5 e Cmd6. A este preparado foi acrescentado reagentes, 17,0 µL água ultrapura e e 1,5 µL de cada *primer* (Cmd5 e Cmd6) às *beads* na Câmara de Segurança biológica (TELSTAR BIO-II-A). Seguidamente, adicionou-se aos *ependorfs* já

com as *beads* dissolvidas, de um volume de 20,0 µL, um volume de 4,0 µL de ADN (20-50 ng), obtido após a extração de ADN, na Câmara de Adição do ADN (TradeLabor (IPAC)).

(h) Electroforese em Gel de Agarose

A electroforese em gel de agarose (Seaken®, Lonza, Gel Strength: 1%) separa os fragmentos de ADN, de acordo com o seu peso molecular. Esta técnica foi utilizada para confirmar o sucesso ou insucesso da amplificação de cada fragmento de ADN, quer pelos *primers* ITS, *primers* β-tubulina quer pelos *primers* calmodulina. Utilizou-se gel de agarose (Seaken®, Lonza) para se separar fragmentos de ADN lineares com um peso molecular entre 100-1500 pares de bases (pb). A preparação dos géis de agarose incluía uma solução tamponada de TBE 0,5x a pH 8,0 (44,5 mM Tris-base, 44,5 mM ácido bórico, 1,0 mM EDTA) e 1,80 g de agarose, dissolvida após um aquecimento prévio, durante 1 minuto, no microondas (Sanyo). Subsequentemente, arrefeceu-se esta solução e adicionou-se 2,0 µL de Gel Red (SYTO®, 60 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain - 5 mM Solution in DMSO). De seguida, verteu-se a mistura num molde ou cama do gel complementada com o pente com os números de poços pretendidos no gel e aguardou-se cerca de 20 minutos, para ocorrer a polimerização do gel de agarose. Concluído o tempo estimado, depositou-se o gel numa tina de electroforese horizontal, contendo uma solução tamponada de TBE 0,5x a pH 8,0. No primeiro poço do gel de agarose introduziu-se 2,0 µL de marcador ADN de 100 pb (100-1200 pb) (*Gene Ruler*™, Fermentas, *DNA Ladder Mix*, 0,5 µg/µL) juntamente com 3,0 µL de *Loading Buffer* (Azul de bromofenol- 2,6 -dibromo- 4-[3-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)]). O fragmento que se pretende amplificar tem um tamanho de aproximadamente 500 pb, pelo que é essencial a inclusão do marcador de pesos moleculares que permita saber se ocorreu amplificação da região pretendida. Nos outros poços do gel foram colocados 3,0 µL de *Loading Buffer* juntamente com 10,0 µL de cada um dos produtos de PCR.

As electroforeses foram realizadas sob uma diferença de potencial constante de 120 V, do cátodo para o ânodo, durante 20 minutos, a partir do equipamento de corrida (BioRad: Power PC Basic). Após a *terminus* da electroforese, colocou-se o gel de agarose num transiluminador acoplado a uma câmara de vídeo, *Gel Doc* (Gel ChemiDoc) e a um programa informático *Quantity One* (Biorad), que por exposição à luz ultravioleta possibilitou a visualização da fluorescência das bandas na região dos 500 pb.

(i) Purificação dos Produtos de PCR

Como requisito para a sequenciação dos produtos de PCR, a purificação dos mesmos, através do reagente *ExoSAP-IT*™ (GE™ Healthcare) torna-se necessária para eliminar os eventuais dNTP's não consumidos durante a reação de PCR, bem como contaminantes (excesso de *primers*) que possam interferir com as reações de sequenciação.

O *ExoSAP-IT* "limpa" a mistura de PCR utilizando duas enzimas hidrolíticas, *exonuclease I* (*Exo I*) e *rShrimp fosfatase alcalina* (rSAP), dissolvidas num tampão especialmente formulado. Nesta formulação os dNTP's são removidos pela *Exo I* e a rSAP remove iniciadores residuais de cadeia simples e qualquer ADN de cadeia simples irrelevante produzido na PCR, num período de 30 minutos (Figura 3.1).

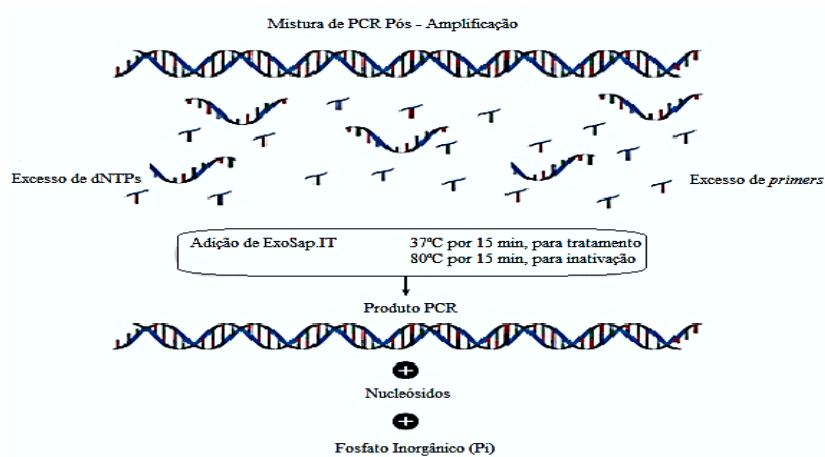


Figura 3.1- Purificação dos produtos de PCR por *ExoSAP-IT* (<http://www.affymetrix.com/estore/browse/promotionLandingPage.jsp?promotionId=promo440001&navModeValuе=&isHtmlStatic=true&aIdValue>)

Adicionou-se 1,6 µL de *ExoSAP-IT*TM a 4,0 µL de cada um dos produtos de PCR obtidos, na Câmara de Manipulação Pós-PCR (TradLabor SF). As misturas de purificação foram submetidas às seguintes condições: 37°C, durante 15 minutos e a um aquecimento de 80°C durante mais 15 minutos, que inativou o reagente *Exosap*. A temperatura decresceu até a um ponto estável de 10°C, por tempo indefinido, no termociclador (Biorad).

(j) Sequenciação e Sequenciação por Método de Sanger

As reações de sequenciação do ADN foram processadas num termociclador (LabMetro, BioRad) durante um período de 3 horas, novamente acompanhadas por uma ventilação externa do ar condicionado, a 17°C para promover um ambiente apropriado a este processo. As reações de sequenciação foram aplicadas aos três protocolos anteriormente descritos e as suas condições podem ser observadas na tabela 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12. Os requisitos para esta sequenciação envolveram o uso discriminado do *primer forward* que lê a cadeia 5'-3' e cada *ependorf* apresentava um volume final de 9,0 µL da mistura reacional de reagentes e acrescentou-se 1,0 µL de produto de PCR purificado, na Câmara de Manipulação Pós-PCR, perfazendo um volume final de 10,0 µL. Nesta reação só se implementou o uso da sequência oligonucleotídica iniciadora (Fw), uma vez o uso da sequência oligonucleotídica iniciadora (REV) não apresentar resultados divergentes e que apresentam a mesma complementação, após análise de dados obtidos.

Tabela 3.9- Condições reacionais de Sequenciação para protocolos de sequenciação utilizando os *primers* ITS, β -tubulina e calmodulina.

Reagentes	Volume para cada amostra (μL)
Sequência oligonucleotídica iniciadora (Fw) ITS1; Btb2a e Cmd5	2,0
<i>Big dye</i> ® (kit, terminator v1.1; Ref: 4336778)	1,0
Tampão <i>Big Dye</i> ® (Ref: 4336699)	3,0
Água (H_2O)	3,0
Produto PCR	1,0
Volume final amostra (<i>Mix</i>)	10,0

Tabela 3.10- Condições de Sequenciação do Produto de PCR para ITS

<i>Fase de Sequenciação</i>	<i>T</i> ($^{\circ}\text{C}$)	Δt	<i>Nº de ciclos</i>
Desnaturação inicial	96	5 seg	1
Desnaturação	96	10 seg	
Hibridação	50	5 seg	30
Extensão	60	4 min	
Extensão Final	72	5 min	1

Tabela 3.11- Condições de Sequenciação do Produto de PCR para β -tubulina.

<i>Fase de Sequenciação</i>	<i>T</i> ($^{\circ}\text{C}$)	Δt	<i>Nº de ciclos</i>
Desnaturação inicial	94	3 min	1
Desnaturação	96	10 seg	
Hibridação	50	5 seg	25
Extensão	52	4 min	
Extensão Final	60	5 min	1

Tabela 3.12- Condições de Sequenciação do Produto de PCR para calmodulina

<i>Fase de Sequenciação</i>	<i>T</i> ($^{\circ}\text{C}$)	Δt	<i>Nº de ciclos</i>
Desnaturação inicial	96	5 seg	1
Desnaturação	96	10 seg	
Hibridação	50	5 seg	32
Extensão	60	4 min	
Extensão Final	72	5 min	1

(j, k, l) Análise nucleotídica no *Chromas Lite* e Cruzamento de dados obtidos no *Chromas Lite* com as bases de dados *CBS Database* e *BLAST NCBI*

Os resultados obtidos da sequenciação do ADN pelo sequenciador (ABI 3130xl, Genetic Analyser) da UTIQ (esquemática ponto 1.7.1, Fig. 3.2) através da detecção a laser dos fluorocromos (nucleótidos com fluorescência) permitiram analisar computacionalmente os electroferogramas, uma vez haver emissão de luz a um comprimento de onda diferente, quando excitado pelo laser e portanto todas as quatro bases podem ser detetadas e distinguidas por quatro cores diferentes (Figura 3.2).

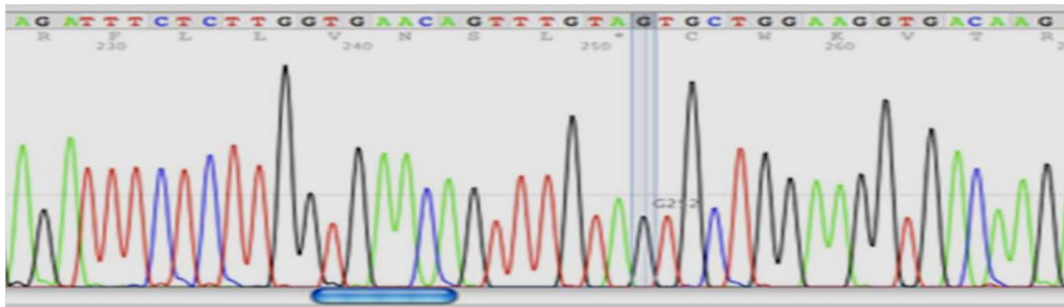


Figura 3.2– Análise computacional através da sequenciação surgindo ordenadamente por cor de fluorescência. A sequência da cadeia molde pode então ser lida. Os nucleótidos denominados com N que não puderam ser classificados (Lodish et al., 1999).

A recolha dos dados para um *software* converte o sinal de fluorescência em dados digitais e regista-os num arquivo podendo ser analisado pelo programa *Chromas Lite*. Segundo este programa pode-se verificar a inexistência ou existência de veracidade da amplificação e sequenciação do ADN em estudo. A inexistência de dados pode advir de falhas operacionais nas etapas anteriores ou contaminações externas resultando um electroferograma com nucleótidos denominados com N, não podem ser classificados e contrariam a veracidade de amplificações observadas por electroferogramas de ótimas amplificações e uma leitura sequencial até cerca de 500 pb.

Segundo os dados provenientes da análise de sequenciação pelo *Método de Sanger* ocorreu a determinação das espécies crípticas do género *Aspergillus* nomeadamente de *Aspergillus fumigatus* consultando os resultados presentes nas bases de dados *CBS Database* (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>) e *BLAST NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências obtidas foram correlacionadas com as sequências das bases ao nível dos parâmetros de *Max score*, *Total score*, *Query coverage* e *E-value*. A identificação final das espécies a analisar resulta de uma análise conjunta dos parâmetros acima, que devem compreender um valor estatístico (*E value*) próximo de zero (0) ou mesmo zero e uma percentagem de homologia ou similaridade superior a 98%, para que se considerem os resultados obtidos como fiáveis e exatos. Deste modo, valores de *E value* superiores a zero conjuntamente com valores de homologia inferiores a 98% são rejeitados. Para uma análise mais eficaz e precisa, é efectuado o referido estudo nas duas bases de dados acima mencionadas e os valores obtidos são comparados e complementados.

2. Testes de Suscetibilidade a Antifúngicos

Perante as necessidades encontradas, existem várias metodologias disponíveis que detetam a sensibilidade de fungos filamentosos e leveduriformes, permitindo, de forma precisa e reprodutível, o conhecimento referente à sensibilidade dos fungos isolados conduzindo à melhor escolha clínica (Rex *et al.*, 2001; Johnson, 2008; Cannon *et al.*, 2009; Kleinkauf *et al.*, 2013). Estas metodologias englobam os métodos de referência EUCAST (E. DEF9.1, 2008) e CLSI (M38-A method) bem como o método Etest® (AB bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (Alanio *et al.*, 2011). A CLSI apresenta o procedimento BMD como teste de suscetibilidade a antifúngicos de espécies de *Aspergillus*. Este método é também partilhado pela EUCAST, que apresenta também o método EUCAST BMD (Pfaller *et al.*, 2003; Pfaller *et al.*, 2009). Diferem entre si na preparação, concentração e quantificação do inóculo. Por outro lado, um teste de suscetibilidade de fácil aplicação e que permite efetuar uma monitorização rápida da suscetibilidade: o teste *4-Well Azole - Agar Dilution Plates*, procedimento resultante do uso de placas compostas por meio de agar – azol com quatro poços. Este meio tem como base o meio RPMI 1640 suplementado com agar e azóis - Itraconazol (4 mg/L), Voriconazol (1 mg/L) e Posaconazol (0,5 mg/L), colocados em três poços diferentes. Cada poço é inoculado com pequenas suspensões de esporos do agente patogénico cuja suscetibilidade se pretende determinar, neste caso *A. fumigatus* (Van der Linden *et al.*, 2013).

Após adaptação de procedimentos que averigam a resistência de culturas a moléculas de azóis, aplicou-se ao estudo a metodologia descrita por Morio *et al.*, 2012, que descreve a implementação de um *screening* em placas de meio de cultura de agar - RPMI 1640 com uma concentração de 4 mg/L de ITC. Por amostragem da coleção de estirpes inicial, testaram-se 33 estirpes de *A. fumigatus* das 108 isoladas, representadas por n=21 de estirpes clínicas e n=12 de estirpes ambientais, selecionadas de acordo com as informações referentes aos seus pontos de recolha/colheita (de forma a serem o mais diversificadas possível), estirpes estas anteriormente amplificadas e cujo gene da calmodulina foi sequenciado (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2008; Morio *et al.*, 2012).

O Itraconazol foi o antifúngico selecionado para efetuar um primeiro *screening* na resistência destas estirpes aos azóis.

a) Elaboração do meio de cultura de Agar - RPMI 1640 com ITC

Numa primeira fase, tarou-se um frasco *schott* de volume de 500 mL, na balança (METTER TOLEDO, Labmetro) e introduziu-se uma quantidade de 10,40 g de Meio RPMI- 1640, em pó (*Cell Culture Tested*, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France); 30,03 g de MOPs, em pó ($C_7H_{15}NO_5S$, Sigma-Aldrich, *Life Science*); 18,00 g de D-Glucose, em pó ($C_6H_{12}O_6$, MERCK), sendo que todos os componentes foram precisamente pesados na balança (METTER TOLEDO, Labmetro). De modo, a perfazer o volume pretendido, acrescentou-se cerca de 400 mL de água desionizada ao preparado

anterior. Após esta reconstituição, imiscuiu-se uma porção não discriminada de pastilhas de KOH (MERCK) ao preparado, de onde desencadeou a mudança de pH de 5,5 para 7,0, registada por um elétrodo de pH (MEtrohm, Labmetro) e sob agitação de um agitador magnético (Tecnicláb, SBS®). Assim que houve estabilização do pH, a 7, acrescentou-se ao frasco *schott* agar de modo a ter uma concentração final de 1,5% (p/v) na balança (Labcal, Labmetro). Paralelamente à etapa anterior preparou-se uma solução 4 mg/L do antifúngico Itraconazol (JANSSEN PHARMACEUTIC, Belgium). Para tal, pesou-se com rigor, numa balança analítica (Labmetro), 2 mg do pó do antifúngico, sob normas de segurança e condições de assepsia. De seguida adicionou-se, à temperatura ambiente, 5 mL de DMSO ((CH)₃SO, MERCK).

O meio RPMI inicialmente preparado no frasco *schott* foi sujeito a uma esterilização a 105°C, durante 15 minutos, na autoclave (British Sterilizer), resultando num meio estéril, com ausência de qualquer tipo de microrganismo. A este foi adicionado a solução de Itraconazol com DMSO, que não foi autoclavada face às suas características farmacológicas. O meio assim preparado foi de seguida distribuído em placas de Petri de 15 mL.

