

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**“INFECÇÃO FÚNGICA DA CÓRNEA E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES
ETIOLÓGICOS QUANTO A CAPACIDADE DE ADERÊNCIA”**

RECIFE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**“INFECÇÃO FÚNGICA DA CÓRNEA E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES
ETIOLÓGICOS QUANTO A CAPACIDADE DE ADERÊNCIA”**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientanda: Elvislene Camelo Soares Leite

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves

RECIFE

2008

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leite, Elvislene Camelo Soares

Infecção fúngica da córnea e caracterização dos agentes etiológicos quanto a capacidade de aderência. / Recife: O Autor, 2008.

71 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, Recife, 2008.

Inclui referências e apêndices

- 1. Micose 2. Córnea- doenças 3. Ceratite I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Título**

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 648

ELVISLENE CAMELO SOARES LEITE

**INFECÇÃO FÚNGICA DA CÓRNEA E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES
ETIOLÓGICOS QUANTO A CAPACIDADE DE ADERÊNCIA”**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação
em Biologia de Fungos da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre.

Orientanda: Elvislene Camelo Soares Leite

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves

Aprovada em: 29/02/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Rejane Pereira Neves

Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza-Motta

Prof^o Dr^o Carlos Teixeira Brandt

Prof^a Dr^a Oliane Maria Correia Magalhães

Prof^o Armando Marsden Lacerda Filho-PhD

RECIFE

2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu grande mestre e senhor por ter me concedido a oportunidade de poder fazer esse curso.

A meus pais Almira Alice e Jose Ribamar e meus irmãos Elvisleide, Elzilene Eleni, Elda, Eliel (*in memorian*) e Elnatan pelo incentivo e apoio.

À meu querido e Amado Esposo Nalber Leite pela compreensão incentivo em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial à professora Rejane Pereira Neves que tanto contribuiu para meu crescimento pessoal, profissional e pela dedicação, orientação e amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À equipe de professores da PPGBF pela valiosa aprendizagem, ampliação e aprimoramento de meus conhecimentos.

Ao Drº Carlos Texeira Brandt pela confiança e incentivo no desenvolvimento dessa pesquisa

A todos os médicos residentes da Fundação Altino Ventura em especial à Graziela Luna pela dedicação e companheirismo no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro de fundamental importância para realização deste trabalho.

Ao Prof. Armando Masrden por ter sido essencial no desenvolvimento dessa pesquisa, pela contribuição, disponibilidade e empenho.

À Prof.^a Oliane Maria Correia Magalhães pelo ajuda constante, carinho e amizade.

As Prof.^{as} Débora Maria Massa Lima e Maria José pela cooperação no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do curso de mestrado pelos momentos de aprendizagem, descontração e amizade.

Aos amigos do laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, pelo carinho, amizade e apoio.

Aos professores do Departamento de Micologia, em especial a Prof.^a Cristina.

Às minhas grandes amigas Fabíola Marques e Danielle Patrícia e Gilmara Ferreira pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À Reginaldo Gonçalves pela ajuda indispensável no desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

“INFECÇÃO FÚNGICA DA CÓRNEA E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO A CAPACIDADE DE ADERÊNCIA”

RESUMO

Os fungos são microorganismos que podem provocar diversas doenças no organismo humano. A gravidade da infecção fúngica pode variar desde as formas cutâneas leves até quadros fatais que levam a septicemia. O termo ceratite micótica ou ceratomicose refere-se a uma infecção corneana de aspecto supurativo, normalmente ulcerativo, de etiologia fúngica. Diferentemente de outras micoses, não é uma patologia de risco de vida, porém certamente é de extremo comprometimento visual e dificuldade terapêutica. Se inadequadamente tratada, pode levar à marcada diminuição visual e, em casos severos, à cegueira total ou mesmo à perda do globo ocular. Levantamentos recentes mostram um aumento significativo dos casos de ceratomicose nas últimas quatro décadas. Este fato pode ser atribuído ao desenvolvimento e ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro e de corticóides, uso de lentes de contato, aumento do número de cirurgias de córneas e aos avanços nas técnicas de diagnóstico. O exame clínico é insuficiente para o estabelecimento do diagnóstico, pois bactéria, vírus e parasitas podem determinar quadros clinicamente semelhantes. Neste contexto, os exames laboratoriais constituem em recursos imprescindíveis no diagnóstico das úlceras de córnea.

Palavras-chave: Ceratite micótica. Infecção de olho. Úlceras de córnea.

“INFECÇÃO FÚNGICA DA CÓRNEA E CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO A CAPACIDADE DE ADERÊNCIA”

ABSTRACT

Fungi are microorganisms that may cause many diseases on human organism. The severity of infections may vary from the light cutaneous form to lethal stages that leads to septicemia. The term fungal keratitis or keratomycosis refers to a suppurative corneal infection, usually ulcerative, of fungal etiology. Different from other mycosis, it is not a pathology of death risk, but it is surely of extreme visual commitment and therapeutic difficulty. If wrongly treated, it may lead to visual loss and, in severe cases to total blinding or even loss of the ocular globe. Recent researches show a significative increase of keratomycosis in the four last decades. This fact may be due to the development and the indiscriminate use of wide spectrum antibiotics and corticoids, use of contact lenses, increase of corneal surgeries and the advance on diagnostic techniques. Clinical examination is not enough for establishing the diagnostic, for bacteria, virus and parasites may cause similar symptoms. In this context, laboratory examinations constitute essential resources for the diagnostic of corneal ulcers.

