



# REMARA

Rede EBSEH de Monitoramento  
de *Aspergillus* spp.  
Resistentes a Antifúngicos

**Manuais laboratoriais**

## Apresentação

É com grande satisfação que damos as boas-vindas aos pesquisadores, estudantes, profissionais de saúde e equipes laboratoriais dos hospitais universitários da Rede EBSEH que passam a integrar a Rede EBSEH de Monitoramento de *Aspergillus* spp. Resistentes a Antifúngicos (REMARA). Estamos muito felizes em iniciar este projeto de abrangência nacional, cuidadosamente planejado para ter aplicação direta no Sistema Único de Saúde (SUS), fortalecendo a integração entre assistência, ensino, pesquisa e vigilância em saúde. A participação ativa dos centros, envolvendo profissionais da saúde, docentes, residentes, pós-graduandos e estudantes de graduação, é fundamental para o êxito da Rede e para a formação de recursos humanos qualificados, comprometidos com a qualificação do cuidado aos pacientes e com a produção de evidências científicas relevantes para a saúde pública brasileira.

Desde sua concepção, o projeto foi estruturado de forma organizada, padronizada e plenamente compatível com a rotina hospitalar, com o objetivo de facilitar a adesão dos centros e assegurar a qualidade e a comparabilidade dos dados gerados, destacando-se como diferencial central desta iniciativa a oferta de diagnóstico em tempo real para os pacientes. Todo o material necessário para esta etapa clínico-laboratorial está disponibilizado aos centros participantes, incluindo Protocolos Operacionais Padrão (POPs), manuais clínicos e laboratoriais, cartazes e folders informativos, modelos padronizados de ficha de solicitação de exames, Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Termos de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), além de um Caderno de Registros para o controle físico das amostras, acompanhamento dos resultados e organização dos fluxos locais. O registro, a organização e o gerenciamento dos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da Rede serão realizados por meio da plataforma REDCap, adotada como sistema oficial do projeto, garantindo rastreabilidade, segurança das informações e integração entre os centros.

Um diferencial estratégico adicional desta iniciativa é a padronização diagnóstica baseada no uso de kits comerciais desenvolvidos especificamente para o projeto. No âmbito do Edital CNPq RAM – 2022, a empresa parceira CECOM, de São Paulo, desenvolveu um kit de triagem para aspergilose inéxito no Brasil, concebido para atender às necessidades desta Rede Nacional. Adicionalmente, será utilizado um kit rápido para detecção de IgG anti-*Aspergillus*, uma inovação no cenário nacional, cujos resultados poderão contribuir de forma decisiva para a avaliação do desempenho diagnóstico e para futuras estratégias de incorporação dessa tecnologia no SUS.

Um dos pontos cruciais do projeto será o envio dos isolados clínicos obtidos nos centros participantes ao centro coordenador, para identificação de espécies, confirmação fenotípica e molecular da resistência antifúngica, assegurando maior robustez analítica, padronização dos resultados e fortalecimento da vigilância nacional.

Embora estruturado como uma rede colaborativa de abrangência nacional, o projeto respeita e estimula a autonomia científica dos centros participantes, permitindo o desenvolvimento de estudos locais de prevalência, caracterização clínica e perfil epidemiológico da aspergilose, bem como a utilização dos dados para atividades de

iniciação científica, trabalhos de conclusão de curso, dissertações e teses, sempre em consonância com os princípios éticos e com as diretrizes de governança da Rede. Essa abordagem favorece a produção científica descentralizada, ao mesmo tempo em que preserva a padronização metodológica necessária para análises multicêntricas integradas.

Do ponto de vista estratégico, a adoção de insumos comerciais padronizados, aliada à organização rigorosa dos fluxos clínicos e laboratoriais, permitirá não apenas o aprimoramento do diagnóstico e do manejo terapêutico da aspergilose, mas também a geração de evidências sólidas para a realização de um estudo final de custo-efetividade. Esses dados são fundamentais para subsidiar processos de avaliação de tecnologias em saúde e apoiar decisões relacionadas à incorporação de métodos diagnósticos e estratégias terapêuticas no âmbito do SUS. Assim, ao integrar assistência, vigilância, inovação diagnóstica e avaliação econômica, a Rede REMARA consolida-se como uma iniciativa de relevância científica, assistencial e estratégica para o enfrentamento da aspergilose e da resistência antifúngica no Brasil.

Campo Grande, dezembro de 2025

James Venturini  
Coordenador Geral

## Perguntas e respostas

### **1. O que é a aspergilose e por que ela é importante para o SUS?**

A aspergilose é um conjunto de doenças causadas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. fumigatus*, podendo se manifestar em diferentes formas clínicas, como aspergilose pulmonar crônica e aspergilose invasiva. Trata-se de uma condição de grande relevância no contexto hospitalar, sobretudo em pacientes com doenças pulmonares prévias, indivíduos críticos e pessoas imunocomprometidas, com impacto direto na morbimortalidade e na utilização de recursos assistenciais no SUS.

### **2. Por que a resistência antifúngica é uma preocupação crescente?**

Os antifúngicos azólicos constituem a base do tratamento da aspergilose, e o aumento da resistência de *A. fumigatus* a esses medicamentos tem sido associado a falhas terapêuticas e elevadas taxas de mortalidade. A resistência antifúngica, portanto, é um desafio clínico emergente e uma prioridade para vigilância, diagnóstico oportuno e decisão terapêutica adequada.

### **3. Qual é a relação entre ambiente, agricultura e resistência antifúngica?**

O uso extensivo de fungicidas azólicos na agricultura pode favorecer o surgimento de isolados ambientais resistentes, com potencial de exposição humana por inalação. Esse cenário reforça a necessidade de compreender a resistência antifúngica sob a perspectiva da Saúde Única (One Health), integrando dimensões da saúde humana, ambiental e animal.

### **4. Por que este projeto está sendo realizado?**

No Brasil, poucos laboratórios realizam testes de suscetibilidade antifúngica para fungos filamentosos na rotina hospitalar, o que limita a detecção precoce da resistência e a geração de dados comparáveis entre serviços. Este projeto cria uma Rede Nacional de Vigilância no âmbito da EBSEH, com metodologia padronizada, suporte técnico e integração de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, visando fortalecer o diagnóstico e o monitoramento da resistência.

### **5. Qual é o papel do meu hospital na Rede?**

Cada centro participante é essencial para o sucesso da Rede REMARA e contribuirá, de acordo com sua capacidade local, na identificação e inclusão de pacientes com suspeita clínica de aspergilose (aspergilose invasiva e aspergilose pulmonar crônica), na coleta de dados clínicos a partir dos prontuários, na obtenção de amostras biológicas conforme protocolo, na realização de exames de rotina e na triagem inicial de isolados de *Aspergillus* spp.. Quando indicado, os isolados poderão ser encaminhados ao centro coordenador para identificação de espécies e confirmação fenotípica e molecular da resistência. O registro e a organização dos dados serão realizados em caderno físico e, online, no REDCap, sempre respeitando os fluxos assistenciais e laboratoriais já estabelecidos em cada hospital.

## **6. Quem são os pacientes incluídos no estudo?**

De modo geral e a depender de cada centro colaborador, serão incluídos pacientes desde a idade  $\geq 2$  anos, atendidos em ambulatórios, enfermarias ou unidades de terapia intensiva, com suspeita clínica de aspergilose definida segundo critérios padronizados do projeto, incluindo aspergilose pulmonar crônica e aspergilose invasiva. A participação está condicionada à assinatura do TCLE e, quando aplicável, do TALE.

## **7. Quais materiais biológicos serão coletados e o que será analisado?**

Conforme indicação clínica e protocolo do estudo, poderão ser coletadas amostras respiratórias (por exemplo, escarro, lavado broncoalveolar e aspirado traqueal), sangue e exames de imagem, quando disponíveis. As amostras serão utilizadas para os objetivos do projeto, sem formação de biorrepositório, incluindo identificação de espécies, testes de suscetibilidade antifúngica, detecção de antígenos ou anticorpos no contexto da aspergilose, detecção de fenótipos resistentes/não selvagens, análises moleculares de mecanismos de resistência e estudos de epidemiologia molecular com correlação clínica. A coleta de material biológico constitui uma etapa crucial para o diagnóstico e solicitação de medicamentos antifúngicos pelo Ministério da Saúde.

## **8. Quais materiais e ferramentas serão disponibilizados aos centros participantes?**

Serão disponibilizados POPs, manuais clínicos e laboratoriais, cartazes e folders, modelos de ficha de solicitação de exame, TCLE/TALE e caderno de registros para controle de amostras e resultados. O projeto também disponibiliza kits comerciais padronizados desenvolvidos pela CECON (São Paulo), incluindo um kit de triagem inédito no Brasil e um kit rápido para detecção de IgG anti-*Aspergillus*, além da plataforma REDCap para registro e gerenciamento dos dados da Rede.

## **9. Os centros poderão realizar estudos locais de prevalência e análises próprias?**

Sim. O projeto incentiva a autonomia científica dos centros, permitindo o desenvolvimento de estudos locais de prevalência e caracterização clínica-epidemiológica, bem como o uso dos dados em atividades acadêmicas (iniciação científica, TCC, dissertações e teses), em consonância com os princípios éticos e com as diretrizes de governança e autoria estabelecidas pela Rede.

## **10. Quais são os resultados esperados e por que o estudo de custo-efetividade é importante?**

Espera-se aprimorar o diagnóstico da aspergilose, detectar precocemente a resistência antifúngica, qualificar o direcionamento terapêutico e fortalecer a vigilância epidemiológica nacional. Além disso, a padronização diagnóstica com kits comerciais e a organização rigorosa dos fluxos permitirão gerar evidências robustas para um estudo final de custo-efetividade, essencial para subsidiar processos de avaliação de tecnologias em saúde e apoiar decisões de incorporação de métodos e tecnologias no SUS, especialmente no que se refere a estratégias de triagem e ao uso do teste rápido de IgG anti-*Aspergillus*.