Todas as placas foram envolvidas com parafilme e armazenadas a 5°C, uma vez este meio contaminasse com muita facilidade.

b) Implementação dos testes de suscetibilidade sobre as estirpes selecionadas segundo o local de recolha/colheita

Na Câmara de Segurança Biológica #1 (TradeLabor) procedeu-se ao estudo da sensibilidade das diferentes estirpes isoladas perante exposição direta ao ITC. Em cada caixa de Petri de 15 mL foram plaqueados com uma zaragatoa 0,5 McF (*McFarland*) derivados de uma suspensão de esporos da estirpe específica, resultado de um passo intermediário.

Para tal, efetuaram-se novos reisolamentos de estirpes selecionadas da coleção de culturas estudada. Estes reisolamentos foram feitos em placas de Malte com Cloranfenicol (0,05 g/L) e posterior crescimento na estufa (LabMetro), a 27,5°C. Após a obtenção de culturas em fase de esporulação (cerca de 5 dias), adicionou-se, com uma pipeta de Pasteur, 3 gotas de água destilada estéril. Com o auxílio de uma zaragatoa, raspou-se a superfície das colónias fúngicas, obtendo-se assim uma suspensão densa de esporos. O volume da suspensão foi totalmente aspirado da placa com uma nova pipeta de Pasteur, sendo este introduzido num tubo com 5 mL de água destilada estéril e a densidade da suspensão medida num densitómetro (Densimat, bioMérieux). O densitómetro permitiu a determinação da quantidade de esporos suspensos pretendida, 0,5 McF, efeito da adição intervalada de gotas da suspensão de esporos no tubo de água destilada.

Após acerto da densidade da suspensão de esporos, realizou-se o seu espalhamento sobre placas de RPMI com ITC estéreis com uma zaragatoa previamente embebida e escorrida na suspensão. Todas as placas com meio teste plaqueadas foram inoculadas na estufa (LabMetro), a 27,5°C, durante um período

de 48 a 72 horas, possibilitando a determinação da resistência/susceptibilidade da estirpe estudada. A ausência de crescimento fúngico visível nas placas RPMI-ITC com concentração definida de antifúngico permitem concluir que a estirpe em questão não consegue crescer em presença de uma concentração de ITC ≥ 4 mg/L (valor de MIC que indica o *endpoint* de susceptibilidade) (Morio *et al.*, 2012). A interpretação desses resultados permite estabelecer analogias entre a capacidade de crescimento e as MIC, resistência ou susceptibilidade do fungo filamentosos. Estas avaliações sobre o modo de resistência das espécies fúngicas testadas face ao antifúngico e suas concentrações advieram de valores de *breakpoints* determinados pela EUCAST-AFST, após inúmeros estudos laboratoriais em estirpes de *Aspergillus* spp. Estes valores de *breakpoints* definidos inicialmente foram revistos após dois anos, uma vez poder ocorrer alterações das concentrações que geram resistência (Verweij *et al.*, 2009; EUCAST, 2012).

Para validação do teste em aplicação recorreu-se à inoculação, em simultâneo com as estirpes a testar, de duas espécies que servirão como controlo negativo e uma espécie que servirá de controlo positivo. As duas estirpes usadas como controlo negativo, *A. fumigatus* (HSMA23) e *A. niger* (110072), uma vez resultados anteriores demonstrarem que ambas as espécies eram conhecidas como espécies resistentes ao ITC demonstraram efeito contrário, considerando-se assim como controlo negativos. Como tal, a espécie anteriormente referida por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., considerada muito resistente a este antifúngico (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008) representa o controlo positivo. Tal como o fungo em estudo, *Aspergillus fumigatus*, esta espécie controlo apresenta semelhanças de habitat, frequência de aparecimento no solo e em resíduos vegetais, modo de infeção e associações como em casos de micoses invasivas em doentes imunocomprometidos (Zhang *et al.*, 2006).

IV. RESULTADOS

1. Identificação de *Aspergillus* e detecção de espécies crípticas

Foram aplicadas todas as metodologias enunciadas anteriormente a 108 isolados fúngicos inoculados em meio de cultura Malte com Cloranfenicol.

Procedeu-se à identificação polifásica das culturas recorrendo-se a observações macro e microscópica das colónias de *Aspergillus*. De acordo com a análise macroscópica ilustrada pela Figura 4.1, remete-se para as características específicas desta espécie *A. fumigatus*, frequentemente citadas na literatura e comprovadas neste estudo. Porém, de entre os 108 isolados três destes apresentaram uma identificação morfológica duvidosa, sendo a identificação molecular um parâmetro decisivo e relevante para a confirmação das espécies. Este fungo filamentososo, de modo geral a todos os isolados observados, apresentou colónias de aspeto aveludado, com conidióforos hialinos e hifas aéreas do mesmo tom. Observaram-se colónias com tonalidades brancas, principalmente na periferia, devido à imaturidade da colónia, visto a pigmentação dos esporos se relacionar com a maturação do fungo; exibiu também um crescimento radial (do centro para a periferia), no micélio aéreo na superfície, sendo o seu reverso de tonalidade creme, após exposição a temperaturas de 27,5 - 37°C, na estufa, durante 3 dias. Da análise microscópica, também representada na Figura 4.1, observaram-se os conidióforos curtos, lisos sem irregularidades, hialinos mas de coloração azul-esverdeada, devido à tonalidade do azul de lactofenol (Lactophenol Blue Solution, Fluka). Os conidióforos terminam com vesículas redondas e subglobosas, com fiáldes unisseriadas (ausência de métula) e dispostas de forma colunar, sobre as vesículas, mas apenas localizadas na parte superior. Os conídios são pequenos, incolores e apresentam uma forma globosa.



Figura 4.1- Ilustração do fungo patogénico *Aspergillus fumigatus* em cultura de Malte com Cloranfenicol, após crescimento de 3 dias, a 27,5°C. A1) Micélio aéreo *A. fumigatus*; A2) Micélio vegetativo; B) Morfologia microscópica da estrutura de *Aspergillus fumigatus* por observação ao microscópio digital com ampliação de 400x.

Embora as condições de assepsia do ambiente da Câmara de Segurança Biológica sejam sempre consideradas e asseguradas, podem ocorrer contaminações; desta forma, todas as placas de Petri com

evidências de contaminações por outros fungos (macroscopicamente distinguíveis – colónias com morfologias diferentes) eram eliminadas e processava-se um novo isolamento do fungo a estudar. Por eventualidade de se requerer mais colónias para subseqüentes testes e para novos isolamentos recorreu-se à inoculação dos esporos de *A. fumigatus* em meio Malte com Cloranfenicol, que por etapas anteriores foram suspensos em PBST com glicerol e crioconservados, colocados a incubar a 27,5°C, durante 3 dias.

Após confirmação das características das colónias, segue-se para o processo de análise individual e comparativa do material genético de cada uma das estirpes. Para tal, utilizaram-se na fase final, géis de agarose observados com o auxílio de um transiluminador. Esta análise, ilustrada pelas imagens dos géis abaixo (Figura 4.2), pôde confirmar o sucesso ou fracasso da amplificação do ADN, das condições (térmicas e periódicas) das reações de PCR e da eficiência da extração do ADN.

Como referido no capítulo III, foram empregados três protocolos distintos, tanto nas condições reacionais como nos genes utilizados, como tal, os resultados tendem a ser desiguais. Na Figura 4.2 observou-se a eficiência de todas etapas processuais pela presença da banda de amplificação na região dos 500-600 pb, a dimensão pretendida do fragmento.

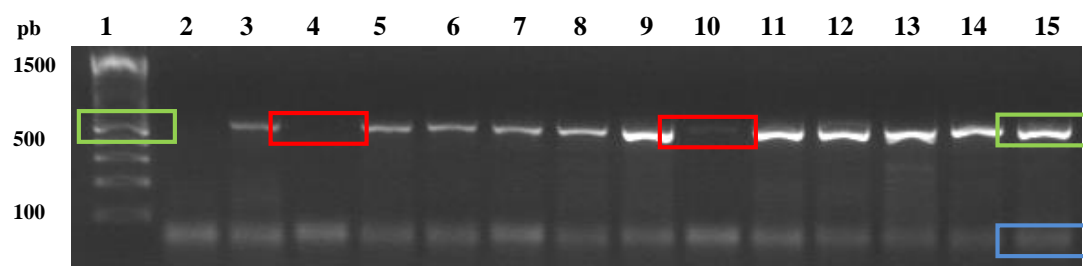


Figura 4. 2- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de *Aspergillus* pelos *primers cmd5* e *cmd6* (poços 1-15). Poço 1- Marcador ADN *Gene Ruler*TM (Fermentas); Poço 2 - Controle negativo; Poço 3 - Controle positivo; Poços 4 a 15 - Produto PCR com ADN de *Aspergillus*; Retângulo verde – região dos 500 pb amplificada; Retângulo vermelho – região não amplificada; Retângulo azul- resíduos da PCR.

Após análise do resultado anteriormente obtido, conclui-se que apenas os produtos da PCR presentes nos poços 4 e 10 não amplificaram na região demarcada pelo retângulo vermelho correspondente à região dos 500 pb. O retângulo azul evidencia a presença de dímeros de *primers*, resíduos do processo da PCR. Apesar da obtenção de dois resultados insatisfatórios, todas as restantes amostras apresentaram uma amplificação favorável na zona pretendida promovida pelo uso do par de *primers cmd5* e *cmd6* (que amplificam o gene que codifica a calmodulina). De forma a obter resultados positivos a partir destes dois resultados negativos pode optar-se por duas soluções, 1) Repetição da reação de PCR, com o mesmo ADN, confirmando a presença desse mesmo ADN por amplificação (caso tenha ocorrido alguma falha na reação de amplificação) e 2) Extração de novo ADN (caso tenha ocorrido alguma falha na reação de extração).

No caso em que a aplicabilidade dos *primers cmd* for repetidamente ineficiente, sem qualquer razão aparente para tal, utiliza-se uma metodologia complementar, aplicando-se os *primers BT* que amplificam o gene que codifica a β -tubulina (Figura 4.3).

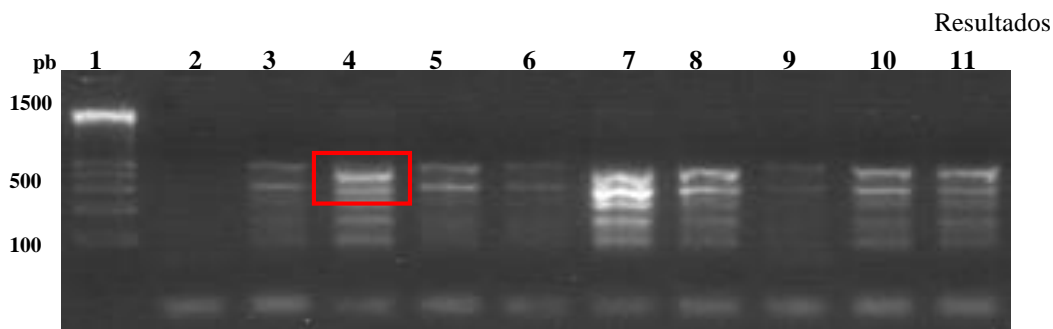


Figura 4. 3- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de *Aspergillus* pelos *primers BT* (poços 1-11). Poço 1- Marcador ADN *Gene Ruler*TM (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 11 - Produto PCR com ADN de *Aspergillus*; Retângulo vermelho – região amplificada se hibridização não específica do *primer BT*.

Compreendeu-se que o resultado acima evidenciou que o uso do marcador β -tubulina não discriminou especificamente a amplificação do produto da PCR com ADN apenas na região pretendida, expondo um conjunto de bandas bem visíveis nas regiões de 100, 200, 300, 400 e 500 pb. Este fenómeno assinalado pelo retângulo vermelho designa-se hibridização não específica do *primer BT*. Como alternativa, optava-se pelas duas soluções acima referenciadas ou pelo corte do fragmento pretendido diretamente do gel de agarose e a partir daí proceder à sua análise imediata. Embora os resultados obtidos tivessem sido aparentemente controversos, selecionaram-se, ocasionalmente, 5 amostras para Sequenciação por Método de *Sanger*, representadas pelos poços de 4 a 11 correspondentes às estirpes 09-03; 09-20; 09-21; 09-22; 09-23; 09-47; 08-139 e 08-140, respetivamente.

Dados os bons resultados obtidos com os *primers cmd* e considerando que os resultados obtidos pelos *primers BT* não foram suficientemente discriminatórios para estas estirpes (mas até então discriminatórios para outras estudadas no Laboratório de *Candida*, *Aspergillus*, Dermatófitos e outros fungos emergentes) a sua aplicação neste estudo foi residual. No entanto, a Figura 4.4 apresenta um dos géis de agarose onde se observou mais uma vez a presença de hibridização não específica do *primer*, mas também a presença de uma contaminação exibida pela presença de banda no poço do controlo negativo, do qual deveria estar ausente (retângulo vermelho). Todavia, as contaminações não são estritamente relacionadas com a utilização dos *primers BT*, podem ter ocorrido por contaminação ambiental da *mix* reaccional de PCR.

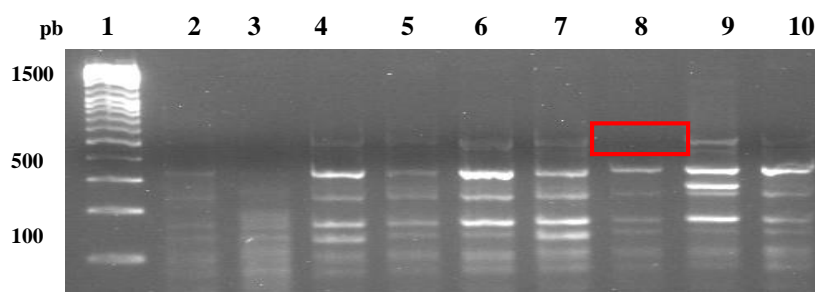


Figura 4.4- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de *Aspergillus* pelo *primer BT* (poços 1-10). Poço 1- Marcador ADN *Gene Ruler*TM (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 10 - Produto PCR com ADN de *Aspergillus*. Retângulo vermelho – região não amplificada do *primer BT*.

Alguns fatores exteriores à reação podem ainda alterar os resultados obtidos, como o caso de variações de temperatura, que possivelmente terão alterado alguns dos resultados obtidos (Figura 4.5), como evidenciado pela inexistência de banda de amplificação (retângulo vermelho). Por indisponibilidade das *beads* efetuaram-se as misturas reacionais da PCR de forma individual e convencional, segundo o protocolo apresentado na Tabela 3.7, seção i), o que dificultou a obtenção dos resultados desejados, uma vez que o calor extremo possivelmente afetou as condições de manipulação e armazenamento dos reagentes adicionados na formulação das misturas reacionais da PCR. Apesar de todas as medidas utilizadas para contornar esse problema (utilização constante de cuvetes de gelo, manipulação em sala climatizada para a reação de PCR, aumento da concentração de $MgCl_2$ na mistura reacional) as temperaturas elevadas dificultaram a obtenção de bons resultados e alteraram-nos pelo período de um mês.

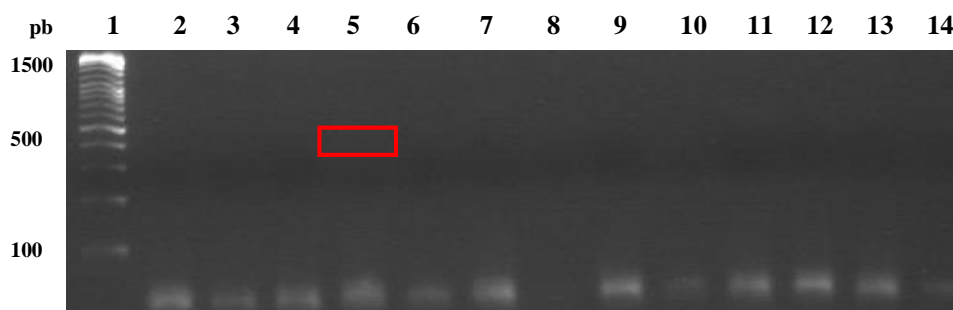


Figura 4.5- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de *Aspergillus* pelos *primers cmd5* e *cmd6* (poços 1-14). Poço 1- Marcador ADN *Gene Ruler*TM (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 14 - Produto PCR com ADN de *Aspergillus*; Retângulo vermelho – região não amplificada do *primers cmd5* e *cmd6*.

Segundo os resultados anteriores, a ausência da amplificação do ADN nos produtos da PCR foram óbvias.

Após normalização das condições externas e internas do local de manipulação das técnicas e receção das *beads* repetiram-se todos os resultados rejeitados, obtendo-se assim, resultados satisfatórios, como observado na Figura 4.6, assinalado pelo retângulo verde. Na ilustração da amplificação do ADN na região dos 500 pb, assinalou-se a ausência de dímeros de *primers* pelo retângulo azul.