Key words: Mycotic keratitis. Eye infection. Corneal ulcer.

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 OBJETIVO GERAL	11
1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	12
2.1 CERATITE FÚNGICA	12
2.2 ADERÊNCIA DOS FUNGOS AS CELULAS EPITELIAIS	16
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	19
3.1 OBTEÇÃO DAS AMOSTRAS CLINICAS	19
3.2 ADERÊNCIA IN VITRO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS	20
4 RESULTADOS E DISCURSÃO	21
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERENCIAS	29
APÊNDICE A - EVISCERAÇÃO DE OLHO POR <i>FUSARIUM SOLANI</i> EM PACIENTE DIABÉTICO	34
APÊNDICE B - CORNEAL TRANSPLANTATION IN A CHILD WITH ACUTE FUNGAL KERATITIS	41
APÊNDIC C - CERATITE FÚNGICA E FATORES DE RISCO EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES	49
APÊNDICE D - ADERÊNCIA <i>IN VITRO</i> DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS EM INFECCÕES DE CÓRNEA	60

1 INTRODUÇÃO

As infecções oculares por fungos, também chamadas oculomicoses, ocorrem em situações de caráter oportunista e multifatorial (Wong et al.1997; Kurokawa et al. 1998; Hamdam et al. 2000).

Em 1854 Grafe realiza a primeira publicação sobre infecção fúngica com relato de lesão do canal lacrimal. Contudo, no Brasil o primeiro caso de micose ocular foi descrito em 1921 por Silvia (Höfling-Lima et al.2005a).

Alguns fatores propiciam a modificação da microbiota conjuntival como medicações tópicas ou condição climática favorável, destruição das defesas locais após trauma, cirurgias ou doenças oculares prévias, diminuição da resistência do hospedeiro mediante doenças sistêmicas ou drogas imunossupressoras (Höfling-Lima et al., 2005a).

Os fungos são microrganismos que podem provocar diversos quadros clínicos no homem e a gravidade da infecção varia desde as formas leves até quadros graves. Aproximadamente 100 mil espécies de fungos são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em seres humanos (Mendes-Giannini et al. 1997; Kurokawa et al. 1998; Höfling-Lima et al. 2005a). Entretanto, os agentes etiológicos de oculomicoses mais comumente registrados na prática médica são *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Acremonium* spp. *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii*, *Rhinosporidium seeberi*, *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos dimórficos (Klotz et al 2000).

Alterações orgânicas gerais e locais, traumatismos, processos alérgicos oculares e outros fatores facilitam a adaptação dos fungos à vida parasitaria, aumentando o poder patogênico (Godoy et al. 2004).

De acordo com Lacaz et al. (2002), ceratite, úlcera de córnea, hipópio, uveíte, endofítalmite e cório-renite constituem manifestações freqüentes no decurso das micoses oculares.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Diagnosticar micoses oculares em pacientes atendidos em emergências oftalmológicas públicas de referências em Recife - PE e analisar a virulência dos agentes etiológicos.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar estruturas fúngicas em amostras clínicas obtidas do globo ocular de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas e da Fundação Altino Ventura;
- Isolar os agentes etiológicos das micoses oculares;
- Identificar os fungos isolados das amostras clínicas;
- Determinar a capacidade de aderência dos isolados;

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CERATITE FÚNGICA

O termo ceratite fúngica ou ceratomicose refere-se a uma infecção da córnea de aspecto supurativo, normalmente ulcerativo. Diferentemente de outras micoses, não é uma patologia fatal, porém é de extremo comprometimento visual e dificuldade terapêutica (Gomes; Alves, 2003).

As ceratites infecciosas e dentre essas, em especial as ceratites fúngicas têm assumido papel importante na oftalmologia pela crescente incidência (Carvalho et al. 2001). Atualmente, cerca de 30.000 novos casos por ano são reportados nos Estados Unidos da América (McLeod et al. 1992; Carvalho et al. 2001). Este fato pode ser atribuído ao desenvolvimento e ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro e de corticóides, uso de lentes de contato e aumento do número de cirurgias corneanas (Foster et al 1992; Vieira et al. 1997; Salera et al. 2002).

De Oliveira et al. (2001) afirmam que ceratite fúngica é encontrada principalmente na população rural, onde os trabalhadores estão expostos a traumatismo da córnea com matéria orgânica, pode apresentar-se com sintomas e sinais que não permitem distingui-la de uma ceratite bacteriana, parasitária ou viral sendo necessário a realização de citologia e cultura para afastar ou confirmar a presença de fungo. O curso da ceratite fúngica é crônico, requerendo semanas ou meses de tratamento.

Cavara (1928); Blanco e Re (1943); François (1968) e Brunzini e Zapater (1985) estudaram as oculomicoses sob o ponto de vista etiológico, clínico e experimental. Segundo esses autores diversas membranas e meios oculares apresentam condições favoráveis para o desenvolvimento e a proliferação de fungos, podendo tais microrganismos determinar lesões primitivas ou então agravar processos preexistentes (Lacaz et al.2002).