## Sumário

<b>Módulo I: Isolamento de <i>Aspergillus</i> de amostras clínicas e ambientais.....</b>	<b>9</b>
1. Procedimento de isolamento de fungos.....	9
2 Purificação de colônias de <i>Aspergillus</i> spp. ....	10
3 Identificação presuntiva da seção de <i>Aspergillus</i> .....	11
<b>Módulo II: Teste de Triagem (Four-Well-Plate) .....</b>	<b>21</b>
1 Procedimentos teste de triagem de resistência.....	21
2 Análise e interpretação .....	22
3 Envio dos isolados resistentes na triagem para laboratório de referência.....	23
<b>Módulo III: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em <i>Aspergillus</i> spp. ....</b>	<b>24</b>
1 Procedimentos teste de disco-difusão.....	24
2 Controle de qualidade.....	28
<b>Módulo VI: <i>Aspergillus</i> Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO) IgG-IgM.....</b>	<b>29</b>
1 Princípio do teste.....	29
2. Procedimento.....	29
3. Interpretação .....	29
<b>Módulo V: <i>Aspergillus</i> Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY) .....</b>	<b>31</b>
1. Princípio do teste.....	31
2. Procedimento.....	31
3. Leitura (Cube Reader).....	32

### Vídeos das técnicas laboratoriais

<p><b>Isolamento de Escarro e Aspirado Traqueal</b></p> 	<p><b>Isolamento de Lavado broncoalveolar e Saliva</b></p> 	<p><b>Purificação</b></p> 
<p><b>Identificação das 4 seções de <i>Aspergillus</i></b></p> 	<p><b>Teste de triagem (<i>Four well plate</i>)</b></p> 	<p><b>Disco-difusão</b></p> 
<p><b>Teste rápido IgG-IgM</b></p> 	<p><b>Teste rápido Galactomanana</b></p> 	

## Introdução

A primeira edição do Manual de Procedimentos, para a Rede de Hospitais EBSEH na Identificação e Monitoramento de Isolados Clínicos e Ambientais de *Aspergillus* spp. Resistentes aos Antifúngicos (REMARA), foi elaborada com o objetivo de padronizar as técnicas essenciais no diagnóstico e monitoramento de resistência aos antifúngicos. Este manual visa apoiar as atividades dos hospitais, proporcionando diretrizes claras e práticas para a detecção e análise de *Aspergillus* spp., agente de doença de crescente relevância devido à sua alta taxa de mortalidade e resistência ao tratamento convencional.

Com base em dados epidemiológicos alarmantes e frente à falta de informações detalhadas sobre a magnitude da resistência antifúngica no Brasil, o projeto delinea uma rede de monitoramento envolvendo hospitais das universidades federais. Este esforço conjunto visa fortalecer as estratégias e proporcionar uma resposta mais eficaz dentro do Sistema Único de Saúde (SUS).

Esta edição do manual é organizada em Módulos que abrangem desde a coleta e transporte de amostras clínicas até a determinação da sensibilidade antifúngica de *Aspergillus* spp., com a expectativa de que as unidades hospitalares possam, a partir dessas bases, melhorar suas práticas laboratoriais e atender às exigências crescentes no diagnóstico e manejo de aspergilose.

Os Módulos incluem:

- Módulo I: Isolamento de *Aspergillus* de amostras clínicas e ambientais
- Módulo II: Teste de Triagem (Four-Well-Plate)
- Módulo III: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp
- Módulo IV: *Aspergillus* Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO) IgG-IgM
- Módulo V: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)

A partir deste Manual, espera-se auxiliar os profissionais de saúde no enfrentamento dos desafios impostos pela resistência antifúngica, contribuindo para sua detecção.

## Módulo I: Isolamento de *Aspergillus* de amostras clínicas e ambientais

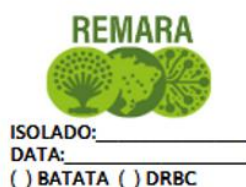
A aspergilose, causada por fungos do gênero *Aspergillus*, apresenta elevada mortalidade e crescente resistência aos antifúngicos, especialmente aos triazóis usados no tratamento. No Brasil, mais de um milhão de casos anuais reforçam a relevância do diagnóstico e monitoramento (GIACOMAZZI et al., 2016). A identificação e isolamento de *Aspergillus* são essenciais para detectar resistência, individualizar terapias e otimizar estratégias do SUS, reduzindo a mortalidade e fortalecendo a vigilância epidemiológica.

O Módulo I deste Manual oferece diretrizes detalhadas para o isolamento (POP 01) e identificação de seções do fungo do gênero *Aspergillus* a partir de amostras respiratórias e ambientais (POP 03), com o objetivo de monitorar a resistência antifúngica em isolados clínicos (POP 04 e 05). Este módulo é essencial para distinguir *Aspergillus* de outros fungos e garantir a precisão no diagnóstico. Uma seção engloba várias espécies que não podem ser identificadas, apenas, pela morfologia.

### 1. Procedimento de isolamento de fungos (POP 01)

Este procedimento é realizado em laboratório de nível de segurança NB-2, em ambiente asséptico, onde a desinfecção das superfícies de trabalho com álcool 70% é fundamental para garantir um ambiente seguro e livre de contaminação. Na cultura de fungos, podem ser utilizados diferentes meios seletivos. Neste projeto, será empregado o meio Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), que promove crescimento mais lento, inibindo o predomínio de fungos leveduriformes e facilitando o isolamento das diferentes colônias.

As placas devem ser retiradas do refrigerador e deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, são identificadas com etiquetas apropriadas utilizando o ID gerado no REDCap (ID da amostra difere do ID do paciente), presentes na Folha de Registro 1 POP 3 (Figura 1). Cada amostra segue um procedimento específico, adaptado às suas características, a fim de garantir a eficácia no isolamento e na identificação de *Aspergillus*. Na cultura de fungos, podem ser utilizados diferentes meios seletivos.



**Figura 1.** Etiqueta de identificação presuntiva, presente na Folha de Registro 1 POP 3.

### **1.1 Amostras de escarro e secreção traqueal**

As amostras de escarro e secreção traqueal devem receber acetilcisteína, na mesma proporção da amostra, pois ela proporciona quebrar as ligações dissulfeto das mucoproteínas presentes no muco, tornando-o menos viscoso e facilitando a sua dissolução. As amostras assim tratadas devem ser incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  em uma estufa bacteriológica por 3 a 12h. Após a incubação, a amostra é centrifugada em tubos de centrifuga a 2500 rpm por 10 a 15 minutos. Recolher todo o sedimento resultante (até 200 $\mu\text{L}$ ) com uma pipeta Pasteur descartável e inocular em ágar DRBC utilizando uma alça de inoculação. Incubar a placa invertida em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  e monitor por até 7 dias.

### **1.2 Amostras de lavado bronco-alveolar, saliva e tecido**

Para amostras de lavado bronco-alveolar, transferir todo o conteúdo para um tubo de centrifuga, e centrifugar a 2500 rpm por 10 a 15 minutos. Recolher o sedimento (*pellet*) e inocular em ágar DRBC com uma alça de inoculação e incuba-la sob as mesmas condições acima descritas. Fragmentar, cuidadosamente e ao máximo possível, a amostra de tecido com um bisturi estéril. Inocular cada fragmento em DRBC e incubar as placas sob  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Durante o processo de incubação, as placas não devem ser invertidas para garantir que qualquer líquido presente no tecido não se desprenda da superfície do ágar, o que poderia interferir no crescimento. Observar crescimento de colônias, diariamente, para selecionar aquelas com características de *Aspergillus* (item 2) e descartar as que não estiverem de acordo com tais características por meio da purificação da cultura.

Se houver confirmação de *Aspergillus* spp., continue com a purificação das colônias.

## **2 Purificação de colônias de *Aspergillus* spp. (POP 02)**

Retire uma porção da colônia e semeie pela técnica de esgotamento em placa contendo ágar batata, proporcionando uma ação bactericida, evitando possíveis contaminações. Incube a placa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por até 7 dias. Verifique a uniformidade das colônias, se houver uniformidade, siga para o próximo protocolo de identificação, caso contrário, repita os procedimentos de purificação até a obtenção de colônias uniformes.

### 3 Identificação presuntiva da seção de *Aspergillus* (POP 03)

A identificação presuntiva das quatro seções (Fumigati, Terrei, Nigri e Flavi) mais frequentes, em amostras clínicas e ambientais, será feita por análise da colônia e de sua micromorfologia.

#### 3.1 Morfologia da colônia

Realize a observação das colônias entre 48h e 7 dias após a incubação, conforme o tempo necessário para o crescimento das diferentes espécies de *Aspergillus*. As colônias apresentam características distintas, na textura e pigmentação, que são fundamentais para a identificação da seção. Consulte as características descritas no **Quadro 01**, que contém detalhes sobre os principais tipos de colônias de *Aspergillus*, incluindo suas texturas, cores e outros aspectos morfológicos. Identifique, presuntivamente, as quatro principais seções de *Aspergillus*, segundo os aspectos morfológicos das colônias de suas espécies representativas.

#### **Quadro 01. Aspectos morfológicos de colônias das principais seções de *Aspergillus***



A. Seção Fumigati (*Aspergillus fumigatus* e outras espécies). Colônias verde-acinzentadas esmaçadas ou verde-azuladas são produzidas a partir de 48h. A textura da superfície da cultura se assemelha a pó (pulverulenta). Um pigmento amarelo pode ser produzido por algumas cepas, o qual é visto no reverso das colônias. Para outras cepas, o reverso pode ser branco a castanho.