Concluiu-se então, que as variações de temperatura e as *beads*, por terem condições ótimas na mistura reacional, são dois fatores que influenciam de forma essencial a obtenção de resultados e que a negatividade dos resultados obtidos não estava relacionada com o ADN/estirpe estudada, mas sim com condições que influenciaram a prossecução da técnica de PCR/gel de agarose.

A título exemplificativo, a Figura 4.6 mostra os resultados esperados e obtidos para as 108 estirpes analisadas.

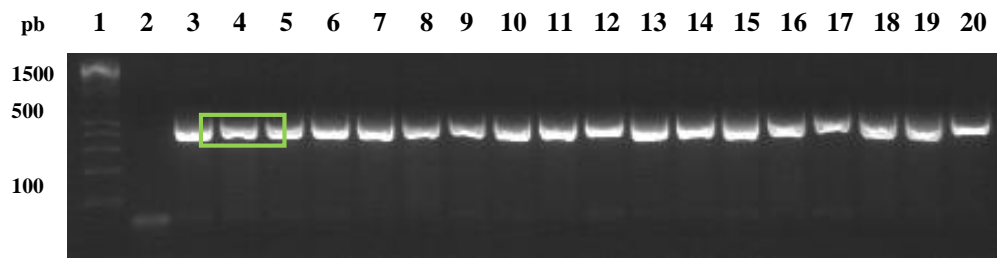


Figura 4.6- Perfil de electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação por PCR do ADN de *Aspergillus* pelos primers *cmd5* e *cmd6* (poços 1-20). Poço 1- Marcador ADN *Gene Ruler*TM (Fermentas); Poço 2 - Controlo negativo; Poço 3 - Controlo positivo; Poços 4 a 20 - Produto PCR com ADN de *Aspergillus*; Retângulo verde – região dos 500 pb amplificada.

Mediante a execução de todas as etapas metodológicas para as 108 estirpes a diagnosticar, (por vezes com necessidade de três réplicas processuais devido a erros), efetuaram-se as análises das sequências, de modo a descobrir a existência ou não de espécies ditas crípticas. A conclusão sobre a identificação destas espécies foi suportada pela análise de sequências e comparação de resultados com duas bases de dados, a *CBS Database* (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/>) e o *BLAST NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparando com a sequência exata obtida pelo programa *Chromas Lite* (Figura 4.7). Após cruzamento de resultados e ponderação sobre a percentagem de similaridade de homologia, que deveria ser superior ou igual a 98%, obtiveram-se a identificação das 107 estirpes estudadas (Tabela 4.1).

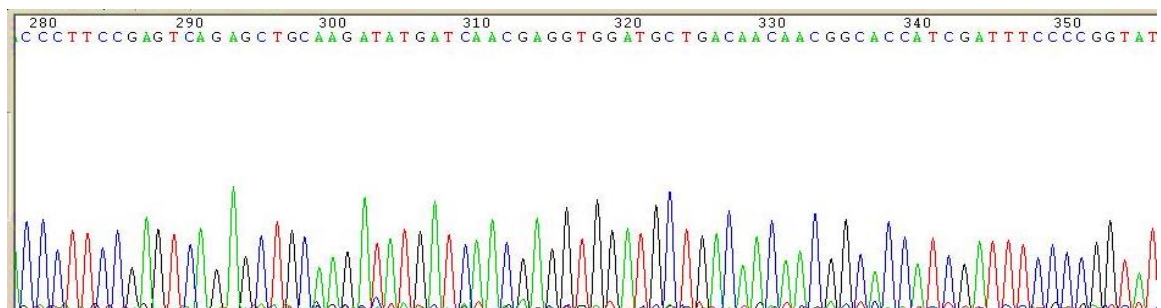


Figura 4.7- Electroferograma parcial do gene da calmodulina de uma estirpe de *Aspergillus*, obtido através do programa informático *Chromas Lite*, expondo os nucleótidos, segundo a sua cor de fluorescência e registo.

No decorrer do processo de sequenciação podem ocorrer erros, que no entanto podem ser remediados executando novamente toda a metodologia laboratorial, caso se verifiquem erros nas sequências obtidas ou caso as sequências não sejam suficientemente discriminatórias. Se existem resultados duvidosos da amplificação de produto de PCR (por exemplo, bandas ténues ou obtenção de mais que um fragmento), a probabilidade de ocorrerem erros de leituras das sequências deve já ser esperada; apesar de por norma para a sequenciação só seguirem amostras cujos resultados obtidos por PCR e visualizados em gel de agarose sejam bastante conclusivos, no que respeita à positividade da amostra. Como explicitado na metodologia, secção (j), foi efetuada apenas a sequenciação da cadeia *forward* no caso de amplificação das regiões ITS e calmodulina, mas no caso da amplificação do fragmento que codifica para a β -tubulina

efetua-se a sequenciação das cadeias *forward* e *reverse*; já que a sequenciação de amostras só embarca a utilização de *primers* ITS e *cmd* que leiam essa cadeia, uma vez que a sequência oligonucleotídica iniciadora da cadeia complementar não apresenta resultados divergentes e apresenta a mesma complementação, após análise de dados obtidos. No entanto, na mistura reacional implementa-se ambos os *primers* BT, FW (*forward*) e REV (*reverse*), de tal maneira que possibilite a obtenção da sequência específica por complementaridade das duas sequências obtidas, segundo a leitura dos dois *primers*.

Tabela 4.1- Caracterização das estirpes de *Aspergillus*, identificação morfológica e molecular das espécies crípticas.

Identificação das Estripes	Proveniência das Estirpes	Produto	Identificação Morfológica	Identificação Molecular
08-91	Papagaio-do-mar <i>Fratercula corniculata</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-95	Mobelha-pequena <i>Gavia stellate</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-99	Airo (comum) <i>Uria aalge</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-131	Goraz <i>Nycticorax nycticorax</i>	Massa pulmonar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-132	Águia-de-cabeça-branca <i>Haliaeetus leucocephalus</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-133	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-134	Ave sem especificação Família <i>Accipitridae</i>	Baço	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-135	Ave sem especificação Família <i>Falconidae</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-136	Galinha <i>Gallus gallus</i>	Baço	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-137	Águia-real <i>Aquila chrysaetos</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-138	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-139	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-140	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-141	Ave sem especificação Família <i>Accipitridae</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
08-142	Ave sem especificação Família <i>Accipitridae</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-03	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Massa	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-04	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-05	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>

Tabela 4.1- Caracterização das estirpes de *Aspergillus*, identificação morfológica e molecular das espécies crípticas (continuação).

Identificação das Estripes	Proveniência das Estirpes	Produto	Identificação Morfológica	Identificação Molecular
09-06	Ave sem especificação Família <i>Accipitridae</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-07	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-08	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-09	Falcão-peregrino <i>Falco peregrinus</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-10	Arara azul grande <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Abcesso/ tumor	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-11	Caturra <i>Nymphicus hollandicus</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-12	Águia-real <i>Aquila chysaetos</i>	Lesão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-13	Ave sem especificação Família <i>Psittacidae</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-14	Ave sem especificação Família <i>Psittacidae</i>	Aglomerado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-15	Gavião-papa-gafanhoto <i>Buteo swainsoni</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-16	Pato-de-rabo-alçado- americano <i>Oxyura jamaicensis</i>	Esterno	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-17	Coruja águia da Virginia <i>Bubo virginianus</i>	Olho	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-18	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-19	Caturra <i>Nymphicus hollandicus</i>	Traqueia	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-20	Arara-canidé <i>Ara araraun</i>	Nasal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-21	Arara-canidé <i>Ara araraun</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-22	Caturra <i>Nymphicus hollandicus</i>	Pulmão	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-23	Falcão vermelho <i>Buteo lineatus</i>	Aglomerado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-25	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Saco aéreo cervical	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-27	Papagaio-do-mar <i>Fratercula corniculata</i>	Rim direito	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-28	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>

Tabela 4.1- Caracterização das estirpes de *Aspergillus*, identificação morfológica e molecular das espécies crípticas (continuação).

Identificação das Estripes	Proveniência das Estirpes	Produto	Identificação Morfológica	Identificação Molecular
09-29	Pelicano pardo <i>Pelecanus occidentalis</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-30	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Saco aéreo abdominal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-31	Corvo-marinho-d'orelhas <i>Phalacrocorax auritus</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-32	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-33	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	
09-34	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-35	Biguá-sargento <i>Phalacrocorax penicillatus</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-37	Mobelha-pequena <i>Gavia stellate</i>	Saco aéreo	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-38	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-39	Gaivota ocidental <i>Larus occidentalis</i>	Saco aéreo cervical	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-40	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-41	Biguá-sargento <i>Phalacrocorax penicillatus</i>	Saco aéreo cervical	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-42	Airo comum <i>Uria aalge</i>	Saco aéreo abdominal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-43	Corvo-marinho-d'orelhas <i>Phalacrocorax auritus</i>	Esfregaço oral (amígdalas)	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-44	Gaivota-de-bico-riscado <i>Larus delawarensis</i>	Lavado traqueal	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-45	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-46	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-47	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-48	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-49	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-50	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-51	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-52	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-53	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-54	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-55	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-56	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-57	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-58	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>

Tabela 4.1- Caracterização das estirpes de *Aspergillus*, identificação morfológica e molecular das espécies crípticas (continuação).

Identificação das Estripes	Proveniência das Estirpes	Produto	Identificação Morfológica	Identificação Molecular
09-59	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-60	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-61	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-62	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-63	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-64	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-65	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-66	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-67	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-68	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-69	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-70	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-71	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-72	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-73	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-74	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-75	Ambiente	Água	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-76	Ambiente	Água	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-77	Ambiente	Água	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-78	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-79	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-80	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-81	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-82	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-83	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-84	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-85	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-86	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-87	Ambiente	Ar	<i>A. spp</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-88	Ambiente	Ar	<i>A. spp</i>	<i>Emericella nidulans</i> var. <i>lata</i> / <i>Erimicella nidulans</i>
09-89	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-90	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-91	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-92	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-93	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-94	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-95	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-96	Ambiente	Ar	<i>A. spp</i>	<i>Emericella echinulata</i>
09-97	Ambiente	Ar	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
09-98	Ambiente	Água	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>

Para a investigação das espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus* foram analisados dados morfológicos e moleculares. Os resultados indicados na tabela 4.1 resultaram de observações macro e microscópicas, de comparações efetuadas entre os isolados e ainda, do uso de marcadores específicos que codificam partes dos constituintes deste fungo. Sendo as espécies crípticas classificadas como indistintas morfológicamente, mas como espécies diferentes (diferenças essas a nível molecular), só mesmo a análise molecular e sequenciação do ADN possibilitará a diferenciação de espécies morfológicamente tão semelhantes (Bickford *et al.*, 2007).

Uma grande percentagem de isolados (74 em 108) apresentou homologia de 99% ou 100% e elevada similaridade de pb com as espécies *Aspergillus phialiseptatus* Kwon-Chung 1975 e *Aspergillus neollipticus* Kozak 1989. Verificou-se, após pesquisa efetuada, que se tratava de identificações sinónimas de *Aspergillus fumigatus*, descritas como espécies anamorfias integradas no complexo *Fumigatis* de *Aspergillus* e não como espécies crípticas de *Aspergillus fumigatus*, considerado como uma espécie única (Latgé, 1999; Varga & Tóth, 2003; Hong *et al.*, 2005; Samson *et al.*, 2007; Montenegro *et al.*, 2009; Mycobank.org).

Também *Aspergillus lentulus* (espécie críptica de *A. fumigatus*) surgiu com a mesma percentagem de homologia que *A. fumigatus* em alguns casos, mas apresentava um número de pb coincidentes inferior, o que levou a rejeitar a hipótese de inclusão como espécie críptica na identificação molecular de algum dos 108 isolados testados. Esta exclusão baseou-se portanto em resultados de estudos moleculares, dado que as espécies crípticas caracterizam-se por várias estirpes de *A. fumigatus* que são identificadas como fenotipicamente idênticas, mas geneticamente distintas.

Além do estudo das espécies crípticas, explícito na Tabela 4.1, pode ainda ser observado a determinação dos três isolados cuja identificação morfológica foi inconclusiva. Deste modo, a técnica molecular distinguiu, mais uma vez, uma espécie *A. fumigatus* e surpreendentemente, duas espécies inesperadas, *Emericella echinulata*, correspondente a *Emericella nidulans* var. *echinulata* e *Emericella nidulans*. Ambas as espécies correspondem ao teleomorfo ou fase sexuada de *Aspergillus nidulans*, confirmadas por micromorfologia após receção dos resultados de sequenciação, visto a identificação destas espécies em laboratórios de microbiologia clínica ser comumente baseada nas características morfológicas microscópicas. Estas espécies são raramente encontradas em populações de risco com diagnóstico de aspergilose, mas afetam severamente o órgão-alvo, pulmão, propiciada pela inalação de esporos do fungo presente no ambiente aéreo (Dotis & Roilides, 2004; Balajee *et al.*, 2007). Ainda por observação da Tabela 4.1, denota-se que os dados relativos à estirpe 09-33 se apresentam incompletos, uma vez que a estirpe ficou inviável, pelo que não foi possível obter a discriminação molecular necessária; esta inviabilidade impediu a continuação e repetição do seu estudo, assim o estudo recaí sobre 107 isolados em vez de 108.

2. Testes de Susceptibilidade a Antifúngicos

De forma conhecer a capacidade de resistência a antifúngicos inocularam-se 33 estirpes (selecionadas a partir de todas as estirpes analisadas molecularmente, de forma a serem o mais representativas possível da amostra total, no que respeita à sua origem) ao meio de agár - RPMI 1640 com ITC, testando-as sempre acompanhadas pelo controlo positivo, possibilitando a observação gradual das taxas de crescimento neste meio. A taxa de crescimento para o controlo positivo rondava 2 a 3 dias, mantendo-se os inóculos nas condições de estufa, durante um período de uma semana, de modo a salvaguardar os resultados observados (dado que a taxa de crescimento de alguma das estirpes testadas podia ser baixa), ilustrados pela Figuras 4.8 e Tabela 4.2.

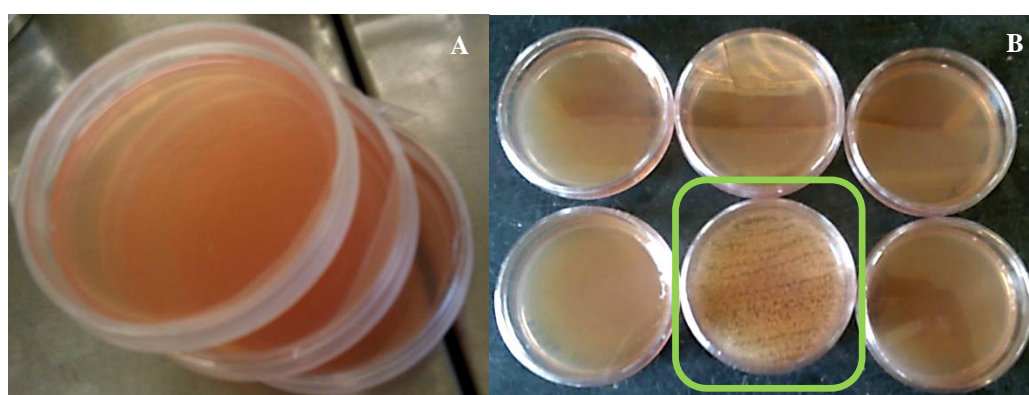


Figura 4.8- Teste de Suscetibilidade em placas de Petri com meio agár - RPMI 1640 com ITC com as estirpes inoculadas. A) Placas de Petri na fase de pré-inoculação das estirpes. B) Placas de Petri após uma semana de inoculação (27,5°C), retângulo verde evidenciando o controlo positivo assinalado.

Notoriamente se repara que as placas de Petri não assinaladas pelo retângulo na Figura 4.9 painel B apresentam um meio límpido idêntico ao meio da Figura 4.8 painel A, porém todas elas foram sujeitas a teste, apenas não apresentam crescimento das estirpes que se inoculou e tal como se observa na placa de Petri assinalada pelo retângulo verde (controlo positivo). Quer isto dizer que, nas placas com as estirpes testadas, a ação do antifúngico foi eficiente, sendo elas sensíveis ao ITC com concentração de 2 mg/0,5 L. Apesar da Figura 4.8 painel B apresentar apenas 5 amostras elucidativas, todas as 33 estirpes testadas apresentaram os mesmos resultados ao agente antifúngico testado (Tabela 4.2).

Tabela 4.2- Estirpes manipuladas de acordo com os locais de colheita e resultados da suscetibilidade ao meio ao qual foram testadas.