Em 1973, Miranda Cueto realiza no Peru um estudo sobre micoses oculares e salienta que a maioria dos pacientes era agricultores, especialmente plantadores de cana-de-açúcar. Da plantação foram retiradas 100 amostras de talos de cana-de-açúcar e em 59 foi isolado *F. moniliforme* (Lacaz et al. 2002).

Panda et al. (1997), analisando 211 casos de ceratite fúngica em crianças com menos de 16 anos na Índia, no período de cinco anos, demonstraram que trauma constituiu o fator predisponente mais comum (55,3%), seguido por doença sistêmica (11,2%) e cirurgia ocular

prévia (9,8%). Injúria da córnea por material vegetal foi responsável por 60,5% dos casos de trauma. Os fungos mais frequentemente isolados foram *Aspergillus* (39,5%), *Fusarium* (10,7%), *Alternaria* (10,2%), *Curvularia* (7,4%) e *Penicillium* (7%). Este estudo destaca a importância dos fatores de riscos e o organismo responsável pela ceratite em crianças.

Wong et al. (1997) estudaram os aspectos clínicos e microbiológicos das ceratites fúngicas em Cingapura, no período de 1991 a 1995, sendo analisados 29 casos. A média de idade dos pacientes foi de 41 anos e 23 eram do sexo masculino; dentre as várias ocupações, nove eram pedreiros ocorrendo trauma ocular em mais da metade dos pacientes, sete foram submetidos à terapia com corticóides e dois usavam lentes de contato. Os fungos mais isolados foram *Fusarium* sp. seguido por *A. flavus*.

Sridhar et al. (2000) relataram um caso de ceratite por *A. flavus* em uma jovem de 24 anos, três dias após ter sido submetida a uma cirurgia a *Laser In Situ Keratomileusis* (LASIK).

Carvalho et al. (2001) estudando a ceratite fúngica no estado do Paraná (Brasil), analisaram 49 pacientes observados de 1983 a 1997 e verificaram que os agentes mais incidentes foram espécies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Candida* e outros fungos não identificados. Os autores concluíram que os principais fatores epidemiológicos que podem ter contribuído para a incidência das infecções fúngicas oculares nos 49 pacientes estudados foram sexo masculino (84%), procedência de zona rural (71,4%), trauma ocular prévio (57%), desempenho de trabalho na lavoura (46%) e história de imunossupressão (18,37%).

Choi et al. (2001) relataram um caso de ceratite por *Fusarium* sp. em uma paciente de 20 anos, sem doenças prévias e sem história de trauma, desenvolvendo úlcera de córnea no olho esquerdo associado ao uso diário de lentes de contato.

Salera et al. (2001) entre 1994 e 1999 estudaram 20 casos de ceratite fúngica no Hospital São Geraldo, Belo Horizonte - MG, constatando 15 pacientes do sexo masculino. Um dos fatores associados foi trauma ocular (60%), *Fusarium* sp (60%) foi mais freqüente seguido por *Aspergillus* sp (30%).

Guarro et al. (2002) relataram um caso de ceratite por *Sacopodium oculorum* em um garoto de 12 anos, após cinco meses de tratamento com corticóides.

Shin et al. (2002), na Coréia relataram um caso de ceratite fúngica por uma espécie de *Verticillium* em um homem de 50 anos que não apresentava história de trauma.

No Centro Hospitalar Nacional de Oftalmologista (Paris), entre os anos de 1993 a 2001, foram relatados 19 casos de ceratite fúngica, dos quais 12 eram pacientes do sexo masculino, a média de idade foi de 56,2 anos. O fator de risco mais comum foi o uso de

esteróide (42,1%), transplante de córnea (31,6%), trauma (31,6%). *C. parapsilosis* e *C. albicans* foram os fungos mais isolados (58%) seguidos por *Aspergillus* sp. (21%) e *Fusarium* sp. (21%) (RONDEAL et al. 2002).

Verma e Tuft (2002) relataram um caso de ceratite por *F. solani* em uma paciente de 45 anos três dias após ter realizado uma cirurgia de *Laser In Situ Keratomileusis* (LASIK) para correção de miopia.

Bharathi et al. (2003), entre 1999 e 2002, estudaram no sul da Índia, 3.183 úlceras de córnea das quais 1.095 (34,4%) foram de etiologia fúngica. Das espécies isoladas, 471 (42,82%) foram de *Fusarium*, seguido por 286 (26%) de *Aspergillus*. Os homens foram os mais afetados e a maioria dos pacientes eram jovens entre 21 a 50 anos. A maioria, 879 (80,27%) dos pacientes, procedera da zona rural e 709 (64,75%) eram agricultores; trauma ocular foi o fator predisponente mais significativa com 1009 (92,15% casos) sendo 671 (61,28%) injúria por material vegetal e 172 (15,71%) pacientes eram portadores de “diabetes mellitus”. Os autores concluíram que traumas oculares relacionados as atividades agrícolas foram as principais causas de ceratite micótica.

Bourcier et al. (2003) apresentam a evolução clínica e microbiológica de quatro pacientes com ceratite causada por *C. parapsilosis*. Três casos foram observados após queratoplastia penetrante e um após terapia por corticóides. Os autores concluíram que uso de corticóides e transplante de córnea constituem fatores de risco para ceratite causada por *C. parapsilosis*.