**Figura 1.** *Aspergillus fumigatus* em ágar DRBC, após 72h, sob  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

B. Seção Flavi (*Aspergillus flavus* e outras espécies). Colônias verde-amareladas (às vezes, verde-limão), a partir de 48h. O reverso da colônia tem cor dourada a marrom-avermelhada.



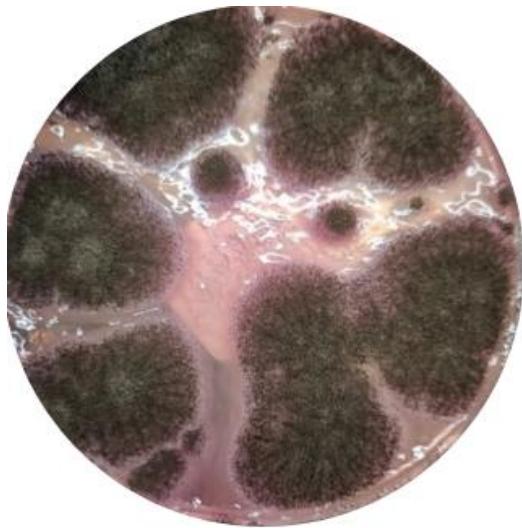
**Figura 2.** *Aspergillus flavus* em ágar DRBC, após 72h, sob  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

C. Seção Terrei (*Aspergillus terreus* e outras espécies). Colônias em tonalidades cor canela. A pigmentação das colônias também pode ser marrom, bege, marrom-alaranjada ou amarelo. O reverso da cultura apresenta tons de caramelo. A pigmentação é observada a partir de 48h.



**Figura 3.** *Aspergillus terreus* em ágar DRBC, após 72h, sob  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

D. Seção Nigri (*Aspergillus niger* e outras espécies). Colônias de "aspecto fosco e escuro" observado em colônias esporuladas. Colônias inicialmente brancas ou amareladas e com textura cotonosa, devido a formação de micélio sem esporos. À medida que a colônia amadurece, se torna coberta por denso agregado de conídios pretos, criando uma camada sobreposta conferindo aspectos semelhante a de "sal e pimenta do reino". Uma borda branca (micélio ainda sem esporos) ao redor de colônia madura é típica desta seção. O reverso da colônia é bege, castanho, amarelo, branco ou creme.



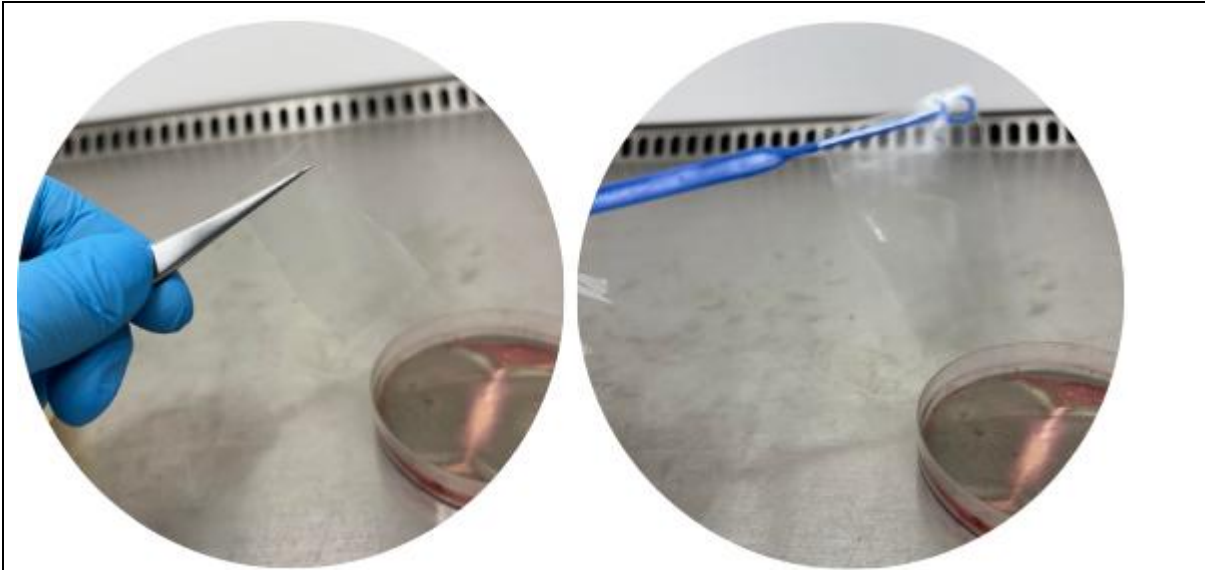
**Figura 4.** *Aspergillus niger* em ágar DRBC, após 72h, sob  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 3.2 Micromorfologia da colônia

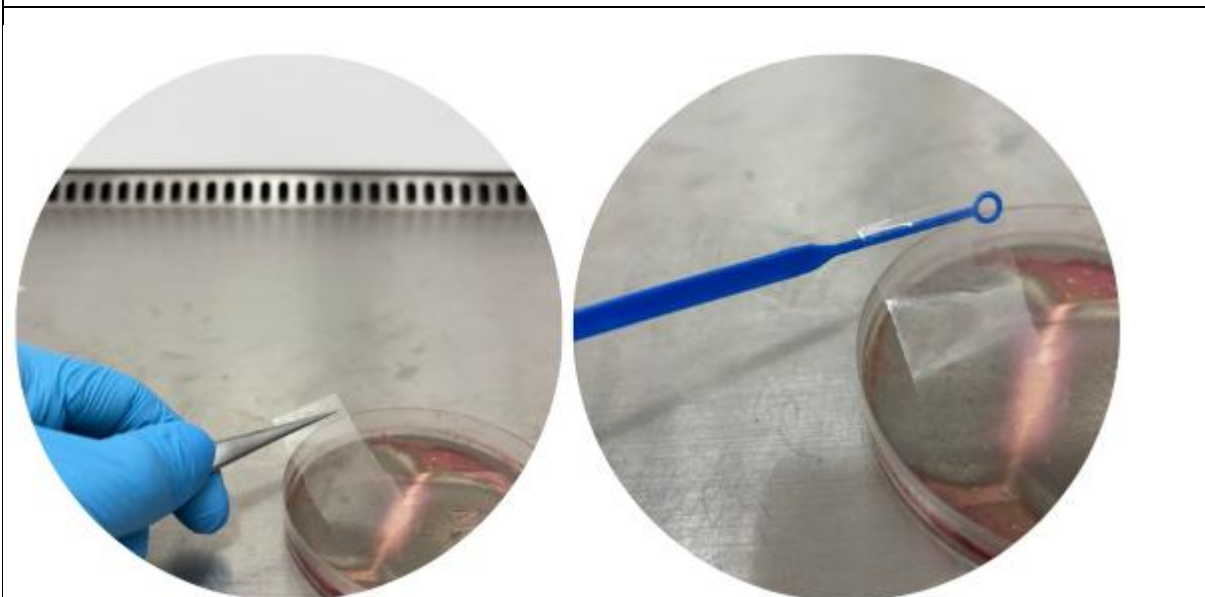
A classificação da seção precisa ser complementada pela análise das estruturas microscópicas, bem como a certificação de que se trata do gênero *Aspergillus*. Para tanto será utilizado o método rápido de fita adesiva (Figura 5).

O processo de identificação começa com a preparação da lâmina de microscopia, para visualização das estruturas características de cada seção. Utilize um pedaço de fita adesiva de aproximadamente 5 cm para capturar as estruturas fúngicas da colônia suspeita de *Aspergillus*. Para tanto, prenda um pedaço (+5 cm) de fita adesiva transparente à ponta de uma alça descartável, aplique a parte adesiva, suavemente, sobre a superfície da colônia para retirada de estruturas da parte pigmentada (Figura 5 parte B). Cole a fita adesiva, contendo as estruturas, em uma lâmina de microscopia previamente identificada.

**Limitações:** A aderência das estruturas fúngicas pode ser parcial, exigindo a repetição do procedimento. Além disso, a técnica da fita nem sempre consegue recuperar todas as estruturas características de cada seção.



A. Fita aderida à alça ou pinça, para captura de estruturas na colônia fúngica.

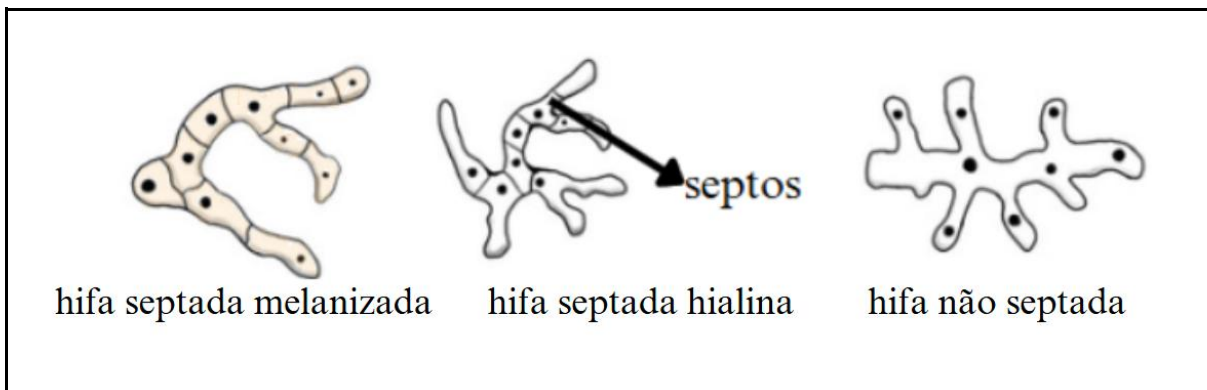


B. Fita recolhendo esporos/estruturas da colônia.



**Figura 5.** Preparo da lâmina para análise no microscópica da colônia pela técnica da fita adesiva. A. Fita aderida à alça ou pinça. B. Fita recolhendo esporos. C. Fita aderida a lâmina

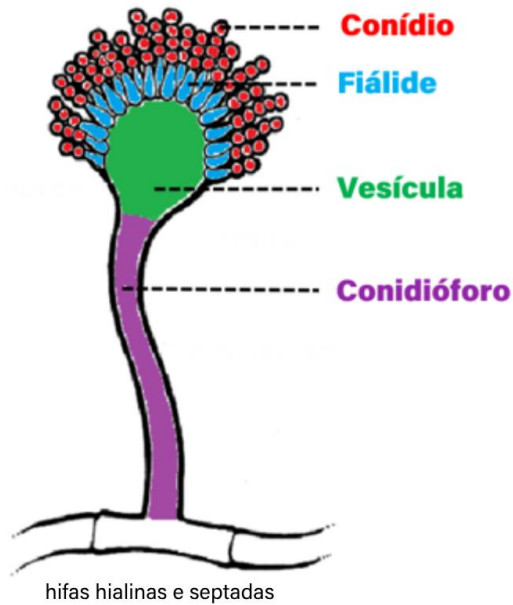
Foque o conteúdo da fita sob microscopia (100 x ou 200x). Passe para aumento de 400x para identificar as estruturas: vesículas e conídios. Confira as características das hifas de *Aspergillus*: hifas hialinas e septadas (Quadro 2).