Identificação das Estirpes	Proveniência das Estirpes	Identificação Molecular	Teste de Suscetibilidade (Meio agár- RPMI com ITC)	Crescimento (27,5°C)	Período de Incubação	
Estirpe Controlo Positivo		<i>Fusarium solani</i> *	Resistente	Observado (taxa de crescimento 2 a 3 dias)	10/01/2014; 22/01/2014;05/02/2014	
Estirpe Controlo Negativo		HSMA23 *	Susceptível	Não observado	01-12-2013	
		110072 (<i>A. niger</i>)*	Susceptível	Não observado	01-12-2013	
Clínica (n=21)	08-131	Goraz <i>Nycticorax nycticorax</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	01-12-2013
	08-132	Águia-de-cabeça-branca <i>Haliaeetus leucocephalus</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-133	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-134	Ave sem especificação Família <i>Accipitridae</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-135	Ave sem especificação Família <i>Falconidae</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-136	Galinha <i>Gallus domesticus</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-137	Águia-real <i>Aquila chrysaetos</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-138	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-139	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	10-01-2014
	08-140	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	22-01-2014
	08-141	Ave sem especificação Família <i>Accipitridae</i> ,	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	22-01-2014
	08-142	Ave sem especificação Família <i>Accipitridae</i> ,	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	22-01-2014
	09-03	Búteo-de-cauda-vermelha <i>Buteo jamaicensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	22-01-2014

Tabela 4.2- Estirpes manipuladas de acordo com os locais de colheita e resultados da suscetibilidade ao meio ao qual foram testadas (continuação).

	Identificação das Estirpes	Proveniência das Estirpes	Identificação Molecular	Teste de Susceptibilidade (Meio agár- RPMI com ITC)	Crescimento (27,5°C)	Período de Incubação	
	09-23	Falcão vermelho <i>Buteo lineatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	22-01-2014	
	08-91	Papagaio-do-mar <i>Fratercula corniculata</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014	
	08-95	Mobelha-pequena <i>Gavia stellata</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014	
	08-99	Airo (comum) <i>Uria aalge</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014	
	09-25	Airo comum <i>Uria aalge</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014	
	09-29	Pelicano pardo <i>Pelecanus occidentalis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014	
	09-31	Corvo-marinho-d'orelhas <i>Phalacrocorax auritus</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014	
	09-16	Pato-de-rabo-alçado-americano <i>Oxyura jamaicensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014	
Ambientais (n=12)	Água	09-75	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-76	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-77	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
	Ar	09-57	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-62	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-72	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-93	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-94	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-95	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-96	Ambiente	<i>Emericella echinulata</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-97	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014
		09-98	Ambiente	<i>A. fumigatus</i>	Susceptível	Não observado	05-02-2014

* Por cada um dos três ensaios a testar a suscetibilidade foram realizadas 3 controles.

Mais uma vez os resultados expostos na Tabela 4.2 elucidam sobre os efeitos do antifúngico aplicado às estirpes selecionadas. À exceção do controlo negativo, já conhecido pela resistência a este agente, todas as outras estirpes não apresentaram crescimento aquando inoculadas com a concentração de 4 mg/L de ITC. Como tal, estes resultados contrapõem-se aos resultados descritos na literatura, revelando isolados suscetíveis ao antifúngico, mas não subestimam a prevalência de resistência adquirida de estirpes de *Aspergillus fumigatus* ao antifúngico Itraconazol, por exposição ambiental, explícita na literatura. Perante isto, o grupo de isolados específicos sujeitos ao teste podem não ter entrado em contacto prévio com o ITC, como comumente ocorre em isolados clínicos de populações selvagens de *A. fumigatus*, descritos pela EUCAST - AFST, como sensíveis ao Itraconazol (EUCAST, 2012).

1. Identificação de *Aspergillus* e detecção de espécies crípticas

A análise e pesquisa de espécies crípticas nos 107 *Aspergillus* isolados, como observado na Tabela 3.1a) e 3.1b) e 4.1 foram efetuadas em diversos pontos de recolha, órgãos e distintas espécies animais. O estudo dos isolados foi conclusivo face ao especulado sobre a existência de espécies crípticas de *Aspergillus* nas amostras estudadas, alcançando-se assim o objetivo pretendido. A aplicação de técnicas de biologia molecular permitiu ainda a resolução de erros de identificação em 2 das 107 estirpes (identificação morfológica prévia discrepante), mostrando assim a eficácia e sensibilidade associadas a esta metodologia que é portanto a recomendada para uma correta identificação de espécies dentro do género *Aspergillus* e especificamente dentro do complexo *Fumigati*. Além deste resultado, esta ferramenta permitiu clarificar e reverificar os dados fornecidos pelas entidades colaboradoras no estudo, que cederam os isolados e que apresentaram apenas dados sobre a identificação morfológica. No entanto, a obtenção destes resultados moleculares não deve descuidar da aliança entre a metodologia utilizada e o emprego de *primers* apropriados, especificamente os *primers* que amplificam gene da calmodulina, *cmd5* e *cmd6*, que permitem uma discriminação satisfatória das espécies de *Aspergillus* (determinando espécies crípticas), aquando comparados com os resultados obtidos quando utilizados outros *primers* que amplificam outras regiões com a sequenciação de outras regiões. A sequenciação da região ITS não permite um poder discriminatório elevado, enquanto que a sequenciação do gene que codifica a β -tubulina pode ter resultados duvidosos pelo aparecimento de bandas inespecíficas. Assim sendo, os genes de calmodulina definiram que 105 das 107 estirpes correspondiam a *Aspergillus fumigatus* e exibiam um elevado grau de homologia, 99% e 100%, assim como definiram 2 das 107 estirpes como outras espécies de *Aspergillus*, mais concretamente, duas fases sexuais do género *Aspergillus*, do complexo *Nidulantes*, que curiosamente podem ser agentes etiológicos da aspergilose (Hong *et al.*, 2005). Em suma, a metodologia molecular foi muito vantajosa no estudo, pois otimizou o processo de identificação das espécies. Como anteriormente referido nos resultados, a sequência obtida a partir de um dos isolados estudados teve homologia com uma espécie críptica de *A. fumigatus*, *Aspergillus lentulus*, que apesar da percentagem da homologia obtida de 99% ser igual à obtida por *A. fumigatus*, o número de pares de bases (710 pb de *A. fumigatus* perante 715 pb de *Aspergillus lentulus*) impossibilitou a sua aceitação como espécie críptica, pois o seu resultado final foi confirmado tratando-se de *A. fumigatus sensu stricto*.

O quadro clínico causado por *A. fumigatus* é amplamente estudado; vários estudos têm também vindo a ser feitos acerca das infeções causadas pelas ocultas espécies crípticas, que apesar de geneticamente distintas provocam a mesma doença (Balajee *et al.*, 2005b; Samson *et al.*, 2007; Montenegro *et al.*, 2009). *Emericella echinulata* e *Emericella nidulans* (fases sexuadas de *Aspergillus nidulans*)

enquadram-se também no grupo de fungos patogénicos, cujo quadro clínico poderá ser semelhante ao causado por *A. fumigatus*, pelo que a sua identificação se torna também relevante neste estudo. De entre as duas espécies, *E. nidulans* considera-se um patogénico humano mais severo que *E. echinulata*, propenso para gerar infeções invasivas nos pulmões. Todavia, estes dois agentes fúngicos dispõem uma baixa associação como vetores zoonóticos e estão mais correlacionados com outras doenças que também afetam o sistema imunitário, no caso da doença crónica granulomatosa (Denning, 1998; Pagano *et al.*, 2007; Verweij *et al.*, 2008).

Mediante os resultados moleculares obtidos a partir de isolados fúngicos recolhidos de um vasto grupo de diferenciadas espécies ornitológicas e diferentes órgãos vitais, qual a analogia implícita? O leque de espécies presentes, espécies domésticas, selvagens e de cativeiro, na Tabela 3.1a) partilham com as aves aviárias, *Gallus gallus* e entre cada espécie apresentada a predisposição para a infeção pela espécie fúngica oportunista e conseqüentemente o aparecimento de aspergilose invasiva (Friend & Franson, 1999; Nardoni *et al.*, 2006; Alvarez-Perez *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011).

A origem da contaminação das espécies presentes na amostragem em estudo pode provir de diferentes fatores relacionados com o meio envolvente dos *habitats* das espécies, como exemplificado pela Tabela 3.1b). O “acolhimento” involuntário deste fungo resulta da exposição a variados fatores (intrínsecos e extrínsecos) propícios ao desenvolvimento dos fungos. Como vetores extrínsecos à transmissão do fungo, podemos considerar a alimentação (resíduos vegetais e restos de alimentos), o contacto com água, areias e solo, a composição dos ninhos ou das "camas" nos aviários, o contato com outras espécies de aves ou animais de outras espécies, o *stress*, a poluição (acumulação de resíduos fecais), as mudanças climáticas e de *habitats* e a temperatura e humidade relativa. Como fatores intrínsecos, podemos considerar o estado geral das aves, patologias de base, e a debilidade dos órgãos vitais respiratórios e a sua temperatura corporal (Shah *et al.*, 2011; Piggot *et al.*, 2012). É bem conhecida a associação destes fatores com a infeção destas espécies de aves por *A. fumigatus*, sensíveis a este patogénico e cuja dispersão de conídios por qualquer um dos ambientes referidos ser frequente.

As aves selvagens em estudo, marinhas e aquáticas, habitam locais húmidos e em contato com a água, encontrando-se assim mais expostas a contaminantes prejudiciais à sua saúde, como matéria fecal proveniente das mesmas ou de águas residuais que são despejadas nos seus *habitats*, do que as aves de aviários, que apesar de estarem em contacto com poeiras onde na sua envolvência existe esporos e contaminantes químicos, podem ser maioritariamente controlados e remediados. Além disso, as aves marinhas, para além do ar e água circundante, bem como com os outros indivíduos do seu ecossistema, entram também em contato direto com a areia ou solo, que também se apresenta como um fator crítico por englobar e propagar microrganismos bacterianos e fúngicos (Shah *et al.*, 2011; Piggot *et al.*, 2012). As aves que habitam em ambientes marinhos de climas frios são altamente suscetíveis a infeção por parte de *A. fumigatus*, nomeadamente em climas favoráveis à sua existência e propagação, mas também em ambientes artificiais, onde a ventilação mal efetuada contribui para o desenvolvimento deste fungo e, como consequência, ocorre uma maior incidência de AI, que é o que sucede no caso das aves de

aviários. A manifestação da doença, AI, afeta uma ampla gama da avifauna mundial e gera elevadas taxas de mortalidade e perda de biodiversidade, mas o diagnóstico pode não ser rápido e evidente. Assim, a AI pode considerar-se intratável nas aves selvagens, caso não sejam implementadas medidas que contrariem este acontecimento. No entanto, também as aves de climas marinhos temperados e com elevados níveis de humidade são favoráveis a infeções pelo fungo em estudo, devido ao microclima potenciar o crescimento deste (Phalen, 2006; Causey & Edwards, 2008; EPA, 2008; Beernaert *et al.*, 2010; Sehgal, 2010; Perrott & Armstrong, 2011).

Desta forma, a presença deste fungo em nichos ecológicos marinhos não é invulgar, e apesar dos isolados em estudo terem sido recolhidos em espécies de ambientes do continente Americano, em Portugal também existem algumas das espécies de aves estudadas em contacto com os humanos, e em ambientes condicionalmente semelhantes. Nos ambientes marinhos portugueses também existe presença de *A. fumigatus*. Surge cada vez mais associação, de que não só a água e o ar representarem vetores de contaminação, tornando-se a areia, também um vetor (Heaney *et al.*, 2009; Sabino *et al.*, 2014a). Esta referência advém de estudos realizados sobre a carga micológica presentes nas areias e sobre as interações ou manifestações individuais que resultarem da interface entre o sistema terrestre e marinho. Deste estudo resulta a sustentação da possível ocorrência de perturbações na Saúde Pública e Animal, devendo ser verificado e analisado a qualidade microbiológica destes fatores, respeitando os valores médios sustentado pela norma Diretiva Europeia de 17 CFU/g para potenciais fungos patogénicos (Sabino *et al.*, 2014a). Em suma, a envolvência nestes ambientes e a exposição aos percursos neles patentes, como esporos, poeiras, micotoxinas, continuaram a complementar as possíveis debilidades imunológicas acopladas à suscetibilidade das aves, pois este agente terá sempre sustentabilidade para se reproduzir.

A presença do fungo *Aspergillus* num determinado ambiente pode estar articulado, para além de muitos fatores, com as sazonalidades climáticas. Nas estações do ano, em que a temperatura seja favorável e a humidade relativa muito elevada, cerca de 27°C e 94% HR, respetivamente, a concentração de esporos no ar eleva-se. Contrariamente, valores de 35°C de temperatura e 66% HR indicam um ambiente ligeiramente desfavorável, daí uma menor concentração de esporos. Estas razões ecológico-climatéricas estão associadas a perturbações externas que originam explosões esporádicas de quantidades indeterminadas de esporos de *Aspergillus* que são aerotransportados e que proliferam mais rapidamente a temperaturas de 25°C, temperaturas ambientais do que a temperaturas de 37°C, a temperatura corporal humana (Falvey & Streifel, 2007; Causey & Edwards, 2008; Sharma, 2012). As aves possuem maiores taxas metabólicas e temperaturas corporais mais elevadas (variam até 43°C) do que a temperatura corporal dos humanos, 37°C, a base da virulência de *A. fumigatus*, revelam-no como um organismo tolerante, que prefere meios basais como os das aves. A preferência por este meio basal face aos humanos advém de requisitos disponíveis pelas aves, como as taxas metabólicas; o contato constante com os conídios, de dimensões reduzidas, em diversos ambientes; anatomia e fisiologia, que promove a dispersão por vários órgãos, como o caso dos sacos aéreos que apresentam um fluxo de ar

que promove a deposição dos conídios e estes conseguem passar mais facilmente as vias respiratórias das aves e ainda a temperatura corporal de 43°C. Deste modo, as aves albergam facilmente o agente patogénico, que acaba por germinar (Ibrahim-Granet *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2010; McCormick *et al.*, 2010).

Um dos factores de virulência de *A. fumigatus sensu stricto* é a resistência a temperaturas mais elevadas que as suas espécies crípticas. Este facto pode explicar a inexistência de espécies crípticas como causadoras de infeção nas aves. Estudos sobre a virulência de *A. fumigatus* debruçam-se sobre diferentes mecanismos de *stress* exercidos sobre a sua capacidade de germinação e esporulação a diferentes temperaturas, revelando-se pois como um organismo termostável, aguentando temperaturas que oscilam entre 17°C a 42°C, podendo muitas vezes alcançar os 55°C. Claro que as condições de *stress* ecológico influenciam a integração deste fungo ubíquo, visto este revelar elevada capacidade de resistência, adaptação e evolução aos diversos nichos ecológicos, mas a suscetibilidade das aves ou de humanos severamente debilitados, a sua temperatura corporal e sua taxa de metabolismo são pontos cruciais para o fungo alcançar os seus objetivos (Causey & Edwards, 2008; Clarke & Rothery, 2008; Ibrahim-Granet *et al.*, 2008; McCormick *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2011; Low *et al.*, 2011).

Como se pode observar pela Tabela 3.1a), as estirpes isoladas foram colhidas de diferentes órgãos vitais das diferentes aves. Estas evidências mostram que as alterações patológicas resultantes de uma infeção por *A. fumigatus* ocorrem principalmente no sistema respiratório (saco aéreo, traqueia, seios nasais), mas podem-se disseminar e envolver outros órgãos, como os olhos, ou tecido tumoral ou previamente lesionado. Após a esporulação do fungo, a disseminação rápida deste é incontornável, pois o desenvolvimento e ramificação do micélio origina massas nodulares em diferentes órgãos, como baço, rins, fígado e até do sistema digestivo (Nardoni *et al.*, 2006; Femenia *et al.*, 2007; Cacciuttolo *et al.*, 2009; Beernaert *et al.*, 2010; Thierry *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011; Olias *et al.*, 2011; Suleiman *et al.*, 2012; Thierry *et al.*, 2013; Reza *et al.*, 2013). Deste modo, a infeção pelo fungo distribui-se de forma alargada e como uma incidência geral em todas as espécies de aves, estando muito associada à produção de aves em cativeiro e em incubadoras, pelo que os locais como a reabilitação e cativeiro de aves e parques zoológicos são ambientes com elevada incidência de AI. Esta doença tem como população alvo afeta aves jovens, ao invés de aves adultas. Assim sendo, a população alvo pode ter acentuadas perdas de biodiversidade em termos ecológicos e perdas económicas, que se podem traduzir em perdas de lotes inteiros quando nos focamos na produção avícola. De facto, neste último caso, e apesar de se estudar apenas uma espécie, a AI pode levar a altas taxas de mortalidade, inspeção sobre o abate e baixa produtividade e conseqüentemente, elevadas perdas económicas que são inevitáveis (Femenia *et al.*, 2007). Apesar de esta situação ser uma problemática para a produção agropecuária, poderá ser facilmente remediada caso haja elevada rastreabilidade, pois logo após alarme de ocorrência de AI numa ave ou deteção de *A. fumigatus*, deverá ocorrer a remoção do lote de aves inserido no aviário de produção ou noutro qualquer ambiente, seguida de desinfeção do local. As aves e/ou respetivo ambiente, podem também por vezes ser colocados em quarentena ou período de incubação até surgirem indícios de qual

a origem de infecção. O leque de origem da doença e infecção é extenso, esta pode advir da exposição aérea (bioaerrossóis), ambiente interno da produção das aves e externo, da alimentação (alimentos e água), das próprias instalações e suas infraestruturas, como por exemplo os sistemas de ventilação. No que respeita à parte alimentar e sector avícola, este fungo é um problema a nível mundial em diferentes fases na cadeia de produção de aves. Ele afeta essencialmente aves jovens e recém-nascidas, aves com apenas 1 dia de idade e embriões, causando elevadas taxas de mortalidade por doenças respiratórias, nomeadamente AI, mas também micoses oculares e dérmicas, que também se podem observar nas aves mais velhas (Samson *et al.*, 2000; Sonaiya & Swan, 2004; HSE, 2008; Williams, 2009; Arné *et al.*, 2011; Gavier-Widén *et al.*, 2012; Dhama, 2013; Thierry *et al.*, 2013; Ravindran, 2014).