Thomas (2003), descreveram os aspectos mais importantes das infecções de córnea por fungos as quais constituem um problema de visão em trabalhadores de áreas livres de regiões tropical e subtropical. Os autores observaram que infecções fúngicas da córnea são freqüentemente causadas por espécies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Curvularia* e *Candida*. Trauma foi o fator predisponente mais importante, contudo doenças sistêmicas e uso de corticosteróides também foram fatores de risco. Os autores concluíram também que infecção fúngica da córnea continua sendo uma importante causa de morbidade ocular, particularmente em comunidades agrícolas de países em desenvolvimento.

O acometimento intra-ocular por *C. albicans* pode ocorrer através de disseminação hematogênica do agente ou por inoculação direta do fungo; (Godoy et al. 2004) relatam um caso de uma paciente submetida a transplante de córnea que evoluiu com resposta inflamatória exacerbada durante o período pós-operatório; foi iniciada terapia imunossupressora com ciclosporina e alta dose de corticóide tópico, porém a paciente desenvolveu endoftalmite por *C. albicans*. Os autores concluem que casos como este deve

servir de alerta aos oftalmologistas quanto à possibilidade de infecção fúngica nos pacientes submetidos a transplantes penetrantes de córnea e que apresentam inflamação atípica de difícil controle.

Chowdhary e Singh (2005) analisaram os prontuários de 485 pacientes atendidos no Hospital-Base no norte da Índia no período de janeiro de 1999 a junho de 2001. Dados sócio-demográficos, fatores de riscos, tratamento prévio, resultados laboratoriais e acuidade visual foram analisados. Foram diagnosticados 191 (39%) casos de ceratite fúngica 119 (62.3%) através do exame direto e 114 (60%) de culturas. O sexo masculino foi o mais acometido com (68%). Os fatores de riscos mais notados foram trauma de córnea com 42%, uso de lentes de contato 25% e esteróide tópico em 21% dos pacientes. As espécies fúngicas mais isolados foram de *Aspergillus* com 78 (41%) casos seguido de *Curvularia* com 55 (29%). Os autores ressaltam a importância do exame direto e cultura no diagnóstico como fundamental para a instituição do tratamento adequado e bom prognóstico do quadro clínico.

Ferrer et al. (2005) relatam um caso de endoftalmite por *Fusarium proliferatum* em um paciente de 66 anos submetido a uma cirurgia de catarata e implantação de lentes intra-ocular. O diagnóstico foi estabelecido por microbiologia clássica e biologia molecular (PCR e DNA). Tratamento oral com anfotericina B, e cetoconazol tópico associado a natamicina foi eficaz.

Höfling-Lima et al. (2005b) relatam um caso atípico de infecção fúngica da córnea por *Fonsecaea pedrosoi* em um estudante de 18 anos que desenvolveu úlcera de córnea em olho direito 28 dias após trauma de córnea com fragmento de vidro.

Maidana et al. (2005) realizaram um estudo retrospectivo nos prontuários de 146 crianças atendidas no Departamento de Oftalmologia do Hospital de Clínicas da Universidade Nacional de Assunção - Paraguai, no período compreendido entre março de 1988 a agosto de 2002; com idade variando de 0 a 18 anos, todas com úlceras de córnea de etiologia infecciosa. As culturas foram positivas nas amostras clínicas de 113 pacientes (77%) e destas 78 (70%) foram de etiologia bacteriana e 35 (30%) de etiologia fúngica, as principais espécies foram *Acremonium* ssp (25%), *Fusarium* ssp (14%) e *A. fumigatus* (14%).

Paula et al. (2006) afirmam que endoftalmite por *Aspergillus* estar geralmente relacionada à disseminação local ou sistêmica do agente em pacientes imunocomprometidos, no entanto relatam um caso raro de glaucoma bilateral grave secundário a uma infecção intra-ocular por *A. niger* em um jovem de 27 anos portador do vírus da imunodeficiência humana adquirida-HIV, na ausência de qualquer foco detectável de aspergilose. Os autores concluíram

que a endoftalmite por *Aspergillus* deve ser considerada em pacientes HIV - positivo mesmo na ausência de aspergilose sistêmica.

Suzuki et al. (2007) relatam um caso de ceratite causada por um fungo raro, *Malassezia restricta* em um trabalhador rural de 70 anos, diabético. Após contaminação do olho esquerdo por material vegetal, o paciente foi tratado com agentes antifúngicos tópicos pimaricina 5%, miconazol 2% e 150mg/dia oral de itraconazol, com a úlcera córnea desaparecendo após cinco semanas de tratamento.

2.2 ADERÊNCIA DOS FUNGOS AS CELULAS EPITELIAIS

Os fungos são microrganismos que possuem vários fatores os quais permitem crescimento nas condições adversas oferecidas pelo hospedeiro, propiciando o estabelecimento da relação parasitária e contribuindo no processo de doença. Esses fatores são conhecidos como fatores de virulência auxiliando no desenvolvimento da infecção e interferindo com a patogênese das micoses (Kurokawa et al. 1998).

Segundo Sidrim; Rocha (2004), dentre os fatores de virulência que têm sido estudados entre os fungos, destaca-se a aderência aos tecidos do hospedeiro.