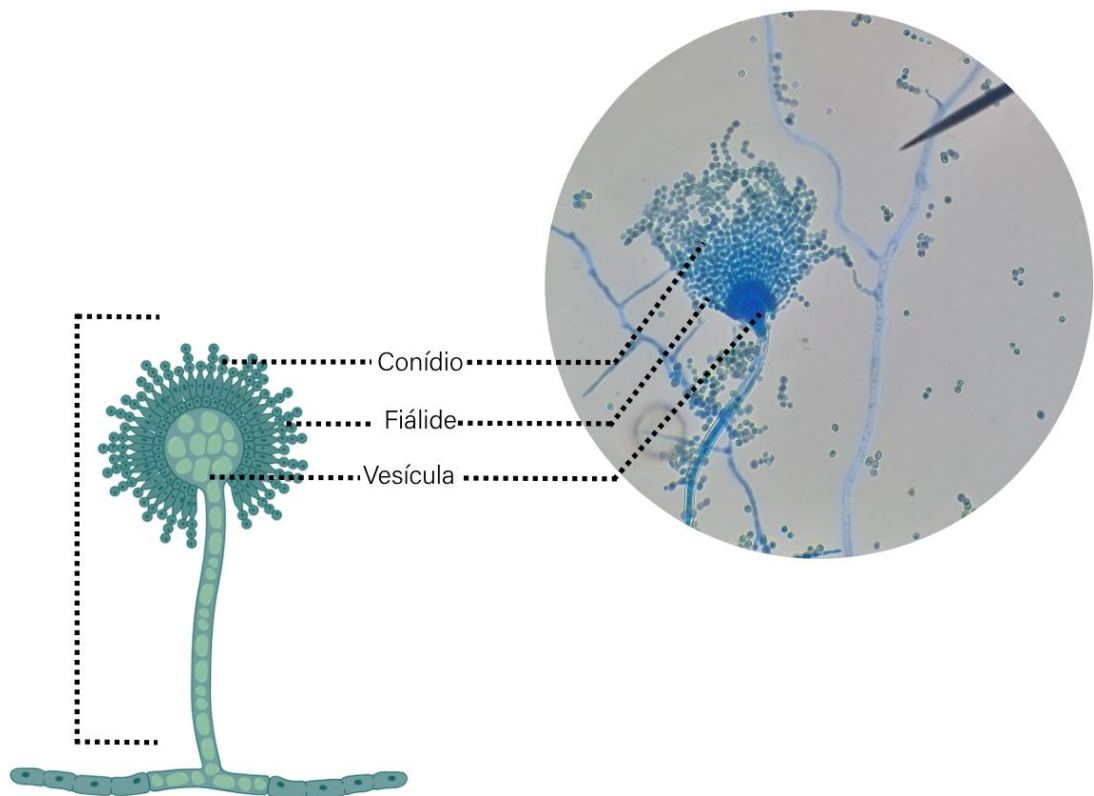
Observe as outras estruturas de *Aspergillus* spp. (Figuras 6, 7 e 8):

- **Conidióforo:** Dando origem a estruturas reprodutivas (Figura 6).
- **Vesícula:** extremidade dilatada (arredondada ou ovalada) do conidióforo (Figura 6).
- **Métula:** ramo sobre vesícula, dando origem a fiálides (Figura 6).
- **Fiálide:** projeção da vesícula, em forma de frasco, produz conídios, pode ser bisseriada ou unisseriada (Figura 7).
- **Unisseriada:** camada única de fiálides (Figura 7).
- **Bisseriada:** duas fiálides sobrepostas (Figura 7).

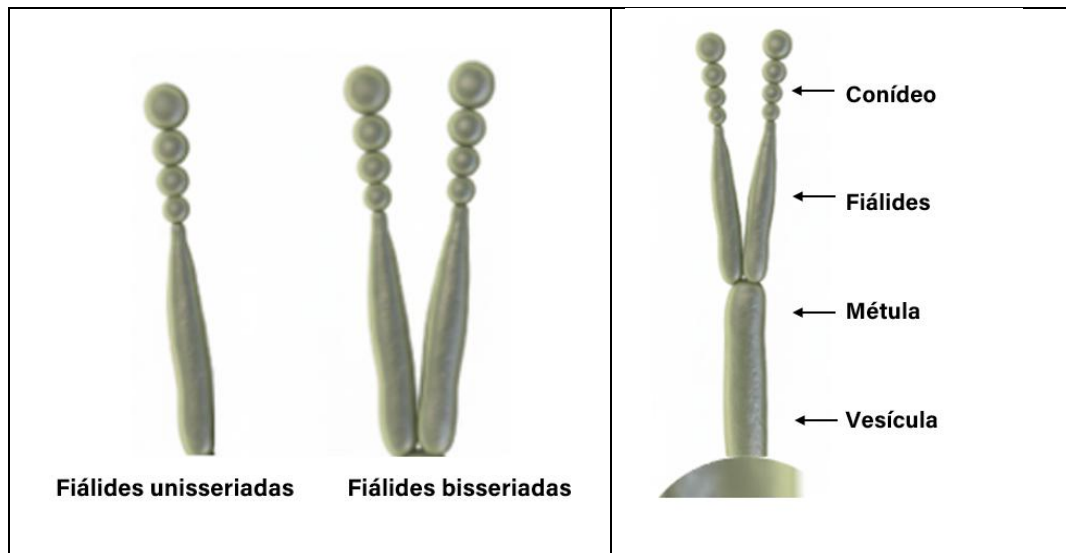
- **Colunar:** disposição de conídios em cadeias justapostas, semelhante a colunas (Figura 8).
- **Radiada:** disposição de conídios em forma de raios dispersos (Figura 8).



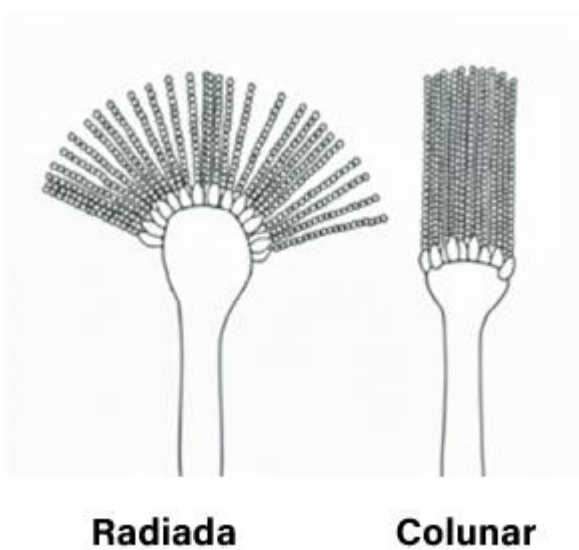
**Figura 6a.** Exemplo de estruturas encontradas em culturas de *Aspergillus* spp. (400x)



**Figura 6b.** Exemplo de estruturas encontradas em culturas de *Aspergillus* spp. (400x).

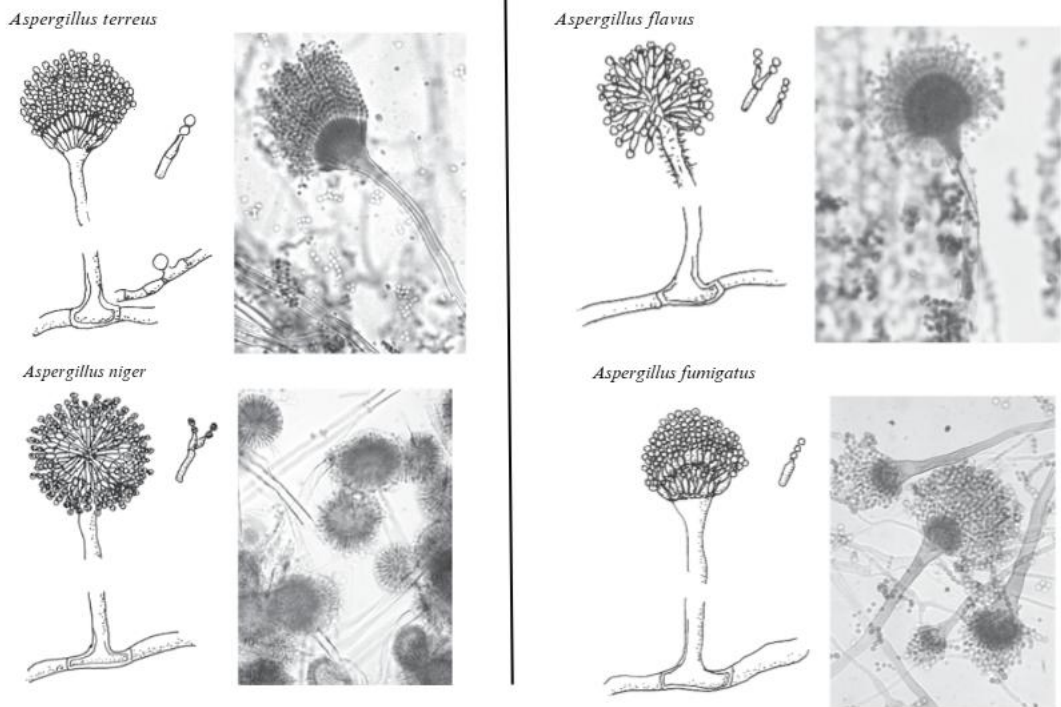


**Figura 7.** Esquema de Fiálides encontradas em culturas de *Aspergillus* spp.



**Figura 8.** Disposição de conídios em forma radial e colunar. (SOUZA et al., 2020).

Com base nas características microscópicas observadas, classifique presuntivamente a seção, conforme a Figura 9 e Quadro 03.