A nutrição dos fungos, nomeadamente de *Aspergillus*, dá-se por degradação da matéria orgânica no exterior e posterior absorção de nutrientes. Deste modo, *A. fumigatus* utiliza o seu generoso metabolismo e a competência incontornável da sua biologia em prol da absorção de nutrientes existentes nestes ambientes (a alimentação usada na criação de aves nos aviário e algumas aves domésticas e até nas aves selvagens pode albergar a presença desses nutrientes), tornando-se este microrganismo num oportunista sem qualquer tipo de concorrência (Perrott & Armstrong, 2011). Ainda relacionado com o mesmo campo de ação, paralelamente ao crescimento dos conídios de *A. fumigatus* ocorre produção de enzimas que degradam os materiais orgânicos e estas correspondem a proteases e metabolitos secundários tóxicos, como a gliotoxina, associada a problemas de Saúde Animal e Humana (Arné *et al.*, 2011; FAO, 2014; Ravindran, 2014). Estas toxinas fúngicas podem ser inaladas pelas aves e pelos trabalhadores da indústria avícola, sendo necessário determinar os tipos e níveis de micotoxinas presentes no ar para evitar consequentes riscos para a Saúde Pública e Animal. Os problemas associados aos animais e humanos derivam maioritariamente da inalação das micotoxinas e não pela sua absorção dérmica ou através do trato digestivo, exceto se ocorrer ingestão direta de alimentos contaminados com a micotoxina (no caso dos cereais) ou indireta por ingestão de produtos animal, no caso de carne, ovos e leite (CAST, 2003). Mesmo que a concentração de micotoxinas presentes nestes ambientes seja baixa, uma prolongada e repetida exposição a estes origina uma redução das defesas imunitárias e aumenta a suscetibilidade a doenças, como doenças respiratórias (Wang *et al.*, 2008). Também associado a ambientes agrícolas e avícolas, ocorre a presença de componentes da parede celular dos fungos, mais especificamente o β - (1-3) -D-glucano. Como principal constituinte da parede celular de *A. fumigatus* liberta-se durante o crescimento das hifas e caso ocorra a presença de elevadas concentrações deste componente celular, ou ocorram misturas deste com outros, poderão surgir desordens fisiológicas como Síndrome Tóxica das Poeiras Orgânicas (ODTS), reações alérgicas e inflamações nos pulmões. Este componente é pesquisado em pacientes que sejam portadores de doenças fúngicas, uma vez que poderá ser detetado em circulação no soro humano, lavados e fluídos broncopulmonares (Zmeili & Soubani, 2007; EPA, 2008; Viegas *et al.*, 2012; Khan & Karuppaiyil, 2012). Pelo exposto a possibilidade de ocorrer contacto com este agente é diversa, o que pode constituir um risco para a Saúde Pública.

Em suma, as aves infetadas por esta doença podem ser tratadas, através de remoção cirúrgica das lesões nodulares ou granulomatosas, de diagnóstico evidente acessível, ou aplicação de antifúngicos veterinários/clínicos (enilconazol; cetoconazol; itraconazol), uma vez a prevenção não ser suficiente; o uso de fármacos comerciais para tratamento de micoses sistémicas e superficiais, descritos como antifúngicos de largo espectro de ação, erguer-se como método indiscutível e com grande aplicação na indústria avícola e nenhum procedimento de vacinação para AI estar disponível (Arné *et al.*, 2011). A difusão do fungo e conseqüentemente da doença podem ser controladas e prevenida por medidas de biossegurança que compreendem o controlo de produção de poeiras e fungos depositados nos alimentos, assim como aplicação de métodos de higiene nas camas (uma das maiores fontes de introdução de Af nos aviários) (Williams, 2009; Viegas *et al.*, 2012). Também outros factores são relevantes: a higienização dos utensílios que suportam os alimentos e a água, ambiente controlado, temperatura adequada e HR até 50%, sistema de ventilação mais eficiente e com monitorização e higienização periódica; uso de equipamentos com tecnologias a vácuo e de desumidificação dos ambientes e irradiação para os utensílios; conservação dos alimentos em embalagens apropriadas e armazenamento a 4°C (temperatura óptima de conservação para questões de segurança e qualidade alimentar); desinfeção do ambiente e dos utensílios, assim como esterilização destes; protecção dos avicultores por equipamentos individuais e desinfectados; criação de áreas de quarentena; perspicácia na detecção de sintomas produzidos pelas aves e eliminação de todo o conjunto de aves nesse local, adição de antifúngicos na alimentação, higienização dos resíduos e controlo da poeira e bioaerossóis; mas também por medidas que reduzam posteriores contaminações cruzadas durante o manuseio, transporte e processamento de aves vivas ou a carne de frangos, que não foram infetados e aplicação de desinfetantes antifúngicos agrícolas aplicados esporadicamente para controlar possíveis contaminações no ambiente, assim como aplicação de enilconazol para descontaminar as superfícies, antes de introduzir outras aves para produção (Sonaiya & Swan, 2004; HSE, 2008; Williams, 2009; Khan & Karuppaiyil, 2012; Viegas *et al.*, 2012; Dhama, 2013; FAO, 2014; Ravindran, 2014; Sabino *et al.*, 2014b; Viegas *et al.*, 2014).

Sendo a espécie avícola doméstica *Gallus gallus* a portadora mais suscetível a infeções pelo agente patogénico referido, a prevenção da disseminação da doença e restrição de zonas poderá ser a melhor estratégia para minimizar o aparecimento e a propagação da doença (Sonaiya & Swan, 2004; Khosravinia *et al.*, 2009).

2. Antifúngicos e Vertente alimentar

Como estratégia e medida contra o *Aspergillus*, agente etiológico da doença infecciosa AI, anteriormente enunciada, a utilização de azóis (que inibem a biossíntese do ergosterol da membrana plasmática fúngica), nomeadamente os triazóis, de onde se salienta o itraconazol (ITC), muito aplicado para combater infeções fúngicas invasivas é fundamental.

Nas amostras dos órgãos de aves estudados, com antecedentes que suspeitavam aspergilose aviária, a biologia molecular permitiu a identificação do fungo patogénico em estudo (*Aspergillus*). Este estudo foi então posteriormente complementado com o teste de susceptibilidade ao ITC das estirpes de *Aspergillus* isoladas. Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 4.2 mostram a susceptibilidade das estirpes ao antifúngico em questão. Assim, o conjunto de estirpes estudadas de *Aspergillus fumigatus* foram inoculadas em meio de cultura com a concentração de 4 mg/L de ITC; após período de incubação, as culturas não cresceram, pelo que se concluí que apresentam sensibilidade ao antifúngico em questão e a valores de concentração ≥ 4 mg/L. O facto de se saber se as estirpes são sensíveis ou resistentes ao antifúngico ITC, a partir de que concentrações do mesmo, promove suporte laboratorial para o tratamento clínico eficaz das estirpes em análise. Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, tem-se detetado um grande número de estirpes de *Aspergillus fumigatus* resistentes ao ITC. Os triazóis, incluindo o ITC, são considerados a primeira linha de terapêutica associada ao combate da infecção por *Aspergillus*, especialmente *A. fumigatus*. A resistência a azóis, detetada inicialmente em infeções por *Aspergillus* tratadas com estas moléculas, tem sido descrita desde a última década e tem tido uma incidência crescente na Europa (Pfaller, 2012; Chowdhary *et al.*, 2013; Kleinkauf *et al.*, 2013). Isto deve-se essencialmente ao aparecimento de uma resistência secundária ou adquirida. Esta poderá advir de uma seleção de isolados resistentes no decorrer de terapia antifúngica ou também devido a este antifúngico ser utilizado profilacticamente em contexto hospitalar. Devido a esta preocupante emergência de estirpes resistentes, o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) elaborou um *Technical Report* dando algumas recomendações no sentido da prevenção do aparecimento de estirpes resistentes e para a sua rápida deteção (Kleinkauf *et al.*, 2013). Também nos aviários isto acontece, dado serem muitas vezes efectuadas terapias antifúngicas às aves, o que potencia o aparecimento de estirpes resistentes, apesar de não terem sido detectadas neste trabalho.

Por outro lado, o efeito persistente da aplicação e do uso exagerado de triazóis clínicos no ambiente e agricultura, enquanto fitofármacos, podem estar a desencadear uma resistência adquirida e uma resistência cruzada. As consequências da resistência adquirida poderão advir de isolados ambientais resistentes a azóis clínicos sujeitos a implementação na agricultura, análogos aos antifúngicos fitossanitários (Tabela 2.4) e a resistência cruzada poderá encaminhar para um aumento do número de isolados de *Aspergillus* resistentes aos azóis por seleção destes em detrimento dos isolados sensíveis. A maior prevalência ambiental de isolados resistentes aos azóis poderá, desta forma, por sua vez, aumentar a probabilidade de contaminação de pacientes com estirpes de elevada resistência a estes. Deve então considerar-se a diminuição de agentes fitossanitários, especialmente os fungicidas IsD, inibidores da enzima dimetilase, da via de síntese da ergosterol, componente da membrana plasmática em Af análogos aos triazóis. De facto, a prática de azóis enquanto fungicidas no combate a pragas, que devastam culturas para fins alimentares e para a cadeia industrial humana e animal, como cereais, vegetais, plantas, frutas, entre outros, servem para salvaguardar dessas dizimações, mas paralelamente está a desenvolver-se eventuais sobrecargas de doses excessivas dos fungicidas que vão seleccionar positivamente estirpes de

A. fumigatus resistentes aos antifúngicos (Waterman & Lepesheva, 2005; Pascual *et al.*, 2008; Snelders *et al.*, 2008; Beernaert *et al.*, 2009; Verweij *et al.*, 2009; Perkhofer *et al.*, 2010; Arendrup *et al.*, 2011; Van der Linden *et al.*, 2011a; Van der Linden *et al.*, 2011b; Pfaller, 2012; Chowdhary *et al.*, 2013; Kleinkauf *et al.*, 2013).

De acordo, com a análise dos dados obtidos e tendo em consideração que se um valor de ITC superior a 4 mg/L permite o crescimento de *Aspergillus fumigatus* em cultura, essa estirpe é então considerada como resistente a este antifúngico (Verweij *et al.*, 2009; Van der Linden *et al.*, 2011a; Van der Linden *et al.*, 2011b; Morio *et al.*, 2012). Nas estirpes estudadas verificou-se, pelo contrário, uma sensibilidade a este antifúngico. Da observação das 33 estirpes testadas, 32 delas foram identificadas com *A. fumigatus sensu stricto* e uma das estirpes corresponde à fase sexuada de *Aspergillus nidulans*, dita como espécie suscetível ao tratamento com ITC e confirmada por observação dos resultados da Tabela 4.2 (Van der Linden *et al.*, 2011a; Van der Linde *et al.*, 2011b). Tal semelhança de dados não se verifica com as restantes estirpes de *A. fumigatus*. Destes *A. fumigatus* isolados (n=33) discriminou-se a origem dos isolados, correspondendo a duas origens distintas: clínica (n=14) e ambiental (n=12), sendo que nem as da clínica nem as do ambiente demonstram a referida resistência explícita na literatura. Os resultados obtidos, que exibem suscetibilidade a ITC (4 mg/L) das estirpes isoladas em aves diversificadas, selvagens e domésticas, com indícios de AI e a presença do agente oportunista detetada, não poderão ser desprezados nem tomados como imutáveis e dever-se-ão efectuar, de forma regular, testes de susceptibilidade nestes tipos de *settings* (aviários), dado poderem ocorrer resistências adquiridas.

Esta metodologia para deteção de resistências (meio de cultura com antifúngico incorporado) é apenas considerada como um método de “*screening*”, pelo que futuras confirmações deverão ser efectuadas com o método de referência - microdiluição em placa – EUCAST (norma Europeia) ou CLSI (norma Americana). Ambas as normas traduzem que o uso continuado de antifúngicos de base azol apresentam consequências indesejáveis como o aumento de isolados resistentes.

No caso da EUCAST, método padrão válido para testar a susceptibilidade dos conídios de fungo a antifúngicos por determinação de concentrações mínimas inibitórias é aplicado em espécies de *Aspergillus* devido à sua facilidade, rapidez e economia de execução, bem como um elevado grau de aceitação. A suplementação deste trabalho abarcou conhecimentos e procedimentos desta norma, pois esta declara que o uso de ITC contra *Aspergillus* spp. pode ser influenciada pelos testes de microdiluições, temperaturas e tempos de incubação (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008). Perante isto, optou-se pelo método de “*screening*”.

A CLSI (anterior NCCLS) está intrinsecamente associada a *Internacional Standardization Organization* (ISO), WHO, FDA, laboratórios e hospitais líderes na implementação métodos de referência para testes susceptibilidade a antifúngicos por fungos filamentosos (CLSI M38-A method), padrões de controlo de qualidade (CQ) e interpretação de *breakpoints*, assim como aperfeiçoamento de conhecimentos e atualizações metodológicas face à emergência de resistência microbiológicas, como por exemplo a adequação do teste em meio RPMI-1640. A norma M38-A, método de microdiluição, é

descrita como teste de suscetibilidade para fungos que geram infecções fúngicas invasivas com antifúngicos pré-definidos, como os triazóis, posaconazol, ravuconazol e voriconazol (CLSI, 2008).

Este estudo não incide sobre a vertente da resistência molecular a ITC por parte das estirpes de *Aspergillus fumigatus*; esta é associada a mutações no gene CYP51A, mas a inter-relação de que as estirpes em pesquisa não possuem tais mutações não pode ser refutada. De facto, estas mutações pontuais levam a substituições de aminoácidos ou a repetições em tandem em *hotspots* dos genes CYP51A (por exemplo, Gli 54, Leu 98, Gly 138 e Met 22). A presença destas mutações específicas deverá posteriormente ser comparada com os resultados das concentrações mínimas inibitórias *in vitro* determinadas pelo método de microdiluição em placa (método de referência), para assim estabelecer correlações metodológicas.

O tratamento de AI nos aviários carece de muita atenção dada a elevada perda económica e animal. Assim, a prevenção e controlo de todos os pontos críticos que possam corresponder a focos de contaminação são importantes estabelecer visto que *A. fumigatus* pode estar presente em todos os estados de produção avícola (Arné *et al.*, 2011; Ceolin *et al.*, 2012). Por outro lado, o tratamento de aves com AI recorrendo aos azóis pode não resultar como pretendido devido a resistência das estirpes infectantes. Deste modo, deve continuar-se o estudo da terapia antifúngica adequada (testes de suscetibilidade e metodologias de detecção de resistências) para melhorar a compreensão de quais as medidas que possam auxiliar a contrariar esta problemática.

Não só o tratamento de AI em aviários por antifúngicos é importante, também devem ser implementadas, estabelecidas e cumpridas medidas preventivas em empreendimentos de produção massiva de animais com destino comercial para evitar zoonoses e prevenir doenças (Clark *et al.*, 2012).

A distribuição universal das espécies de *Aspergillus*, já não é desconhecida, nem mesmo a envolvimento de infecções associadas a estas. Como referido ao longo deste estudo, uma inalação de uma quantidade considerável de conídios, num ambiente oportuno geram AI que afeta humanos e aves, fisiológica e imunologicamente debilitados. Deste modo, o nível de patogenicidade de *A. fumigatus* no hospedeiro pode ser explicado por vários fatores. A nutrição, temperatura corporal, debilitação do sistema imunitário (por exemplo nos casos de doentes hematológicos ou transplantados), a idade e o ambiente (Lewis *et al.*, 2005; Brock, 2009).