Aderência é a capacidade do microrganismo se aderir às células epiteliais. Fatores extrínsecos e intrínsecos ao organismo influenciam o desencadeamento das micoses agindo, também, na capacidade de adesão às superfícies mucosas; esta característica desempenha um papel decisivo na patogênese de infecções fúngicas, sendo considerada como um determinante na origem dos processos infecciosos (Sobel et al., 1981; Ghannoum; Edwards, 1992).

A variação do mecanismo de aderência depende de carboidratos, glicocorticóides, corticosteróides, antibióticos, drogas antifúngicas, sais e soro sanguíneo. Também interferem no mecanismo de aderência, a concentração, idade, viabilidade das culturas dos microrganismos (Douglas, 1985; Bykov; Velichko, 1988; Macura; Tondyra, 1989; Ghannoum; Edwards, 1992).

A aderência às células epiteliais pelos microrganismos consiste no primeiro estágio para desencadeamento do processo patogênico no tecido hospedeiro. Estudos têm demonstrado que há variações na capacidade de aderência por algumas espécies de fungos, o que explica o porquê de algumas leveduras serem encontradas mais freqüentemente colonizando mucosas (Ellepola; Samaranayake, 1998; Jabra-Rizk et al., 2001).

A aderência aos tecidos do hospedeiro é um pré-requisito essencial para colonização e infecção. Tsang; Samarannyake (1999), compararam a aderência de 15 isolados de *C. albicans* coletadas da cavidade bucal de pacientes infectados com o HIV com 12 isolados coletados de cavidade bucal de pacientes sem este vírus. Os autores, concluíram que a aderência de *C. albicans* isoladas de pacientes portadores do vírus HIV não diferiu significativamente dos isolados de pacientes livres do vírus HIV.

Estudando o possível envolvimento de aderência de espécies de *Candida* em mucosas, King et al. (1980), examinaram *in vitro* a capacidade de aderência de sete espécies de *Candida*. Os resultados indicaram que *C. albicans* se adere às células epiteliais da boca e vagina mais significativamente que as outras espécies testadas. *C. tropicalis* e *C. stellatoidea* demonstraram capacidade de aderência moderada enquanto *C. parapsilosis* mostrou pouco grau de aderência.

Khaled e Abu-Elteen (2000), investigaram a aderência de três espécies de *Candida* as células epiteliais bucais após tratamento com diferentes concentrações de extrato de tâmara. Os autores observaram que o extrato reduz significativamente a aderência de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. kefyr* às células epiteliais bucais. Constataram ainda que o extrato de tâmara também inibiu a formação do tubo germinativo de *C. albicans* (56-85%) o qual talvez pode ter contribuído para os efeitos da aderência.

Panagoda et al. (2001), investigaram *in vitro* a aderência de 24 isolados de *C. parapsilosis* e 12 isolados de *C. albicans*, em relação a hidrofobicidade da superfície da célula, aderência a célula epitelial bucal e superfície acrílica. Os autores concluíram que não houve diferença significativa em relação a aderência as células epiteliais bucais entre as espécies, porém, *C. parapsilosis* demonstrou uma tendência maior em se aderir às células epiteliais bucais e a superfície acrílica. Este resultado mostrou a íntima relação entre aderência e a superfície hidrofóbica das células em candidíases e implica que estas espécies são igualmente potentes em colonizar mucosas.

Vidotto et al. (2003), estudaram a capacidade de aderência a células epiteliais da boca e vagina de 27 cepas de *C. albicans* e 26 de *C. dubliniensis* isoladas de pacientes portadores do vírus HIV. As amostras apresentaram importantes níveis de aderência. Os autores concluíram que as espécies de *Candida* se adaptaram em termos de aderência as mucosas vaginal e bucal.

Dagdevirem et al. (2005) investigaram a presença de fatores de virulências incluindo a capacidade de aderência em 33 isolados de *C. parapsilosis*, destes 19 eram provenientes de cultura de sangue. A média de aderência dos 19 isolados de cultura de sangue foi de 52,63%

enquanto 14 isolados de cultura não-sangue foi de 57,96% esses valores não diferiram significativamente ($p>0.05$).

Tamura et al. (2007), avaliaram o potencial de virulência de 23 amostras, incluindo *C.albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* e *C. glabrata* isoladas de cateteres e mãos de trabalhadores em um hospital do nordeste do Paraná. Os autores concluíram que as leveduras isoladas de cateteres foram mais aderentes e hidrofóbicas ($p<0.05$) que as isoladas das mãos e que algumas espécies de *Candida* expressam com mais intensidade os fatores de virulência.

3 PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS

3.1 OBTEÇÃO DAS AMOSTRAS CLINICAS

Trata-se de um estudo prospectivo, transversal e descritivo, sendo a amostra composta de pacientes diagnosticados com ceratite infecciosa, atendidos em emergência oftalmológica pública de referência, Recife-PE. No período de outubro de 2006 a outubro de 2007 foram atendidos 80 pacientes dos quais foram realizadas coletas de raspados de córnea em 73 pacientes. Foram incluídos neste estudo, pacientes com infecção de córnea independente do início do tratamento clínico, não resposta ao tratamento clínica e recidiva do quadro após o tratamento cirúrgico. Foram excluídos os pacientes que apresentaram risco ou quadro estabelecido de perfuração ocular no momento do exame.