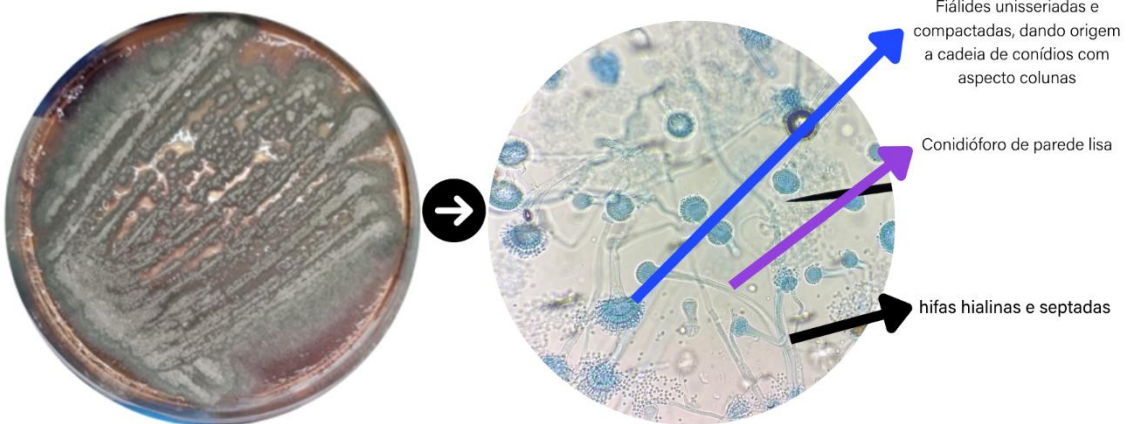


**Figura 9.** Estruturas micromorfológicas de espécies das quatro espécies representativas das principais seções de *Aspergillus* (Fonte: Westblade et al., 2023)

**Quadro 03. Classificação das seções de *Aspergillus* spp. segundo aspectos microscópicos**

**Seção Fumigati (*Aspergillus fumigatus* e outras espécies)**

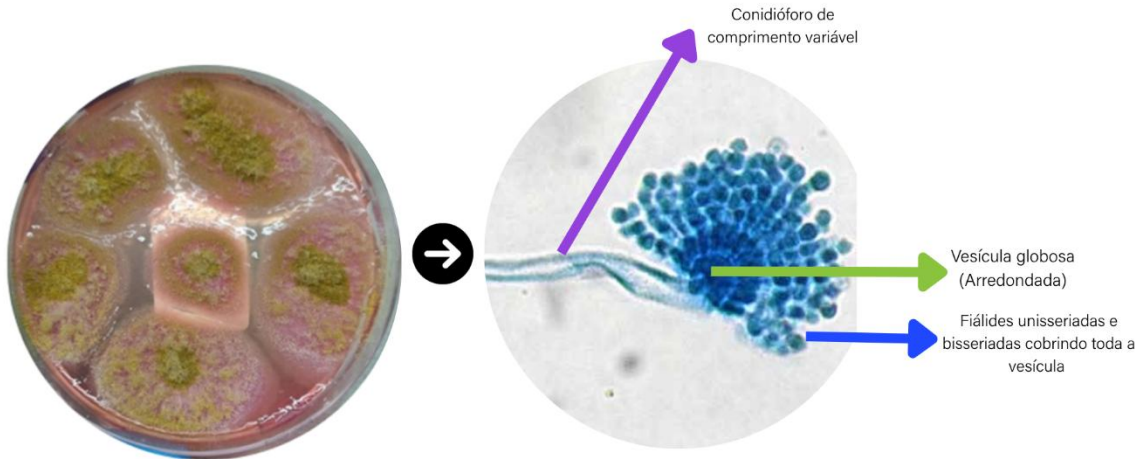
- Hifas hialinas e septadas.
- Conidióforos de paredes lisas e curtos.
- Fiáldes unisseriadas e compactadas, conferindo aparência colunar.



Estruturas características da seção Fumigati exemplificado por *Aspergillus fumigatus*.

**Seção Flavi (*Aspergillus flavus* e outras espécies)**

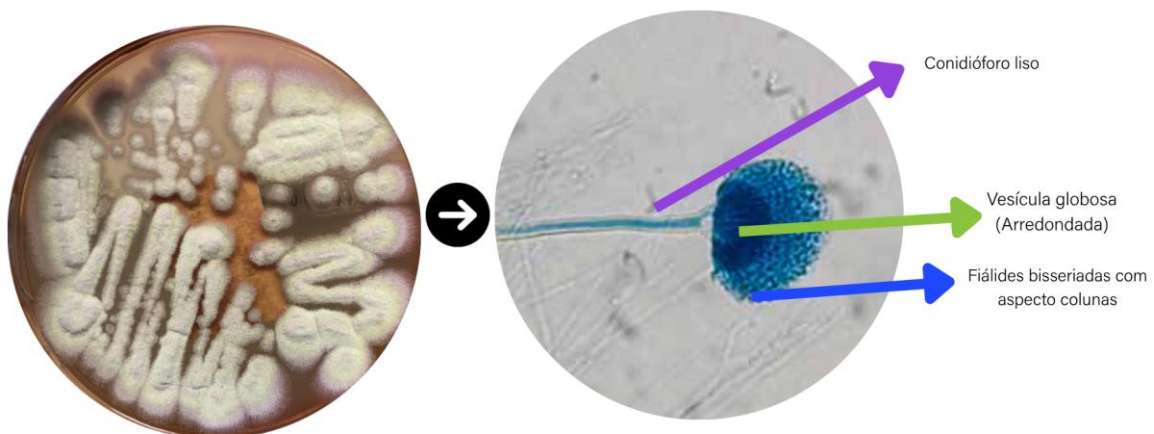
- Hifas hialinas e septadas.
- Conidióforos de comprimento variável.
- Fíalides podem ser unisseriadas ou bisseriadas.
- Métulas cobrem quase toda a vesícula em cepas bisseriadas.



Estruturas características da seção Flavi exemplificado por *Aspergillus flavus*.

**Seção Terrei (*Aspergillus terreus* e outras espécies)**

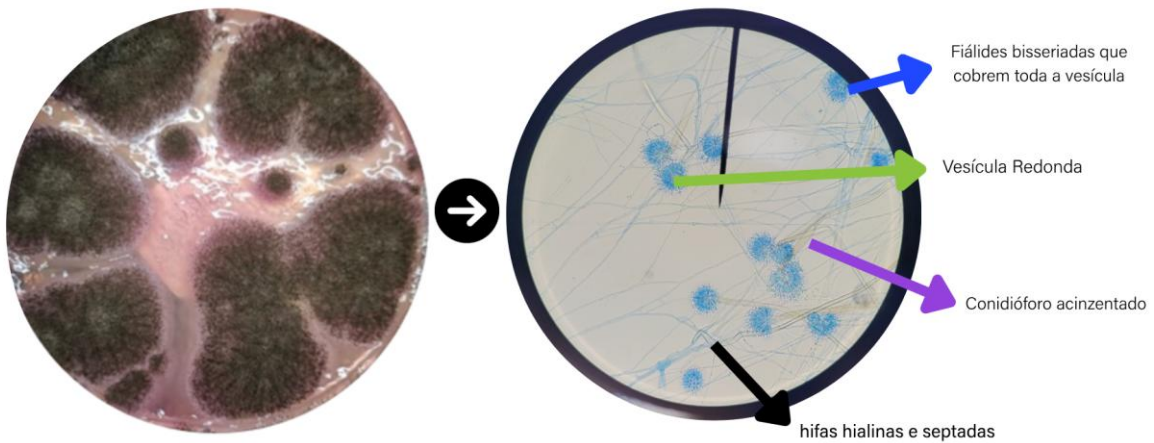
- Hifas hialinas e septadas.
- Fíalides apenas na metade superior da vesícula.
- Cabeças conidiais compactas, colunares e bisseriadas.
- Conidióforos hialinos e de parede lisa.



Estruturas características da seção Terrei exemplificado por *Aspergillus terreus*.

### Seção Nigri (*Aspergillus niger* e outras espécies)

- Hifas hialinas e septadas.
- Conidióforos longos e lisos.
- Fiáides bisseriadas ao redor de toda a vesícula, com conídios cobrindo a superfície.
- Conídios pretos ou acastanhados e globosos.
- Esporos acastanhados.



Estruturas características da seção Nigri exemplificado por *Aspergillus niger*.

(Zafar et al., 2017). Practical guide and atlas for the diagnosis of fungal infections.