A transmissão dos esporos de *Aspergillus* de individuo para individuo, não tem sido relatada. Além da contaminação ambiental aérea, os esporos podem ser transmitidos por outras fontes e vetores, como alimentos, água e medicamentos contaminados e sistemas de ventilação ineficazes. Conhece-se que ambientes de construção com demolições geram elevadas concentrações de esporos que se dispersam pelo ar e asseguram uma fonte incontornável de contaminação e a qualidade do ar interior e exterior estão na base da atenção, enquanto fatores ambientais que geram infecções respiratórias preocupantes em ambientes clínicos. Tendo os sistemas de ventilação um papel fundamental na purificação e limpeza do ar, nem sempre tal ocorre e estes podem servir de veículos de propagação dos esporos (Siegel *et al.*, 2007). A determinação das concentrações fúngicas em diferentes locais hospitalares mostra a presença

de uma variação entre 1-55 UFC/m³ nas enfermarias e de 5-120 UFC/m³ nas cozinhas hospitalares. De acordo, com estes dados foram detetados em 35% das enfermarias e 33% de cozinhas espécies de *Aspergillus*, condicionando assim, de forma direta e indireta a saúde dos pacientes e os alimentos que lhes são fornecidos (Perdelli *et al.*, 2006). Assim, a filtração e purificação do ar tem vindo a ser acoplada a sistemas de filtração específicos, como os HEPA, que reduzem o risco de infeções por fungos filamentosos, quer em ambientes hospitalares de cuidado redobrado, nas UCI, quer nas indústrias alimentares de produção animal. Não só estes sistemas são apropriados para a redução destas espécies fúngicas, os cuidados higiénico-sanitários e equipamentos de vestuário também são necessários e importantes, assim como a aplicação da irradiação e esterilização de dispositivos hospitalares, diminuindo os riscos de infeções. Além destes equipamentos, o uso de ventilações com fluxo laminar do ar durante períodos de construção hospitalar ou de obras em redor destas unidades devem ser consideradas para eliminar as partículas provenientes desta ação, que causam o aumento de esporos de *Aspergillus fumigatus* e um aumento de casos de AI, em indivíduos debilitados. O uso desta ventilação em cirurgias específicas e em UCI podem também ser utilizadas para reduzir e purificar o ambiente com propensão a acumulação de conídios. No caso da desinfeção das mãos para profissionais de saúde e indústrias que manipulam dispositivos que contactam direta ou indiretamente com doentes vulneráveis, devendo usar desinfetantes que reduzam a densidade da flora epidérmica, como etanol ou n-propanol (Crnich, *et al.*, 2005; Perdelli *et al.*, 2006; Prüss-Üstün & Corvalán, 2006; Goebes *et al.*, 2008). Além destes vetores hospitalares, os doentes ventilados são alvo de infeções fúngicas dado que os tubos dos ventiladores acumulam partículas fúngicas nestes aparelhos, devendo também serem alvo de desinfeção e atenção redobrada (Kidd *et al.*, 2009). Com enunciado anteriormente, as cozinhas hospitalares são ótimos reservatórios de agentes patogénicos e depósito de inúmeros esporos de diferentes géneros, uma vez que estes locais apresentam condições propícias ao desenvolvimento e crescimento destes, dado serem ambientes de elevada HR e elevadas temperaturas de ar. Assim, as cozinhas hospitalares têm com elevada presença de *Aspergillus* e *Penicillium*, dado ser uma atmosfera quente e húmida aquando manipulação dos alimentos e manipulação de materiais. Obviamente, que as concentrações destes fungos são menores quando em comparação com os ambientes exteriores (Perdelli *et al.*, 2006).

A vertente alimentar, tem pois grande importância na disseminação de fungos em diferentes ambientes ocupacionais, desde agricultura à indústria alimentar (aviários e suiniculturas) (Sabino *et al.*, 2014b), nomeadamente de *Aspergillus* devendo ser tomadas medidas para minimizar contaminações, como elevados parâmetros de rastreabilidade face aos lotes de produtos introduzidos nas indústrias; segurança na alimentação animal; controlo de espécies selvagens, insetos; equipamentos e material dos avicultores e da indústria e para reverter ou diminuir a probabilidade de ocorrer estas situações, a aplicação de protocolos de HACCP (*Hazard analysis and critical control points*), que visem análise e controlo de perigos e pontos críticos durante procedimentos de manipulação alimentar, surgem como as melhores soluções (Paterson, 2006). Esta evidência deve salvaguardar a qualidade e segurança da produção avícola e com ela assegurar as boas práticas de produção, desde a isenção de contaminantes

biológicos, químicos e físicos na produção até ao controlo e certificação da qualidade das matérias-primas usadas na subsistência das aves (Ravidran, 2014), uma vez que, estes pontos podem causar inviabilidade do produto e rejeição por parte do consumidor. Isto porque, os organismos resultantes da deterioração dos alimentos não são originalmente parte integrante destes, mas estão amplamente presentes na água, solo, ar e outros animais, que assumem o papel de vetores indirectos para propagação dos esporos e micotoxinas destes. Assim sendo, estes procedimentos são extremamente necessários para obter uma matriz isenta de qualquer microrganismo patogénico e que possa corresponder aos potenciais fins comerciais e nutricionais. No caso da carne da ave apresentar uma possível contaminação microbiológica, através de aplicação de metodologias e planos de *HACCP*, aptas para a detetar, esta será rejeitada caso tal se verifique, e não integra a cadeia alimentar industrial. Isto é, os animais débeis que originam carnes para fins de subsistência são colocados em questão quanto à qualidade e segurança da sua carne e a dúvida sobre a persistência de microflora contaminante.

Como solução, o uso de conhecidas tecnologias de processamento industrial, como o processamento térmico, esterilização ou irradiação são desenvolvidas para matar cargas microbianas presentes nos alimentos (Doyle, 2007). Deste modo, a esterilização de alimentos surge como uma tecnologia eficiente para destruir microrganismos presentes nos alimentos evitando a possível transmissão e o desencadear de doenças. Esta técnica pode ter vários componentes de ação, dependendo da intensidade e durabilidade do processo, estando correlacionados os parâmetros tempo e temperaturas. Contudo, a esterilização a elevadas temperaturas, por ação de vapor ou calor seco, durante 40 minutos ou 1 a 6 horas, respetivamente, destrói todos os microrganismos (células vegetativas e esporos) (Rutala & Weber, 2004; Rutala *et al.*, 2008; Sydnor & Perl, 2011; FDA, 2013). Para eliminar a maioria das micotoxinas, o processamento convencional dos alimentos não é satisfatório, nem atinge os objetivos propostos, pois enquadram-se na faixa de temperatura dos 80-121°C (Milicevic *et al.*, 2010). Assim, só um tratamento acima dos 150°C é capaz de destruir uma concentração significativa de micotoxinas (Bullerman & Bianchini, 2007). Deste modo, e como técnica complementar, a irradiação de alimentos poderá ser uma promissora e eficaz tecnologia de segurança alimentar que promove eliminar microrganismos originadores de doenças transmitidas pelos alimentos. Esta técnica garante a inalteração nutricional e estrutural dos alimentos e a ausência de substâncias perigosas nos alimentos, sendo apoiada por várias organizações conhecidas, como WHO, CDC, USDA e a FDA com uma dose eficaz e segura acima de 10 kGy (Quilogray), não existindo efeitos adversos para a Saúde Pública e Animal (WHO, 1997; Tauxe, 2001).

Os parágrafos anteriores procuraram contextualizar a importância de *Aspergillus* em diferentes ambientes, focando a vertente alimentar. Procuram ainda mostrar evidências da sua presença em diferentes *settings* e seus efeitos nocivos quer para o Homem, quer para os animais. Pelo exposto, conclui-se a enorme relevância da deteção de *Aspergillus* em alimentos e em ambientes específicos, que poderão influenciar, por sua vez, a qualidade dos alimentos, quer diretamente quer indiretamente através da cadeia alimentar.

VI. CONCLUSÃO

O estudo em foco permitiu compreender melhor a contextualização da importância de *Aspergillus* em diferentes ambientes e diferentes espécies da avifauna, focando também a vertente alimentar. A aplicação de metodologias que permitissem efectuar uma abordagem para toda a problemática envolvente, foi essencial para alcance rápido e eficaz da identificação das espécies envolvidas na infeção ou presentes no ambiente, assim como para mostrar evidências da presença destas espécies em diferentes *settings* e quais os seus efeitos nocivos no Homem e nos animais.

Pelo exposto, conclui-se a enorme relevância da deteção de *Aspergillus* em animais e em ambientes específicos, que poderão influenciar, por sua vez, a qualidade dos alimentos, quer direta quer indiretamente através da cadeia alimentar e conseqüentemente a Saúde Pública. As amostras isoladas relevantes para o desenrolar deste trabalho deram enfoque aos isolados provenientes de aves e do ambiente que as rodeia, permitindo concluir-se que *Aspergillus fumigatus sensu stricto*, muito possivelmente pelas suas especificidades e fatores de virulência, foi a espécie mais frequentemente encontrada, segundo metodologias moleculares. Também estas ferramentas possibilitaram a identificação mais correta de dois isolados cuja identificação de espécie estava errada e confirmação dos restantes. Por outro lado, a aplicação destas metodologias permitiu concluir que não foram detetadas espécies crípticas do complexo *Fumigati*, tendo sido identificada apenas a espécie *Aspergillus fumigatus sensu stricto*. A base da justificação para ausência de outras espécies pode envolver a temperatura corporal das aves (43°C) e o facto de apenas esta espécie, comparada com as outras do mesmo complexo, ser produtora de determinadas micotoxinas (como a gliotoxina).

A deteção de determinadas espécies crípticas de *A. fumigatus* indica de imediato a possível resistência/menor susceptibilidade a determinados antifúngicos, nomeadamente azóis. Desta forma, a elaboração de um método de *screening* à presença de estirpes resistentes aos azóis possibilita também uma maior proteção às aves, conduzindo a menos riscos para a Saúde Animal e Pública.

Assim, métodos moleculares auxiliados por métodos convencionais, complementados com métodos *screening*, acompanhados por evolução científica e por implementações de protocolos de biossegurança e planos de ação, introduzidos e abordados em ambientes ecológicos, hospitalares e de produção de aves podem possibilitar o controlo do oportunista *Aspergillus fumigatus* e da doença aspergilose invasiva. Em suma, a prevenção e evolução científica será a melhor solução para o controlo deste agente etiológico.

VII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuramente, este estudo pode ser otimizado recorrendo à análise de um maior número de estirpes, não descredibilizando o número de estirpes estudadas neste estudo, que foi significativo. Porém um maior número, de estirpes possibilitaria outra abordagem e outras conclusões sobre diferentes espécies e diferentes ambientes.

Aplicar as metodologias de referência específicas para a determinação das suscetibilidades individuais de cada isolado, de modo a caracterizá-los quanto à concentração mínima inibitória para cada antifúngico, particularmente itraconazol, uma vez aplicado em estudo, e por exemplo, outros triazóis como voriconazol e posaconazol (aplicados em terapêuticas clínicas em humanos), enilconazol, cetoconazol, clotrimazol, fluconazol (aplicado na proteção avícola nos aviários), difenoconazol, propiconazol, epoxiconazol, bromuconazol, tebuconazol (aplicados na agricultura). Quaisquer uns destes antifúngicos são activos contra *A. fumigatus* e estruturalmente muito semelhantes aos triazóis aplicados na terapêutica clínica, dado que todos se ligam à proteína – alvo lanosterol 1,4- α dimetilase (Snelders *et al.*, 2012; Chowdhary *et al.*, 2013; Denning & Bowye, 2013; Gisi 2013). Esta aplicação possibilitará a realização de estudos epidemiológicos mais pormenorizados e detetar tendências e focos de redução de susceptibilidade.

Por outro lado, o estudo poderia evoluir no sentido de efetuar tipagem de isolados de *A. fumigatus* de aves e de ambientes envolventes, para certificar que se trata da mesma estirpe e poder determinar fontes de infeção.

Estudos sobre as micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus sensu stricto versus* espécies crípticas seriam também importantes no sentido de conhecer processos de invasão e infeção causados pelas diferentes espécies e em que sentido seriam coadjuvados ou não pelas micotoxinas produzidas.

Aprofundar conhecimentos científicos sobre reservatórios, fontes de infeção e disseminação infeções por *A. fumigatus* de forma a poder oferecer melhores estratégias para controlo ou prevenção de infeções.

A sugestão de otimização de metodologias e equipamentos na indústria avícola que permitam suprir *A. fumigatus*, por aplicação de biorreatores de conversão de água sanitária, por água potável com cloreto de sódio (NaCl), enquanto agente bactericida e desinfetante (Jirotková *et al.*, 2013).

VIII. REFEREÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad A, Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Hernando F, Pontón J, Garaizar J, Rementeria A (2010) What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 27:4, pp. 155-182
- Alanio A, Cordonnier C, Bretagne S (2011) Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* - Current Epidemiology and Future Perspectives. *Current Fungal Infection Reports*. 5:3, pp. 168-178
- Alastruay-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela L (2008) Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. Isolates identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61:4, pp. 805-809
- Alastruay-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M (2012) Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1273, pp. 18-24.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruay-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela J (2008a) *Aspergillus* Section Fumigati: Antifungal Susceptibility Patterns and Sequence-Based Identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52:4, pp. 1244-1251
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Garcia-Effron G, Lopez J, Grimalt J, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela J (2008b) Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids*. 73:3, pp.339-347
- Alvarez-Perez S, Mateos A, Dominguez L, Martinez-Nevado E, Blanco J, Garcia M (2010) Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. *Veterinary Microbiology*. 144:3, pp.444-449
- Animal Diversity Web “<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/>”. – Acedido a 14 de Abril de 2014.
- Arendrup M, Mavridou E, Mortensen K, Snelders E, Frimodt-Møller N, Khan H, Melchers W, Verweij P (2010) Development of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy Associated with Change in Virulence. *PLoS ONE*. 5:4, pp. 1-8
- Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Le Loc'h G, Desoutter A, Fém F (2011) *Aspergillus fumigatus* in Poultry. Review Article. *International Journal of Microbiology*. 2011. pp. 1-14
- Arvanitoyannis I (2009) HACCP and ISO 22000: Application to Foods of Animal Origin. *Wiley-Blackwell*. 5, pp. 1- 56
- Ashley E, Lewis R, Lewis J, Martin C, Andes D (2006) Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clinical Infectious Diseases*. 43:1, pp.S28-S39
- Balajee S, Gribskov J, Hanley E, Nickle D, Marr K (2005b) *Aspergillus lentulus* sp. nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell*. 4:3, pp. 625-632
- Balajee S, Gribskov J., Brandt M, Ito J, Fothergill A, Marr K (2005a) Mistaken Identity: *Neosartorya pseudofischeri* and Its Anamorph Masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:2, pp. 5996-5999.
- Balajee S, Houbraken J, Verweij P, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, Samson R (2007) *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology*.59, pp. 39-46
- Beauvais A, Latgé JP (2001) Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates*. 4:1, pp. 38-49
- Beernaert L, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Dorrestein G, Verstappen F, Vercammen F, Haesebrouck F, Martel A (2009) Avian *Aspergillus fumigatus* Strains Resistant to both Itraconazole and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53:5, pp. 2199-2201
- Beernaert L, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, Martel A (2010) *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathology*. 39:5, pp. 325-331
- Bennett J, Klick M (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*. 16:3, pp. 497-516.
- Bhat R, Rai R, Karim A (2010) Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9:1, pp. 57- 82
- Bickford D, Lohman D, Sodhi N, Ng P, Meier R, Winker K, Ingram K, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 22:3, pp. 148-155
- Bird Guide - The CornellLab of Ornithology { “ [HYPERLINK http://www.allaboutbirds.org/NetCommunity/Page.aspx?pid=1077&q=Gavia+stellata](http://www.allaboutbirds.org/NetCommunity/Page.aspx?pid=1077&q=Gavia+stellata)” } – Acedido 14 de Abril de 2014
- Bok J, Balajee S, Marr K, Andes D, Nielsen K, Frisvad J, Keller N (2005) LaeA, a Regulator of Morphogenetic Fungal Virulence Factors. *Eukaryotic Cell*. 9:4, pp. 1574-1582
- Boudra H, Morgavi D (2005) Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Animal Feed Science and Technology*. 120, pp. 113-123