Foram analisadas as variáveis de sexo, idade, profissão, período entre início dos sintomas e entrada no serviço, fatores de risco, medicações prévias, uso de lentes de contato, histórico de cirurgia ocular prévia, tratamento inicial instituído e evolução do quadro oftalmológico.

Os raspados de córnea foram coletados com auxílio da lâmpada de fenda utilizando-se a espátula de Kimura. As amostras clínicas foram coletadas do centro e bordas da lesão, em seguida fixadas e coradas em lâminas de vidro pelos métodos de Gram e Giemsa e observadas ao microscópio, para evidenciar de estruturas fúngicas. Paralelamente, fragmentos das amostras clínicas foram inoculados na superfície dos meios, ágar Sabouraud e BHI (“Brain-Heart-Infusion”), contidos em placa de Petri, para possível isolamento e obtenção de cultura. As culturas obtidas foram mantidas à temperatura ambiente ($T.A=28^{\circ}C\pm 1^{\circ}C$) e acompanhada por até 15 dias de crescimento, para proceder à purificação e identificação.

Para purificação foram retirados fragmentos das colônias e semeadas na superfície do meio ágar Sabouraud, acrescido de 50mg/L cloranfenicol contido em placa de Petri. Após o surgimento das unidades formadoras de colônias fragmentos das culturas foram transferidas para tubos de ensaios contendo meio específico para posterior identificação.

Para identificação dos isolados foram observadas características macroscópicas (cor e aspecto das colônias) e microscópicas (tipo de esporo e septação do micélio) a partir de microcultivos, foram feitas preparações de lâminas com auxílio do corante Azul de Amann para melhor observação das estruturas fúngicas ao microscópio (Barnett et al. 1990; De Hoog et al. 2000; Lacaz et al. 2002; Sidrim; Rocha, 2004).

3.2 ADERÊNCIA IN VITRO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS

A aderência de fungos filamentosos e leveduras às células epiteliais bucais (CEB), foi realizada utilizando-se o método de Kimura e Pearsall modificado como descrito por Ellepola e Samanarayake (1998). CEB foram obtidas através de swab da boca de um indivíduo saudável. As células foram lavadas três vezes por centrifugação em solução tampão salina fosfato (PBS) (pH 7.4, 0.1M), resuspensas e ajustadas a uma concentração de 2×10^5 células epiteliais bucais/mL.

A aderência entre CEB e as células fúngicas foi testada através da adição de 50µL de suspensão a 1% de células de levedura ou conídios nos poços de placas de titulação. As placas foram então submetidas à mistura por 2 min (selecionados como tempo de interação ótimo no teste preliminar), e depois observadas para verificar agregação visível. Controles negativos dos poços contendo 50µL de CEB com 50µL de PBS e 50µL de suspensão de células de leveduras ou conídios com 50µL PBS foram realizados em cada placa de microtitulação. O teste para cada isolado foi repetido três vezes.

O sistema de graduação que segue foi utilizado para determinar os seguintes resultados: (M) máxima agregação visualizada; aderindo entre 50% a 100% da área superficial; (w) agregação fraca ou difusa, por aderir até 50%; (n) aderência não visualizada.

Para observar a aderência microscopicamente, uma gota do corante azul de metileno foi colocada em lâmina limpa, coberta por uma lamínula e observada microscopicamente com objetiva de 40x. Cada lamina tinha 100 células epiteliais e foi avaliada de acordo com a porcentagem da área superficial aderida por conídios e células de leveduras. A aderência as CEB foi fotograficamente registrada.

4 RESULTADOS E DISCURSÃO

4.1 CERATITE FÚNGICA

Ceratite fúngica foi diagnosticada em 16 (20%) do total de 80 pacientes estudados, desses os mais comumente acometidos eram homens com 75% dos casos de ceratite e as mulheres com 25%. A maioria dos casos de ceratite foi relatada em pacientes com idade entre 23 a 70 anos. Os principais fatores predisponentes identificados neste estudo foram trauma (81,25%), lagofalmo (6,25%) e condições sistêmicas como imunossupressão incluindo diabetes mellitus (6,25%) e hanseníase (6,25%). Foram isoladas de raspados de córnea um total de 14 fungos filamentosos e duas leveduras.

Dos 16 (20%) pacientes, o exame direto de esfregaços de raspados da córnea corados com Gram e Giemsa revelou a presença de estruturas fúngicas (Figura 1) com obtenção de fungos em culturas. Dos casos de trauma foram isolados *Aspergillus fumigatus* (1), *F. dimerum* (1), *F. oxysporum* (1), *F. solani* (4), *Microdochium nivale* (1), *Mycelia sterilia* (3), *Penicillium commune* (1) e *Trichoderma longibrachiatum* (1). De doença ocular (lagofalmo), diabetes mellitus e de hanseníase *F. solani* (1) *C. albicans* (1) e *Trichosporon cutaneum* (1) respectivamente. Quando diagnosticado ceratite por fungos filamentosos e leveduras foi realizado após oito dias, nova avaliação dos raspados de córnea.

Antifúngicos foram prescritos nos casos em que os esfregaços revelaram a presença de estruturas fúngicas. Atualmente, nenhuma droga antimicótica é ideal (não tóxica, fungicida com boa penetração na córnea), assim, a escolha é freqüentemente baseada na resposta clínica. Os protocolos de tratamento com natamicina a 5% tópica (pimaricina) e anfotericina B a 0,5% foram similares aos usados pela maioria dos pesquisadores (12,16).