### 3.3 Classificação da seção de *Aspergillus*

Com base na análise da morfologia da colônia e da análise microscópica, identifique de modo presuntivo a seção de *Aspergillus* e emita o laudo na ficha do isolado e REDCap.

## Módulo II: Teste de Triagem (Four-Well-Plate)

O Módulo II do manual detalha o procedimento de teste de triagem para avaliar a resistência antifúngica em isolados do gênero *Aspergillus*, na técnica denominada Four-well-plate. Este teste consiste na seleção de colônias pouco sensíveis a três antifúngicos triazólicos e a duas equinocandinas para contribuir no manejo das infecções fúngicas.

A crescente resistência aos antifúngicos em *Aspergillus fumigatus*, especialmente aos azóis, pode atingir até 30% dos pacientes hospitalizados. A resistência às equinocandinas foi descrita em 2008, mas sua detecção ainda enfrenta desafios técnicos e a ausência de pontos de corte clínicos estabelecidos (EUCAST, 2022).

O método padrão para determinação da resistência antifúngica, microdiluição em caldo preconizada tanto pelo comitê europeu EUCAST, quanto pelo instituto norte americano *clinical laboratory standards institute* (CLSI), exige treinamento especializado e podem falhar na detecção de colônias resistentes quando em mistura com sensíveis (EUCAST, 2022; CLSI M38).

A triagem rápida da resistência possibilita ajustes no tratamento antifúngico antes da obtenção de resultados de testes mais detalhados, melhorando o manejo de infecções. O documento (EUCAST Ed. 10.2) reforça a necessidade de controle de qualidade rigoroso, incluindo o uso de isolados de referência sensíveis e resistentes para garantir a confiabilidade dos resultados.

### 1 Procedimentos teste de triagem de resistência (POP 04)

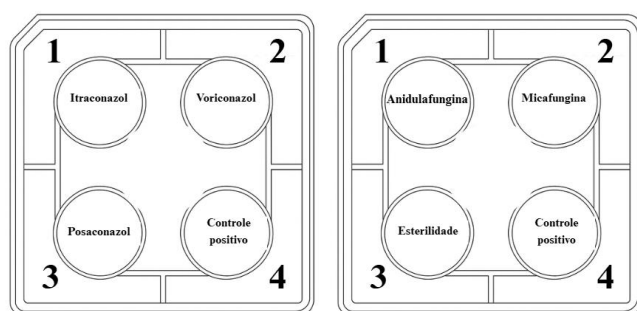
Comece a execução do teste com a preparação do ambiente em um laboratório de nível de segurança NB-2, com cabine de segurança biológica para garantir esterilidade do processo e segurança do laboratorista. Desinfete com álcool 70% todas superfícies de trabalho. Retire do refrigerador a escala de McFarland e as placas de 4 poços contendo ágar e antifúngicos. Deixe em temperatura ambiente por 30 minutos.

#### 1.1 Cultivo dos Fungos e Preparo do inóculo

Utilize placas de 4 poços contendo ágar bacteriológico com antifúngicos (itraconazol, voriconazol, posaconazol para azóis; anidulafungina e micafungina para equinocandinas). Prepare um poço sem antifúngico como controle de crescimento (Placa 1 azóis e placa 2 equinocandinas). O cultivo dos fungos ocorre em ágar batata, incubado a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48h ou até que a cultura apresente esporulação.

## 1.2 Inoculação da Placa

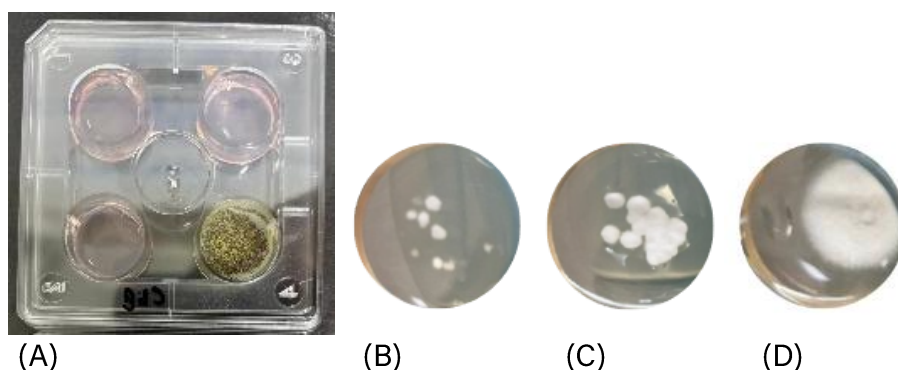
- Pipete 25 µL da suspensão fúngica, no centro de cada poço contendo ágar, conforme Figura 1.
- Pipete primeiro nos dois poços contendo ágar sem antifúngico destinados a controle positivo de crescimento e, em seguida, pipetar sobre cada ágar adicionado de um antifúngico
- Um poço não será adicionado de inóculo pois servirá como controle negativo de crescimento
- Aguarde até a absorção do inóculo no ágar
- Incube a placa assim inoculada em estufa bacteriológica 35 ± 2°C por 48 h para conferir aparecimento, ou não, de colônias presumivelmente resistentes



**Figura 1.** Esquema de placa para teste de triagem de resistência a antifúngicos azólicos e equinocandinas

## 2 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO

- Avalie o crescimento de colônias após 48 h.
- O poço de controle de crescimento deve produzir crescimento para validar os resultados. Exemplos de crescimento de colônias constam da Figura 2. Qualquer quantidade de colônias nos poços contendo antifúngicos conta como crescimento para os propósitos deste ensaio e devem ser interpretados como resistência.
- Marque o resultado para cada um dos 5 antifúngicos (Folha de Registro 1 POP 4)
- Marque o resultado para cada um dos 5 antifúngicos no arquivo REDCap.



**Figura 2.** Exemplos de crescimento de colônias no teste de triagem de resistência. A. Controle positivo com crescimento; B. Crescimento fraco sem esporulação; C. Crescimento moderado sem esporulação D. Crescimento abundante com início da esporulação.

### **3 ENVIO DOS ISOLADOS RESISTENTES NA TRIAGEM PARA LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA (POP 08)**

- Em caso de crescimento de colônias, presumivelmente resistentes (não sensíveis a azóis ou não selvagens a equinocandinas), estas devem ser enviadas ao laboratório de referência.
  - Retirar as colônias com swab e eluir na água contida no microtubo.
  - Identificar o microtubo com o número do isolado acrescido de uma das siglas:
    - RI (resistente a itraconazol),
    - RV (resistente a voriconazol),
    - RP (resistente a posaconazol),
    - RA (resistente a anidulafungina ou
    - RM (resistente a micafungina).
-

## **Módulo III: Teste de disco-difusão para detecção de resistência a antifúngicos em *Aspergillus* spp.**

O Módulo III fornece orientações detalhadas para a realização do teste de disco-difusão com antifúngicos, em isolados do gênero *Aspergillus*, segundo método de Kirby-Bauer em ágar Mueller-Hinton para avaliar a sensibilidade dos fungos.

O método de disco-difusão é tradicional e amplamente aplicado em laboratórios clínicos para avaliar a sensibilidade antimicrobiana, devido a sua praticidade e custo-benefício. Ele é apropriado para a maioria dos patógenos bacterianos, destacando-se pela sua flexibilidade em testar diversos agentes antimicrobianos e pela ausência de necessidade de equipamentos especializados.

Este método, padronizado para fungos pelo instituto norte americano CLSI, reflete o conhecimento acumulado por especialistas ao redor do mundo, assegurando resultados confiáveis e consistentes.

### **1 Procedimentos teste de disco-difusão (POP 05)**

A técnica deve ser realizada em um laboratório de segurança NB-2. A superfície de trabalho deve ser desinfetada com álcool 70% antes e depois de cada uso, sendo o álcool também utilizado para desinfetar a pinça que manuseia os discos de antifúngicos durante o procedimento.

A escala de McFarland, que será mantida na geladeira e protegida da luz, é fundamental para ajustar a turbidez do inóculo. Retire da geladeira os discos contendo antifúngicos (CECON) 30 minutos antes do uso, bem como as placas com ágar Mueller-Hinton.

#### **1.1 Cultivo de fungos**

Para cultivar os isolados, utilize placas contendo ágar batata e incube-os a  $35 \pm 2$  °C por 48h ou até que ocorra a esporulação. Esse cultivo pode ser estendido até 7 dias, dependendo da necessidade de esporulação.

#### **1.2 Preparo do Inóculo**

Umedeça um swab na solução salina com Tween 20® e passe suavemente em 5 pontos da superfície da cultura para coletar conídios. Tome cuidado para não retirar hifas. Mergulhe e esgote o swab em cerca de 5 ml de solução salina com Tween 20. Retire o

*swab* e deixe sedimentar por cerca de 5 minutos para que as possíveis hifas decantem. Transfira o sobrenadante deve ser transferido para um tubo de vidro estéril. Após isso, homogenize por inversão e ajuste a turbidez da suspensão de acordo com a escala de McFarland 0,5. Use o inóculo assim preparado em até 15 minutos ou se necessário armezene em geladeira por até 2h.