- Bowman S, Free S (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 28:8, pp. 799-808.
- Brock M (2009) Fungal metabolism in host niches. *Current Opinion in Microbiology*. 12:4, pp. 371-376
- Bueid A, Howard S, Moore C, Richardson M, Harrison E, Bowyer P, Denning D (2010) Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65:10, pp. 2116-2118.
- Butcher G, Jacob J, Mather F (2003) Respiratory Diseases. Common Poultry Diseases. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. PS47, pp. 1-19.
- Cacciuttolo E, Rossi G, Nardoni S, Legrottaglie R, Mani P (2009) Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. *Veterinary Research Communications*. 33, pp. 521 – 527
- Campbell C, Johnson E, Philpot C, Warnock D (1996) Identification of pathogenic Fungi. *Public Health Laboratory Service*. London. pp. 298. ISBN 0901144398
- Cannon R, Lamping E, Holmes A, Niimi K, Baret P, Keniya M, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk B (2009) Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2:22, pp. 291-321
- CAST (2003) Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. *Council for Agricultural Science and Technology*. Task Force Report N°139. Ames, IA, USA.
- Causey D, Edwards S (2008) Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *Journal of Infectious Diseases*. 198:1. pp. S29-S33
- Ceolin L, Corrêa I, Galiza G, Lovato M, Kommers G, Risso N, Santurio J (2012) Macroscopic and Microscopic Diagnosis of Aspergillosis in Poultry. Case Report. *Acta Scientiae Veterinariae. Publication 1061*. 40:3. pp. 1-4
- Chai L, Vonk A, Kullberg B, Verweij P, Verschuere I, Meer J, Jossten L, Latgé JP, Netea M (2011) *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes and Infection*. 13:2, pp. 151-159
- Chi MH, Craven K (2013) Oxygen and an Extracellular Phase Transition Independently Control Central Regulatory Genes and Conidiogenesis in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*. 8:9, pp. 1-12. e74805
- Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis J (2013) Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. *PLOS Pathogens*. 9:10. e1003633
- Clark S, Daly R, Jordan E, Lee J, Mathew A, Ebner P (2012) Extension Education Symposium: The Future of biosecurity and antimicrobial use in livestock production in the United States and the role of extension. *Journal of Animal Science*. 20:8, pp. 2861- 2872
- Clarke A, Rothery P (2008) Scaling of body temperature in mammals and birds. *Functional Ecology*. 22:1, pp. 58-67
- Clements Checklist (2007) The Cornell lab of Ornithology. Clements, J. Clements Checklist of Birds of the World, 6th Edition. 2013
- CLSI (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second. CLSI document M38-A2. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. pp. 1-13
- Crnich C, Safdar N, Maki D (2005) The Role of the Intensive Care Unit Environment in the Pathogenesis and Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia. *Respiratory Care*. 50:6, pp. 813-836
- Crook B (2011) Bioaerosols from commercial composting. HPA Bioaerosols Group March. Microbiology team, Health and Safety Laboratory. *An Agency of the Health and Safety Executive*. pp. 1-24.
- Dagenais T, Keller N (2009) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 22:3, pp. 447-465
- Denning D (1998) Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 26:24, pp.781-803
- Denning D, Anderson M, Turner G, Latgé JP, Bennett J (2002) Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. *The Lancet Infectious Diseases*. 2:4, pp.251–253.
- Denning D, Bowye P (2013) Voriconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Should We Be Concerned? *Clinical Infectious Diseases*. 57:4, pp. 521–3
- Denning D, Venkateswarlu K, Oakley K, Anderson M, Manning N, Stevens D, Warnock D, Kelly S (1998) Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:6, pp. 1364-1368
- Denning, D.; Clemons, K.; Stevens, D. (1992) Quantitative preservation of viability of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*. 30:6, pp. 485-488.
- Dhama K, Chakraborty S, Verma A, Tiwari R, Barathidasan R, Kumar A, Singh S (2013) Fungal/Mycotic Diseases of Poultry-diagnosis, Treatment and Control: A Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16:23, pp. 1626-1640

- Dimopoulos G, Frantzeskaki F, Poulakou G, Armaganidis A (2012) Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1272:1, pp. 31-39
- Donham K, Thelin A (2006) Occupational and Environmental Health for the Health Professions. Agricultural Medicine. *Wiley-Blackwell*. pp. 1- 429. ISBN 978 0 81381803 0
- Dotis J, Roilides E (2004) Osteomyelitis due to *Aspergillus* spp. in patients with chronic granulomatous disease: comparison of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Infectious Diseases*. 8:2, pp. 103-110
- Doyle M (2007) Fri Briefings: Microbial Food Spoilage — Losses and Control Strategies. Food Research Institute, University of Wisconsin–Madison.3, pp. 1-10
- EPA, United States Environmental Protection Agency. (2008) Mold Remediation in Schools and Commercial Buildings. Indoor Air Quality (IAQ). EPA 402-K-01-001. pp. 1-47
- EUCAST (2012) Itraconazole and *Aspergillus* spp. Rationale for the EUCAST Clinical Breakpoints, Version 1.0. pp. 1-11 {“ HYPERLINK: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Rationale_documents/Itraconazole_AspERGILLUS_v1_0f.pdf“}
- Falvey D, Streifel A (2007) Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. *Journal of Hospital Infection*. 67:1, pp. 35-41
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014) Poultry and Nutrition and Feed. Agriculture and Consumer Protection Department. Animal Production and Health.
- FDA, Food and Drug Administration. (2013) Food Code. Public Health Service. U. S. Department of Health and Human Services. ISBN 978-1-935239-02-4
- Femenia F, Fontaine JJ, Lair-Fullerger S, Berkova N, Huet D, Towanou N, Rakotovao F, Granet OI, Le Loc'h G, Arné P, Guillot J (2007) Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathology*. 36:3, pp. 213-219
- Ferreira W, Sousa J (2000) *Microbiologia. Micoses subcutâneas e sistêmicas*. 2, pp. 329 – 342. Lidel – Edições Técnicas.
- Fontaine T, Beauvais A, Loussert C, Thevenard B, Fulgsang C, Ohno N, Clavaud C, Prevost MC, Latgé JP (2010) Cell wall a1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*. 47:8, pp. 707-712
- Friend M, Franson J (1999) Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds. USGS, National Wildlife Health Center. 13, pp. 129-134
- Frisvad J, Larsen T, Vries R, Meijer M, Houbraken J, Cabañes F, Ehrlich K, Samson R (2007) Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*. 59, pp. 31-37.
- Fuller K, Ringelberg C, Loros J, Dunlap J (2013) The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. *mBio Journals*. 4:2, pp. 1-12
- Geiser D (2009) Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*. 47:1, pp. 21–26.
- Gisi U (2013) Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: a critical review. *Pest Management Science*. 70:3. pp. 1-13
- Glass N, Donaldson G (1995) Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4, pp. 1323–1330
- Goebes M, Baron E, Mathews K, Hildemann L (2008) Effect of Building Construction on *Aspergillus* Concentrations in a Hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 29:5, pp. 462-4
- Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Gelbart W, Suzuki D, Miller J (2005) Introduction to genetic analysis. *Genetic analysis*. 8(ed). 7, pp. 360-361
- Hartmann T, Sasse C, Schedler A, Hasenberg M, Gunzer M, Krappmann S (2011) Shaping the fungal adaptive – Stress responses of *Aspergillus fumigatus*. Mini Review. *International Journal of Medical Microbiology*. 301:5, pp. 408-416
- Heaney C, Sams E, Wing S, Marshall S, Brenner K, Dufour A, Wade T (2009) Contact with beach sand among beachgoers and risk of illness. *American Journal of Epidemiology*. 170:2, pp.164-172
- Henry T, Iwen P, Hinrichs S (2000) Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed
- Holh T, Feldmesser M (2007) *Aspergillus fumigatus*: Principles of Pathogenesis and Host Defense. *Eukaryotic Cell*. 6:11, pp. 1953–1963

- Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad J, Samson R (2005) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*. 97:6, pp. 1316-1329
- Hong SB, Shin HD, Hong J, Frisvad J, Nielsen P, Varga J, Samson R (2008) New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93:1-2, pp. 87-98
- Howard S, Arendrup M (2011) Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Medical Mycology*. 49:1, pp. 90-5
- Howard S, Cerar D, Anderson M, Albarrag A, Fischer M, Pasqualotto A, Laverdiere MM, Arendrup M, Perlin D, Denning D (2009) Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. *Emerging Infectious Diseases*. 15:7, pp. 1-9
- HSE, Health and Safety Executive. (2008) Statement of evidence: Respiratory hazards of poultry dust. UK, Executive 03/09, pp. 1 - 14
- Huber F, Bignell E (2014) Distribution, expression and expansion of *Aspergillus fumigatus* LINE-like retrotransposon populations in clinical and environmental isolates. *Fungal Genetics and Biology*. 64, pp. 1-9
- Huffman J, Gerber R, Du L (2010). Recent advancement in the biosynthetic mechanism for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*. 93:9, pp. 764-776.
- Hussein H, Brace J (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167:2, pp. 101-134
- Ibrahim-Granet O, Dubourdeau M, Latgé JL, Ave P, Huerre M, Brakhage A, Brock M (2008) Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cellular Microbiology*. 10:1, pp. 134-148
- Jacob J, Pescatore T, Cantor A (2011) Avian respiratory system. Chapter 3 – Chickem Anatomy and Physiology. Cooperative Extension Service. University of Kentucky, College of Agriculture.
- Jirotková D, Šoch M, Kernerová N, Pálka V, Zábranský L, Maresova I (2013) Possibilities of the use of electrolyzed water in poultry breeding. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 17:2, pp. 129-136
- Johnson E (2008) Issues in antifungal susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61:1, pp. 13-18.
- Juvvadi P, Gehrke C, Fortwendel J, Lamoth F, Soderblom E, Cook E, Hast M, Asfaw Y, Moseley M, Creamer T, Steinbach W (2013) Phosphorylation of Calcineurin at a Novel Serine-Proline Rich Region Orchestrates Hyphal Growth and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*. 9:8, pp. 1-19. e1003564
- Kappfahl C, Michalka A, Lass-Flörl C, Fischer G, Haase G, Ruppert T, Geginat G, Hof H (2008) Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *International Journal of Medical Microbiology*. 14:1, pp. 78-84
- Kelkar Y, Ochman H (2011) Causes and Consequences of Genome Expansion in Fungi. *Genome Biology and Evolution*. 4:1, pp. 13-23
- Khan A, Karuppaiyl S (2012) Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19:4, pp. 405-426
- Khosravinia H, Gharoni M, Darvishnia M (2009) Litter mycology and the impacts of litter type and preslaughter feed withdrawal on crop bacterial community in broiler chicken. *African Journal of Microbiology Research*. 3:10, pp. 844-850
- Kidd S, Ling L, Meyer W, Morrissey O, Chen S, Slavin M (2009) Molecular Epidemiology of Invasive Aspergillosis: Lessons Learned from an Outbreak Investigation in an Australian Hematology Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 30:12, pp. 1223-1226.
- Kleinkauf N, Verweij P, Arendrup M, Donnelly P, Cuenca-Estrella M, Fraaije B, Melchers W, Adriaenssens N, Kema G, Ullmann A, Bowyer P, Denning D (2013) Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *ECDC TECHNICAL REPORT*, pp. 1- 17
- Klich M (2009) Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health*. 25:9-10, pp. 657-667
- Komilowicz-Kowalska T, Kitowski I (2012) *Aspergillus fumigatus* and Other Thermophilic Fungi in Nests of Wetland Birds. *Mycopathologia*. 175:1-2, pp.43-56
- Kousha M, Tadi A, Soubani A (2011) Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review*. 20:121, pp. 156-174
- Krijgsheld P, Bleichrodt R, Van Veluw G, Wang F, Müller W, Dijksterhuis J, Wösten H (2013) Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 74:1, pp. 1-29

- Krimitzas A, Pyrri I, Kouvelis V, Kapsanaki-Gotsi, Typas M (2013) A Phylogenetic Analysis of Greek Isolates of *Aspergillus* Species Based on Morphology and Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences. *BioMed Research International*. Article ID 260395. 2013, pp. 1-18
- Latgé JP (1999) *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 12:2, pp. 310–350
- Latgé JP (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*. 9:8, pp. 382-389
- Latgé JP (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66:2, pp. 279-290
- Leung M, Díaz-Llano G, Smith T (2006) Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:26, pp. 9623-9635.
- Linden J, Camps S, Kampinga G, Arends J, Debts-Ossenkopp Y, Haas P, Rijnders B, Kuijper E, Van Tiel F, Varga J, Karawajczyk A, Zoll J, Melchers W, Verweij P (2013) Aspergillosis due to Voriconazole Highly Resistant *Aspergillus fumigatus* and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates From Domiciles. *Clinical Infectious Diseases*. 57:4, pp. 513-520.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (1999) *Molecular Cell Biology*. New York. W.H. Freeman and Company. 4th. pp. 373.
- Low S, Danneniller K, Yao M, Yamamoto N, Peccia J (2011) The Allergenicity of *Aspergillus fumigatus* conidia is influenced by growth temperature. *Fungal Biology*. 115:7, pp. 1-16
- Maertens J (2004) History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*. 10:1, pp. 1-10
- Matias R, Catry P, Costa H, Elias G, Jara J, Moore C, Tomé R (2007) Systematic List of The Birds of Mainland Portugal. *Anuário Ornitológico*. 5, pp. 74-132
- McCormick A, Loeffler J, Ebel F (2010) *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology*. 12:11, pp. 1535-1543
- McVey D, Kennedy M, Chengappa M (2013) *Veterinary Microbiology*. 3 (ed). Wiley-Blackwell
- Melo dos Santos V, Dorner J, Carreira F (2002) Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia*. 156, pp. 133-138
- Metzker M (2005) Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Research*. 15, pp. 1767-1776
- Mexis S, Chouliara E, Kontominas M (2012) Self life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. *LWT - Food Science and Technology*. 49:1, pp. 21-27
- Montenegro G, Puch S, Jewtuchowicz V, Pinoni M, Relloso S, Temporitti E, Iovannitti C, Mujica M (2009) Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology*. 58:3, pp. 391-395
- Morio F, Aubin G, Danner-Boucher D, Haloun A, Sacchetto E, Garcia-Hermosos D, Bretagnes S, Miegville M, 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*. 67:8, pp. 1870-1873.
- Mortensen K, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodríguez-Tudela J, Johansen H, Arendrup M (2010) Environmental Study of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* and Other Aspergilli in Austria, Denmark and Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 11:54, pp.4545-4549
- Mycobank.org {“ HYEPRKINK
<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr =211776>” } - Acedido 15 de Abril de 2014
- Nardoni S, Ceccherelli R, Rossi G, Mancianti F (2006) Aspergillosis in *Larus cachinnans miccaellis*: Survey of eight cases. *Mycopathologia*. 161:5, pp. 317–321
- Nierman W, Pain A, Anderson M, Wortman J, Kim H, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer D, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer P, Farman M, Fedorova N, Feldblyum T, Fischer R, Fosker N, Fraser A, García J, García M, Goble A, Goldman G, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jiménez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafton A, Latgé JP, Li W, Lord A, Lu C, Majoros W, May G, Miller B, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyana I, Mulligan S, Murphy L, O'Neill S, Paulsen I, Peñalva M, Perteua M, Price C, Pritchard B, Quail M, Rabinowitsch E, Rawlins N, Rajandream MA, Reichard U, Renauld H, Robson G, Córdoba S, Rodríguez-Peña J, Ronning C, Rutter S, Salzberg S, Sanchez M, Sánchez-Ferrero J, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaia F, Turner G, Vazquez de Aldana C, Weidman J, White O, Woodward J, Yu JH, Fraser C, Galagan J, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning D (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 438, pp. 22-29