Antifúngico oral foi usado de acordo com o tratamento estabelecido (17,19). Em 6,25% dos pacientes o agente antifúngico foi eficaz com melhora da lesão de córnea, no entanto na maioria dos casos a condição do olho piorou com aumento do infiltrado da córnea e hipópio. Nesses pacientes, foi realizado exame biomicroscópico que revelou leucoma central e baixa acuidade visual, sendo indicado transplante de córnea.

Ceratite fúngica é considerada uma doença devastadora responsável pela perda da córnea, e a segunda causa de cegueira em pais em desenvolvimento (7,10). Em geral, essa micose é mais comum nos homens que em mulheres. Isto provavelmente é porque os homens estão mais associados com atividade extensa ao ar livre, o que implica uma maior exposição a

corpos estranhos (2). No entanto, Tanure et al. (16) relataram que homens e mulheres da América do Norte são igualmente afetados.

Outros relatos também afirmam que trauma é o fator comum no espectro da ceratite fúngica (5,16). Outros fatores de riscos são diabetes mellitus (5,12) e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (16). No presente estudo identificamos apenas um paciente com diabetes mellitus e um com hanseníase.

Em nosso trabalho, fungos filamentosos foram os principais agentes de ceratite antecedido por trauma. De acordo com Chowdhary et al. (3), ceratite infecciosa geralmente ocorre em paciente com córnea lesionada e com as defesas imunes comprometidas. Nossos dois casos de ceratite por *Candida albicans* e *Trichosporon cutaneum* ocorreram em córnea de imunocomprometidos (diabetes mellitus e hanseníase). Dois casos de infecção pós-operatória por *Trichosporon cutaneum* foi descrita por Sheikh et al. (13) em degeneração ocular levando a perda da visão em um olho e enucleação do outro.

Em países em desenvolvimento as espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* têm sido os fungos mais isolados (18, 20). Similarmente nos países desenvolvidos como Estados Unidos e Grã-Bretanha espécies de *Candida* são mais isoladas nos casos de ceratites fúngicas (6,16).

As manifestações clínicas das ceratites fúngicas dependem do tipo de fungo. As ceratites por *Candida* geralmente manifestam-se com bordas regulares, enquanto as causadas por fungos filamentosos, como *Fusarium* sp e *Aspergillus* sp, mostram úlceras com bordar irregulares, infiltração e hipópio (3), como nos nossos casos. De acordo com De Hoog (4) a espécie mais comum de infecção ocular é *F. solani*, entretanto, outras espécies como *F. dimerium*, *F. oxysporum*, *F. sacchari* e *F. verticillioides* são raramente envolvidos. Interessantemente, nós descrevemos *F. dimerium* e *F. oxysporum* como agentes de infecção ocular.

Foram isolados também três dos nossos casos *Mycelia sterilia*, o qual é citado por Sun et al. (14) em pacientes Chineses apresentando esta micose. Em três dos nossos casos *Microdochium nivale*, *P. commune* e *T. longibrachiatum* foram encontrados sendo o primeiro relato em infecção ocular.

Exame microscópico direto de esfregaço corado com Gram e Giemsa representa rápido, confiável e de baixo custo para o diagnóstico, bem como apresenta alta sensibilidade, facilitando terapia antifúngica precoce, antes do resultado da cultura (3).

4.2 ADERÊNCIA *IN VITRO* DOS FUNGOS AS CELULAS EPITELIAIS BUCAIS

A figura 2 ilustra a capacidade máxima de aderências as CEB por *Aspergillus fumigatus* (A), *Candida albicans* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium comune* (D); fraca aderência por *F. dimerum* (E), *Trichoderma longibrachiatum* (F), *Trichosporon cutaneum* (G) e sem aderência por *F. oxysporum* e *Microdochium nivale* (H).

A principal diferença no grau de aderência as CEB foi interespecífica, entre *F.solani* e as demais espécies (Tabela 1).

Aderência fúngica é inicialmente afetada por combinação de interação hidrofóbica e eletrostática e a capacidade de aderência depende de vários fatores, como o estado hidrofóbico da parede celular fúngica (Blanco et al., 1997; Jabra-Rizk et al., 2001), as características da superfície do substrato (Imbert et al., 2002), e as condições do método empregado (Sullivan et al., 2004). Nossos resultados confirmam que a adesão as CEB podem ocorrer tanto por leveduras quanto por fungos filamentosos apresentando variados graus de aderência.

Dos agentes etiológicos responsáveis pela infecção de córnea dos nossos pacientes, *Microdochium nivale*, *Penicillium commune* e *Trichoderma longibrachiatum* são citados pela primeira vez em lesão ocular e testados quanto à capacidade de aderência, só há relatos com *C. albicans*. Esta é um comensal da microbiota do olho e outras espécies são mais comumente adquiridas após trauma de córnea, cirurgia, hospitalização e imunossupressão (Thomas, 2003; Wu et al., 2003).

Nas infecções, a aderência e produção de enzimas contribuem para virulência de leveduras, porém a formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro conduzem a patogenicidade (Sudbery, 2004).