### 1.3 Inoculação das Placas contendo Mueller-Hinton

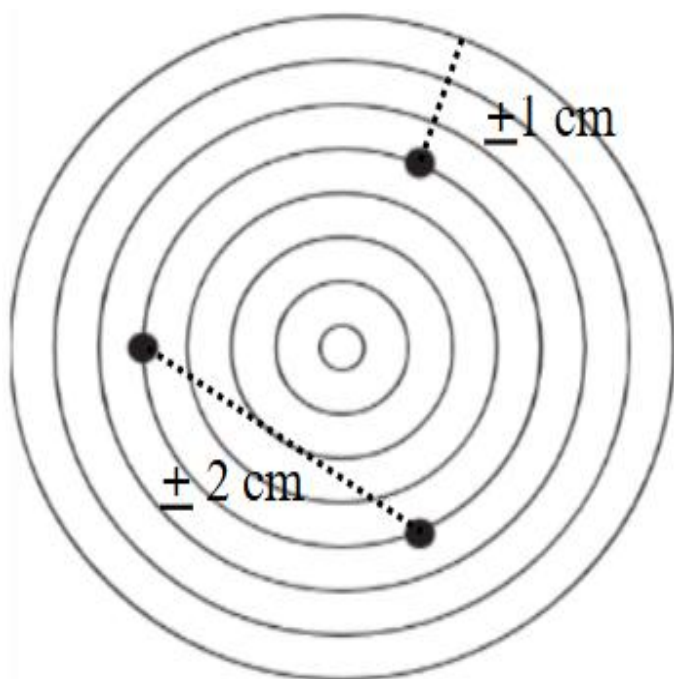
Aplique o inóculo fúngico na superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton. Para a inoculação, um *swab* estéril deve ser mergulhado na suspensão ajustada e o excesso de fluido removido. A superfície de ágar Mueller-Hinton deve ser inoculada uniformemente com o *swab*, repetindo o procedimento três vezes, girando a placa aproximadamente 60° a cada aplicação, com técnica de spread, como indicado na figura 01. Caso necessário, o *swab* pode ser reinserido na suspensão para completar a inoculação na superfície do meio, de modo a formar uma camada homogênea.



**Figura 01.** Esquema de semeadura por spread.

### 1.4 Adição dos Discos Contendo Antifúngicos

Após a inoculação, deve-se aguardar a absorção completa do inóculo no ágar antes de adicionar os discos de antifúngicos (CECON, BR). Para posicionar os discos corretamente utilize o esquema da Figura 02. Com uma pinça, previamente desinfetada com álcool 70%, retire um disco da embalagem e coloque em um dos lugares indicados no esquema. Pressione o disco levemente para garantir o contato total com o ágar. A distribuição dos discos deve ser equidistante, em distância mínima de 2 cm entre os centros dos discos e de 1 cm da borda da placa. Até três discos podem ser utilizados por placa de 90 x 150 mm.



**Figura 02.** Esquema de distribuição dos discos contendo antifúngicos.

### 1.5 Incubação das Placas de Mueller-Hinton

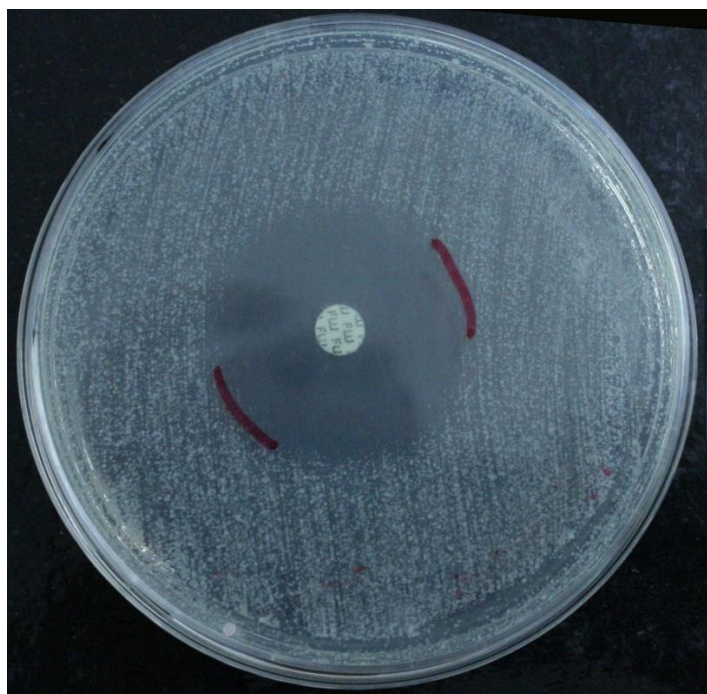
Inverter as placas e incubá-las a  $35 \pm 2$  °C por até 48h. Se não houver crescimento após esse período, manter as placas por mais 48h ou até o desenvolvimento de colônias.

### 1.6 Leitura e Interpretação dos Resultados

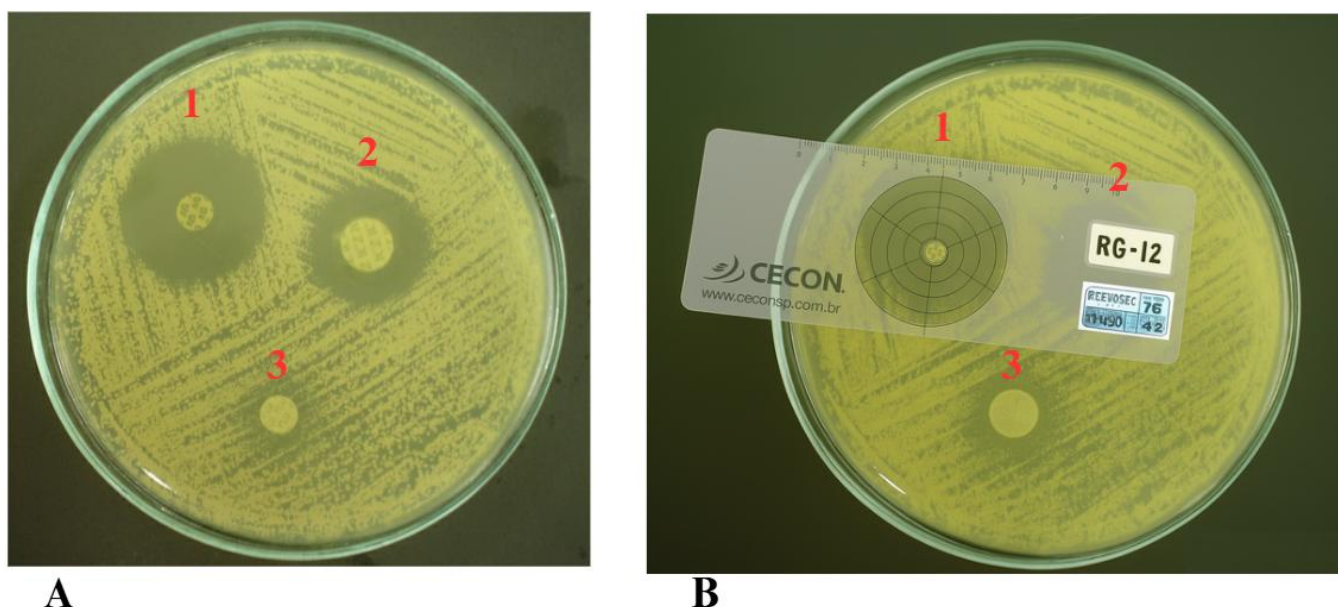
Examine cada placa medindo o halo de inibição ao redor de cada disco. Para tanto, utilize uma régua milimetrada ou halômetro, colocando-a no verso da placa sobre o centro de cada disco (Figura 04). O valor do halo é anotado em milímetros. Se não houver formação de halo, significa ausência de inibição. Para interpretar os resultados, consulte a bula do fabricante (CECON, BR), que contém os valores de halo de inibição para classificar o isolado como "sensível", "intermediário" ou "resistente" Quadro 01.

Antifúngico Sigla	Concentração no Disco	Zona de Inibição (mm)	Interpretação
Anfotericina B AB	100 mcg	$\geq 16$ -- < 16	Sensível -- Resistente
Voriconazol VRC	1 mcg	$\geq 13$ -- 13 >	Sensível -- Resistente
Itraconazol ICZ	10 mcg	$\geq 13$ -- 13 >	Sensível -- Resistente

**Quadro 01.** Interpretação de resultados. (Cecon LTDA).



**Figura 3.** Exemplo de placa com discos e limite do halo de inibição.



**Figura 4.** Teste de disco-difusão com *Aspergillus fumigatus*. Com 2 discos apresentando halo de inibição/resistência (Disco 1 e 2) e o ultimo apresentando ser sensível (Disco 3). A figura B mostra como interpretar um halo de inibição no verso da placa.

## 2 Controle de qualidade

A Cecon LTDA, garante a esterilidade do Ágar Mueller Hinton e a eficácia do disco, até o envio para o laboratório. Confira a esterilidade da solução salina semeando 1 mL em ágar batata. Certifique a espessura do ágar (4mm) antes do uso. Verifique a eficácia do disco realizando um teste com cepa padrão, a cada lote. Durante o teste, garantir a estabilidade da temperatura da estufa, dentro da margem indicada ( $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## **Módulo VI: *Aspergillus* Immune Chromatography Technology -ICT (LDBIO) IgG-IgM**

### **1 Princípio do teste (POP 10)**

O teste rápido *Aspergillus* ICT IgM-IgG é um método imunocromatográfico utilizado para detectar anticorpos IgG e/ou IgM contra *Aspergillus fumigatus* em amostras de soro ou plasma. O ensaio é realizado em um cassete contendo uma tira de nitrocelulose com duas bandas reativas: a banda de teste (T), recoberta com antígenos de *A. fumigatus*, e a banda de controle (C), composta por gamaglobulinas de coelho. Quando anticorpos específicos estão presentes, ocorre a formação de um complexo que resulta no aparecimento de uma linha preta na posição T, enquanto a linha azul na posição C confirma a validade da corrida.

### **2. Procedimento**

Para a execução do exame, deve-se coletar a amostra de soro ou plasma em tubo seco ou contendo anticoagulante (heparina, citrato ou EDTA). As amostras devem ser processadas até 48 horas quando mantidas entre 2 e 8 °C, podendo ser congeladas abaixo de -15 °C para armazenamento mais longo. Após a identificação dos cassetes, pipeta-se 15 µL de amostra no poço indicado, seguido da adição de quatro gotas do eluente fornecido pelo kit. O cronômetro deve ser acionado imediatamente após a dispensação do eluente, e a leitura do teste deve ser feita entre 20 e 30 minutos, sob luz branca direta e sem sombras.