- O'Donnell K (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics*. 22:3, pp. 213 – 220
- Ok M, Einsele H, Loeffler J (2011) Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *International Journal of Medical Microbiology*. 301:5, pp. 445–452
- Olias P, Gruber A, Hafez H, Lierz M, Slesiona S, Brock M, Jacobsen D (2011) Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks and their environment. *Veterinary Microbiology*. 148:2-4, pp. 348-355
- Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani J, Odds F, Rex J (2010) An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9, pp. 719-727
- Pagano L, Caira L, Picardi M, Candoni A, Melillo L, Fianchi L, Offidani M, Nosari, A (2007) Invasive Aspergillosis in Patients with Acute Leukemia: Update on Morbidity and Mortality—SEIFEM-C Report. *Clinical Infectious Diseases*. 44:11, pp. 1524-1525
- Park S, Mehrad B (2009) Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews*. 22:4, pp. 535-551
- Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O (2008) Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. 46:2, pp. 201 -11
- Pasqualotto A (2010) *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. Springer. pp. 1- 1027. ISBN 978-90-481-2408-4
- Paterson R (2006) Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research*. 110:9, pp. 1003-1010
- Patron D (2006) *Aspergillus*, Health Implication & Recommendations for Public Health Food Safety. *Internet Journal of Food Safety*. 8, pp. 19-23
- Pena G, Pereyra C, Armandol M, Chiacchiera S, Magnoli C, Orlando J, Dalcero A, Rosa C, Cavaglieri L (2010) *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*. 50:1, pp. 77–81
- Perdelli F, Cristina M, Sartini M, Sagnolo A, Dallera M, Ottria G, Lombardi R, Grimaldi M, Orlando P (2006) Fungal Contamination in Hospital Environments. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 27:1, pp. 44-7
- Perfect J, Cox G, Lee J, Kauffman C, Repentigny, L, Chapman S, Morrison V, Pappas P, Hiemenz J, Stevens D (2001) The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 33:11, pp. 1824-33
- Perkhofer S, Lass-Flörl C, Hell M, Russ G, Krause R, Hönigl M, Geltner C, Auberger J, Gastl G, Mitterbauer M, Willinger B, Knöbi P, Resch G, Waldner R, Makrai A, Hartmann G, Girschikofsky M, Greil R (2010) The Nationwide Austrian *Aspergillus* Registry: a prospective data collection on epidemiology, therapy and outcome of invasive mould infections in immunocompromised and/or immunosuppressed patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 36:6, pp. 531-536.
- Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad J, Meijer M, Noonim P, Mahakarnchanakul W, Samson R (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*. 6:59, pp. 53-66.
- Perrott J, Armstrong D (2011) *Aspergillus fumigatus* Densities in Relation to Forest Succession and Edge Effects: Implications for Wildlife Health in Modified Environments. *EcoHealth*. 8:3, pp. 290-300
- Pfaller J, Messer S, Hollis R, Diekema R, Pfaller M (2003) In Vitro Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp.: Comparison of Etest and Reference Microdilution Methods for Determining Voriconazole and Itraconazole MICs. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:3, pp. 1126–1129
- Pfaller M (2012) Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*. 125:1, pp. S3-S13.
- Pfaller M, Diekema D, Ghannoum M, Rex J, Alexander B, Andes D, Brown S, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Fowler C, Johnson E, Knapp C, Motyl M, Ostrosky-Zeichner L, Sheehan D, Walsh T (2009) Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *Journal Clinical Microbiology*. 55:6, pp. 2855–2859.
- Phalen D (2006) Preventive and Screening Medicine. *Clinical Avian Medicine*. 21. pp. 573-585..
- Piggot A, Klaus J, Johnson S, Phillips M, Solo-Gabriel H (2012) Relationship between enterococcal levels and sediment biofilms at recreational beaches in South Florida. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:17, pp. 5973-5982

- Prester L, Macan J, Matkovic K, Vucemilo M (2010) Determination of *Aspergillus fumigatus* Allergen 1 in Poultry Farms using the Enzyme Immunoassay. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 61:2, pp. 167-173
- Pringle A, Baker D, Platt J, Wares J, Latgé JP, Taylor J (2005) Cryptic Speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution*. 59:9, pp. 1886-1899
- Protocolo Extração de DNA {“[HYPERLINKhttp://www.bioneer.co.kr/products/DNARNAPrep/GMO-GenomicDNAExtraction-technical.aspx](http://www.bioneer.co.kr/products/DNARNAPrep/GMO-GenomicDNAExtraction-technical.aspx)”} – Acedido a 7 de Dezembro de 2013.
- Prüss-Üstün A, Corvalán C (2006) Preventing disease through Healthy Environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. World Health Organization, WHO. ISBN 92 4 159382 2
- Ravindran V. (2014) Poultry feed availability and nutrition in developing countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. Poultry development review
- Reddy K, Salleh B, Saad B, Abbas H, Abel C, Shier W (2010) An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*. 29:1, pp. 3-26
- Reiss E, Shadomy H, Lyon G (2012) Fundamental Medical Mycology. Wiley-Blackwell. pp. 656
- Rex J, Pfaller M, Walsh T, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum M, Gosey L, Odds F, Rinaldi M, Sheehan D, Warnock, D (2001) Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 4:14, pp. 643-658
- Reza K, Nasrin A, Mahmoud S (2013) Clinical and pathological findings of concurrent poxvirus lesions and aspergillosis infection in canaries. *Asian Pacific Journal of Trpical Biomedicine*. 3:3, pp. 182-185
- Rochette F, Engelen M, Vanden Bossche H (2003) Antifungal agents of use in animal health – practical applications. *Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics*. 26:1, 31–53
- Rodland E, Ueland T, Pedersen T, Halvorsen B, Muller F, Aukrust P, Froland S (2010) Activation of Platelets by *Aspergillus fumigatus* and Potential Role of Platelets in the Immunopathogenesis of Aspergillosis. *Infection and Immunity*. 78:3, pp.1269-1275
- Rodriguez-Tudela J, Arendrup M, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning D, Donnelly J, Fegeler W, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Gaustad P, Schmalreck A, Velegriaki A, Verweij P (2008) EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Antifungal MIC method for conidia forming moulds. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID. *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*. pp. 1-13
- Rutala W, Weber D (2004) Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: What Clinicians Need to Know. *Clinical Infectious Diseases*. 39:5, pp. 702-709
- Rutala W, Weber D, The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC).
- Sabino R, Rodrigues R, Costa I, Carneiro C, Cunha M, Duarte A, Faria N, Ferreira F, Gargaté M, Júlio C, Martins M, Nevers M, Oleastro M, Solo-Gabriele H, Veríssimo C, Viegas C, Whitman R, Brandão J (2014a) Routine screening of harmful microorganisms in beach sands: Implications to public health. *Science of the Total Environment*. 472, pp. 1062-1069
- Sabino R, Veríssimo C, Parada H, Brandão J, Viegas C, Carolino E, Clemons K, Stevens D (2014b) Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. *Medical Mycology* (accepted) . doi: 10.1093/mmy/myu006.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:4839, pp. 487-491
- Samson A, Hoeksha E, Frisvad J, Filtenborg O (2000) Introduction to Food and Airborne Fungi. CBS.
- Samson R, Hong S, Peterson S, Frisvad J, Varga J (2007) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*. 59, pp. 147-203
- Samson R, Varga J (2009) What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*. 47:1, pp. 13–20
- Schmidt A (1998) Georg Fresenius and the species *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*. 41:2, pp.89-91
- Secuenciación automática de ADN basada en técnica de Sanger {“[HYPERLINK - http://www.youtube.com/watch?v=ujhxO6dPsX0](http://www.youtube.com/watch?v=ujhxO6dPsX0)”}- Acedido a 16 de Julho de 2014
- Sehgal R (2010) Deforestation and avian infectious diseases. *The Journal of Experimental Biology*. 213:6, pp. 955-950
- Serrano R, Gusmão L, Amorim A, Araújo R (2011) Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiology*. 11:82. pp. 1- 7.

- Shah A, Abdelzaher A, Phillips M, Hernandez R, Solo-Gabriele H, Kish J, Scorzetti G, Fell J, Diaz M, Scott T, Lukasik J, Harwood V, McQuaig S, Sinigalliano C, Gidley L, Wanless D, Ager A, Lui J, Stewart R, Plano L, Fleming L (2011) Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminthes in sand at a subtropical recreational beach site. *Journal of Applied Microbiology*. 110:6, pp. 1571-1583
- Sharma K (2012) Prevalence of *Aspergillus* in the phyllosphere of *Ocimum sanctum*. *Journal of Phytology*. 4:3, pp. 14-15
- Sheehan D, Hitchcock C, Sibley C (1999) Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12:1, pp. 40-79
- Siegel J, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007) Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
- Snelders E (2012) Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: collateral damage of fungicide use. Dissertation, Radboud Universiteit Nijmegen.
- Snelders E, Camps S, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema G, Van der Lee H, Klaassen C, Melchers W, Verweij P (2012) Triazole Fungicides Can Induce Cross- Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*. 7:3, pp. 1-11
- Snelders E, Van der Lee H, Kuijpers J, Rijs A, Varga J, Samson R, Mellado E, Donders A, Melchers W, Verweij P (2008) Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*. 5:11, pp. 1-9. e219
- Sobel J, The Mycoses Study Group (2000) Practice Guidelines for the Treatment of Fungal Infections. *Clinical Infectious Diseases*. *Guidelines from the Infectious Diseases Society of America*. 30:4, pp.652
- Sonaiya E, Swan S (2004) Small - Scale Poultry Production. Technical guide. *FAO Animal Production and Health*. pp. 1-109
- Spacer Regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:4, pp. 1510-1515
- Stevens D, Schwartz M, Lee J, Moskovitz B, Jerome D, Catanzaro A, Bamberger D, Weinmann A, Tuazon C, Judson M, Platts-Mills T, Grossman J, Slavin R, Reuman P, DeGraff A (2000) A Randomized Trial of Itraconazole in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *The New England Journal of Medicine*. 342:11, pp. 756-762.
- Suleiman M, Duncan N, Eloff J, Naidoo V (2012) A controlled study to determine the efficacy of *Loxostylis alata* (Anacardiaceae) in the treatment of *Aspergillus* in a chicken (*Gallus domesticus*) model in comparison to ketoconazole. *BMC Veterinary Research*. 8:210, pp.1 -10
- Sydnor E, Perl T (2011) Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*. 24:1, pp. 141-173
- Tauxe R (2001) Food Safety and Irradiation: Protecting the Public from Foodborne Infections. Conference Presentations. *Emerging Infectious Diseases*, 7:3, pp. 516-521.
- Taylor J (2011) One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus*. 2:2, pp. 113–120.
- The poultry site { HYPERLINK <http://www.thepoultrysite.com/articles/1048/what-measures-can-be-taken-to-keep-the-hatchery-free-of-the-fungus-aspergillus> }- Acedido a 22 de Maio de 2014
- Thierry S, Durand B, Melloul E, Tafani JP, Wang D, Deville M, Cordonnier N, Chermette R, Guillot J, Arné P (2013) Assessment of *Aspergillus fumigatus* pathogenicity in aerosol- challenged chickens (*Gallus gallus*) belonging to two lineages. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 36:4, pp. 379-385
- Thierry S, Wang D, Arné P, Deville M, De Bruin B, Nieguitsila A, Pourcel C, Laroucau K, Chermette R, Huang W, Botterel F, Guillot J (2010) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiology*. 10:315, pp. 1-8
- Tomee J, Kauffman H (2000) Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical & Experimental Allergy*. 30:4, pp. 476-484
- Van der Linden J, Camps S, Kampinga G, Arends J, Debets-Ossenkopp Y, Haas P, Rijnders B, Kuijper E, Van Tiel F, Varga J, Karawajczyk A, Zoll J, Melchers W, Verweij P (2013) Aspergillosis due to Voriconazole Highly Resistant *Aspergillus fumigatus* and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates From Domiciles. *Clinical Infectious Diseases*. 57:4, pp. 513-20.
- Van der Linden J, Snelders E, Kampinga G, Rijnders B, Mattsson E, Debets-Ossnkopp Y, Kuijper E, Van Tiel F, Melchers W, Verweij P (2011a) Clinical Implications of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007–2009. *Emerging Infectious Diseases*. 17:10, pp. 1846-1854
- Van der Linden J, Warris A, Verweij P (2011b) *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Medical Mycology*. 49:1, pp. 82-89

- Van Waeyenberghe L, Pasmans F, D'Herde K, Ducatelle R, Favoreel H, Li SJ, Haesebrouck F, Martel A. (2012) Germination of *Aspergillus fumigatus* inside avian respiratory macrophages is associated with cytotoxicity. *Veterinary Research*. 43:32, pp. 1-5
- Varga J, Tóth B (2003) Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 3:1, pp. 3-17
- Verweij P, Howard S, Melchers W, Denning D (2009a) Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resistance Updates*. 12:6, pp. 141-7
- Verweij P, Snelders E, Kema G, Mellado E, Melchers W (2009b) Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *The Lancet Infectious Diseases*. 9, pp. 789-95
- Verweij P, Varga J, Houbraken J, Rijs A, Verduyn Lunel F, Blijlevens N, Shea Y, Holland S, Warris A, Melchers W, Samson R (2008) *Emericella quadrilineata* as cause of Invasive Aspergillosis. *Emerging Infectious Diseases*. 14:4, pp. 566-572
- Viegas C, Carolino E, Malta-Vacas J, Sabino R, Viegas S, Veríssimo C (2012) Fungal Contamination of Poultry Litter: A Public Health Problem. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 5:22-23, pp. 1341-1350
- Viegas C, Malta-Vacas J, Sabino R, Viegas S, Veríssimo C (2014) Accessing indoor fungal contamination using conventional and molecular methods in Portuguese poultries. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186:3, pp. 1951-1959
- Viegas S, Veiga L, Figueredo P, Almeida A, Carolino E, Sabino R, Veríssimo C, Viegas C (2013) Occupational exposure to aflatoxin B₁: the case of poultry and swine production. *World Mycotoxin Journal*. 6:3, pp. 309-315
- Walsh T, Anaissie E, Denning D, Herbrecht R, Kontoyiannis D, Marr K, Morrison V, Segal B, Steinbach, W.; Stevens, D.; Burrik, J.A.; Wingard, J.; Patterson, T. (2008) Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 46:3, pp. 327-60
- Wang Y, Chai T, Lu G, Quan C, Duan H, Yao M, Zucker BA, Schlenker G (2008) Simultaneous detection of airborne Aflatoxin, Ochratoxin and Zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environmental Research*. 107:2, pp. 139-144
- Waterman M, Lepesheva G (2005) Sterol 14 α -demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. Review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338:1, pp. 418-422.
- WHO, World Health Organization. (1997) High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 KGy, a joint FAO/IAEA/WHO study group. Food safety. 890, pp. 15-20
- Williams C (2009) Poultry waste management in developing countries. *Poultry Development Review*. pp.1-4
- Zafra R, Perez J, Perez-Ecija RA, Borge C, Bustamante R, Carbonero A, Tarradas C (2008) Concurrent Aspergillosis and Ascites with high mortality in a farm of growing broiler chickens. *American Association of Avian Pathologists*. 52:4, pp. 711-713
- Zain M (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal Saudi Chemical Society*. 15:2, pp. 129-144
- Zhang N, O'Donnell K, Sutton D, Nalim F, Summerbell R, Padhye A, Geiser D (2006) Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 6:44, pp. 2186-2190
- Zmeili O, Soubani A (2007) Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM: An International Journal of Medicine*. 100:6, pp. 317-334

Material e Métodos

- PBST - *Phosphate Buffered Saline with Tween* (Denning *et al.*, 1992)

Para a preparação de 800 μ L de PBST adiciona-se num frasco *schoot* 200 mL de PBS (pH 7,5) e 800 μ L de *Tween* 80, que segue para auto-clave.

Meio tampão que garante a conservação da viabilidade de estirpes de *Aspergillus fumigatus* conservadas a -70°C .

- Reconstituição da Liticase por Protocolo PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis)

À liticase liofilizada obtida de *Arthrobacter luteus* (250.000; Sigma - Albrich) adiciona-se 2,5 mL de glicerol (87% p/p) e 2,5 mL de NaH_2PO_4 , Tampão Fosfato [20 mM], pH 8. De seguida emerge-se a preparação num banho a 37°C , durante 30 minutos.

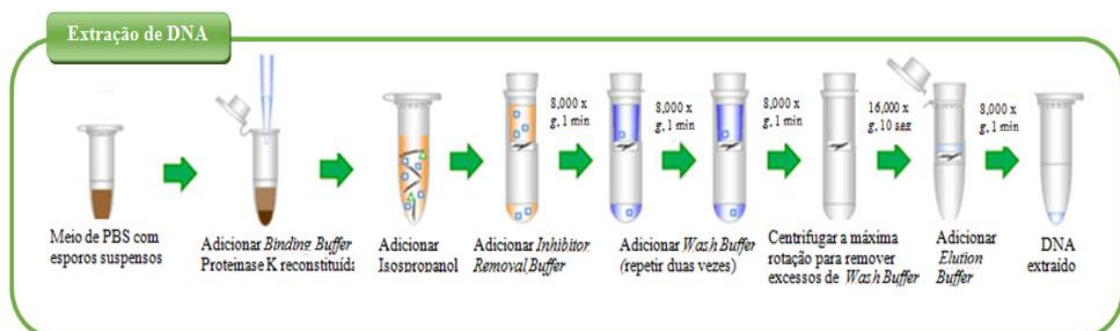
Após ter terminado, realiza-se alíquotas. Dos aproximadamente 5 mL do preparado retira-se 0,25 mL e perfaz-se com água ultra pura até aos 2,5 mL. Terminando isto, distribui-se por *ependorfs*.

- Preparação de alíquotas de Reagentes (exemplo: *primers*)

Num *ependorf* adiciona-se 20 μ L do Produto alíquotar (*primer* com a sua concentração normal) com 180 μ L de água ultra pura.

Ilustração da Metodologia

Processo de Extração do ADN - <http://www.bioneer.co.kr/products/DNARNAPrep/GMO-GenomicDNAExtraction-technical.aspx>



Esquema representativo do procedimento experimental utilizado no estudo das estirpes de *Aspergillus fumigatus* e no estudo da Suscetibilidade das mesmas