### **3. Interpretação**

O resultado será considerado positivo quando houver duas linhas visíveis, uma azul na posição C e uma preta na posição T, mesmo que a banda de teste apareça muito tênue (Figura 1). A ausência da linha T caracteriza um resultado negativo, enquanto a ausência da linha C invalida o teste, sendo necessário repeti-lo.

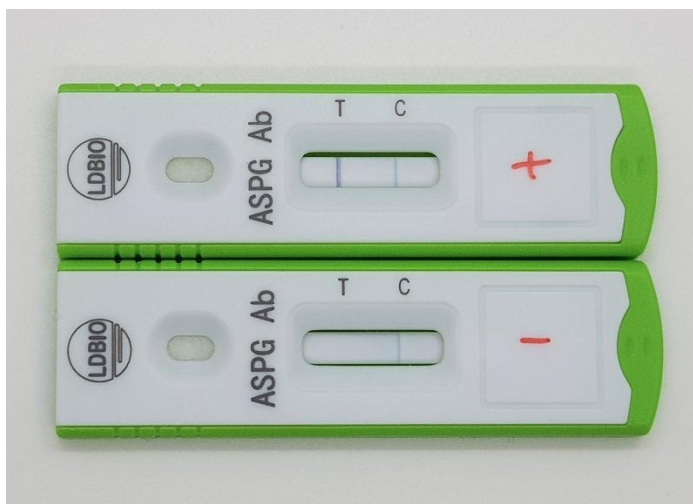


Figura 1. Linhas visíveis em teste positivo e negativo.

Em casos raros, pode surgir uma linha difusa e acinzentada na posição T, que deve ser interpretada como negativa, recomendando-se a repetição do exame. Ressalta-se que este é um teste qualitativo: a intensidade da linha não reflete a quantidade de anticorpos e os resultados devem sempre ser interpretados em conjunto com os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais do paciente.

---

## **Módulo V: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay -LFA (IMMY)**

### **1. Princípio do teste (POP 11)**

O teste *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay (AGM LFA) é um ensaio imunocromatográfico utilizado para a detecção qualitativa do antígeno galactomanana em amostras de soro e lavado broncoalveolar (LBA). Esse exame deve ser obrigatoriamente lido com o equipamento sôna LFA Cube Reader (IMMY) e tem aplicação complementar a outros métodos diagnósticos, como cultura microbiológica, exame histológico e imagem radiográfica.

### **2. Procedimento**

Para o preparo da amostra, adiciona-se 300 µL de soro ou LBA em um tubo resistente ao calor (Tubo A), junto com 100 µL do tampão de tratamento prévio. Após homogeneização em vórtex por 30 segundos, o tubo deve ser aquecido a 100 °C em banho maria por 6 a 8 minutos e centrifugado por 5 minutos a 10.000–14.000 g. O sobrenadante resultante pode ser utilizado imediatamente ou armazenado entre 2 e 8 °C por até 7 horas.

O procedimento do teste consiste em pipetar 40 µL do tampão de execução em um tubo limpo, seguido da adição de 80 µL do sobrenadante tratado. Em seguida, insere-se a tira AGM LFA no tubo, que deve permanecer em temperatura ambiente por 30 minutos. Ao término da incubação, a leitura deve ser realizada em até 10 minutos utilizando o Cube Reader. O equipamento exibirá os resultados em formato numérico e categórico: valores iguais ou superiores a 0,50 são considerados positivos (POS), enquanto valores inferiores a 0,50 são negativos (NEG), Figura 1. Caso a linha de controle esteja ausente ou fraca, o leitor emitirá a indicação INV, caracterizando um teste inválido.

1. Leia até **10 min** após incubação.
2. Valores:
  - **POS (positivo):** índice  $\geq 0,50$ .
  - **NEG (negativo):** índice  $< 0,50$ .
  - **INV (inválido):** falha na linha de controle.

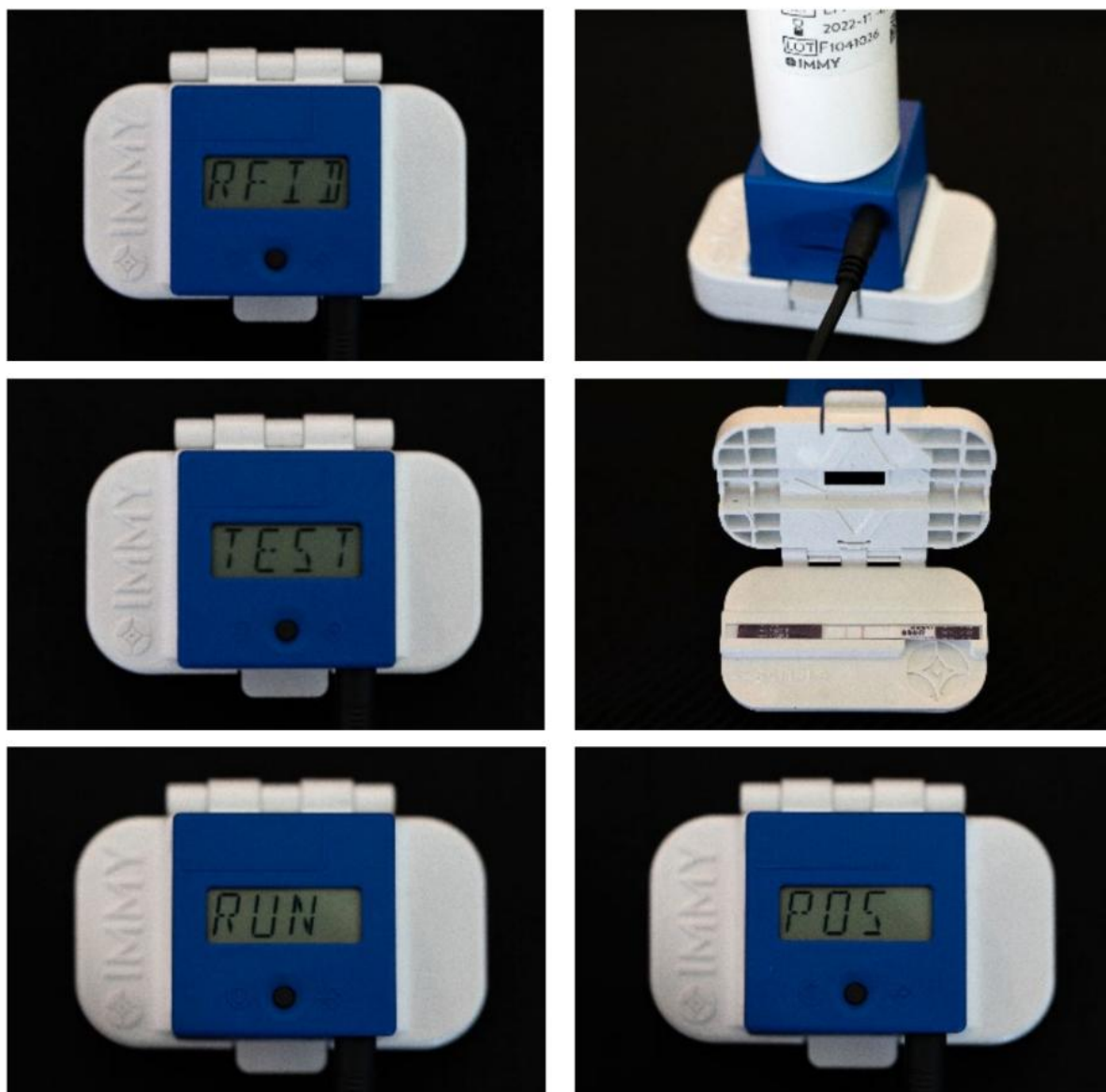


Figura 1. Leitor sãna LFA Cube Reader.

### 3. Leitura (Cube Reader)

É obrigatório realizar os controles positivos e negativos a cada novo lote do kit. O controle positivo deve apresentar valor  $\geq 0,50$  e o controle negativo  $< 0,50$ . O armazenamento do kit deve ser feito entre 2 e 30 °C, com as tiras mantidas em recipiente bem fechado para evitar degradação.

O AGM LFA possui algumas limitações: seu uso é restrito a amostras de soro e LBA, podendo ocorrer reações cruzadas com casos de histoplasmose, candidíase ou coccidioidomicose. Amostras hemolisadas podem comprometer o resultado, e pacientes em uso de antifúngicos podem apresentar menor sensibilidade do teste. Ressalta-se que resultados negativos não excluem aspergilose, especialmente em

casos de coleta precoce, e que o exame não deve ser utilizado como teste de triagem populacional. Assim, a interpretação final deve sempre considerar o contexto clínico e epidemiológico do paciente.

## Referências

CLSI. (2010). **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline**. CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - M38** Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2016). **M44: Methods for Determining the Susceptibility of Anaerobic Bacteria to Antimicrobial Agents; Approved Standard—Third Edition**. CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). **M27: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Fourth Edition**. CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2021). **M51S: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition**. CLSI.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **EUCAST agar screening for resistance in Aspergillus spp. EUCAST Definitive Document E.Def 10.2**. Växjö, Suécia: EUCAST, 2022.

Fundação Oswaldo Cruz. (2022). **Manual de Biossegurança da Fiocruz**. Rio de Janeiro: Fiocruz. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/documento/manual-de-biosseguranca-da-fiocruz>.

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

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, mar. 2016.

NCCLS. (2002). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada**. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. Wayne, Pennsylvania, EUA.

Westblade, L. F., Burd, E. M., Lockhart, S. R., & Procop, G. W. (2023). **Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification (7ª ed.)**. New York: Weill Cornell Medicine.