A espécie mais comum em casos de infecção ocular é *F. solani* (De Hoog et al., 2000), contudo *F. dimerum* e *F. oxysporum* estão mais raramente envolvidas em infecção ocular (Guarro and Gené, 1995). Tem sido sugerido que a razão para definir a virulência de *Fusarium* em infecções da córnea não está relacionada com a capacidade de aderência deste gênero, mas a produção de toxinas, substâncias que contribui para penetração do fungo e auxiliam no desenvolvimento das lesões (Kuriakose e Thomas, 1991).

Resultados contraditórios têm sido encontrados com aderência as CEB e hidrofobicidade da superfície celular. Alguns autores consideram que a hidrofobicidade celular quando comparadas às células hidrofílicas são mais aderentes às células bucais (Jabra-Rizk et al., 2001), entretanto, McCarron et al. (2004) encontraram uma relação inversa entre a

hidrofobicidade da superfície celular e a aderência. Samaranayake et al. (2003), demonstraram uma correlação positiva em um único isotipo, contudo, nenhuma correlação significativa foi observada quando isolados de *Candida* foram testados conjuntamente e avaliados como um grupo. Nossos resultados mostram que a hidrofobicidade não interferiu na aderência as CEB, visto que, leveduras (hidrofóbicas) e espécies filamentosas (menos hidrofóbicas) mostraram máxima aderência.

Nós definimos as condições do estudo *in vitro* reprodutíveis, mas torna-se importantes estudos utilizando um número maior de isolados e condições *in vivo*.

Em conclusão, esse estudo demonstra que *A. fumigatus*, *C. albicans*, *F. solani* e *P. comune*, tiveram alta capacidade de se adaptarem às condições ambientais.

Pesquisas relacionadas com a patogenicidade de infecções fúngicas oculares são necessárias para desenvolver abordagens inovadoras na prevenção e controle da doença.

Figura 1. Raspado de córnea corado com Giemsa mostrando hifa hialina (A), conídios (B), hifa artrosporada (C), células de leveduras (D). Aumento X 1000. Respectivamente, estruturas microscópicas de *Aspergillus fumigatus* (A₁), *Penicillium commune* (A₂), *Trichoderma longibrachiatum* (A₃), *Fusarium oxysporum* (B₁), *Trichosporon cutaneum*. (C₁), *Candida albicans* (D₁). Aumento X 400.

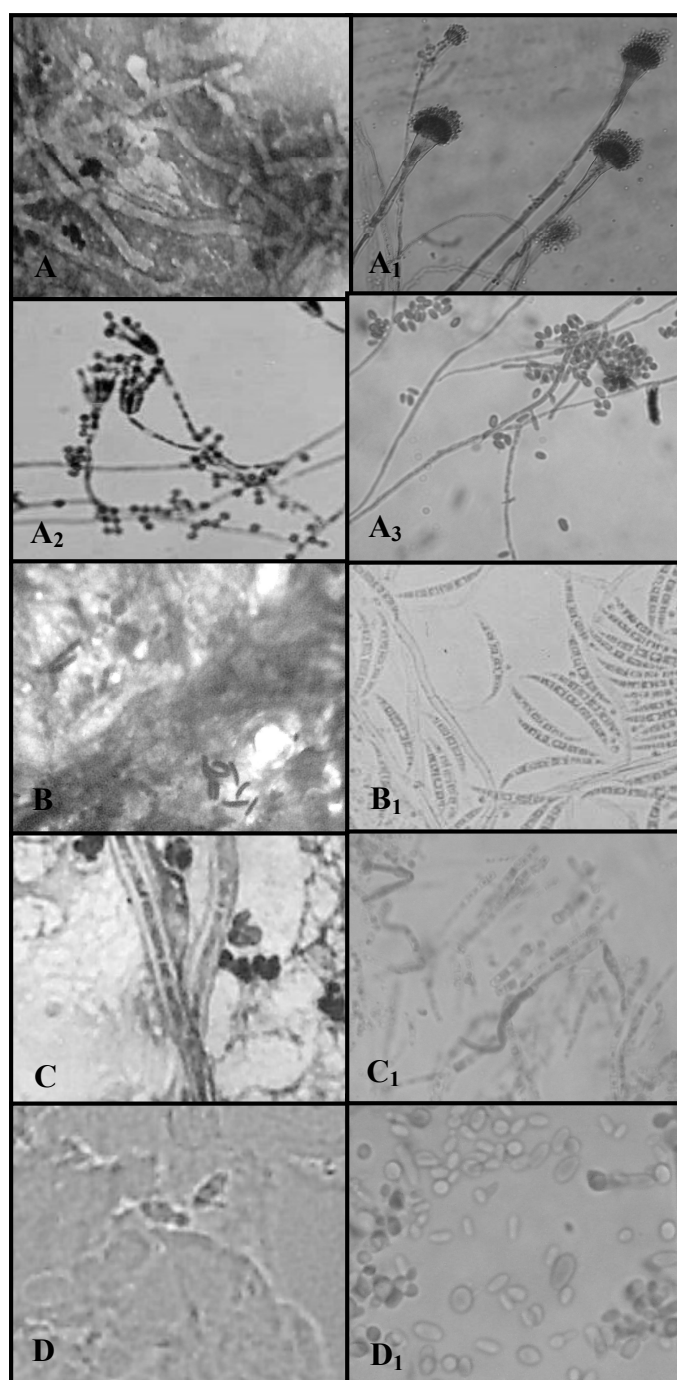
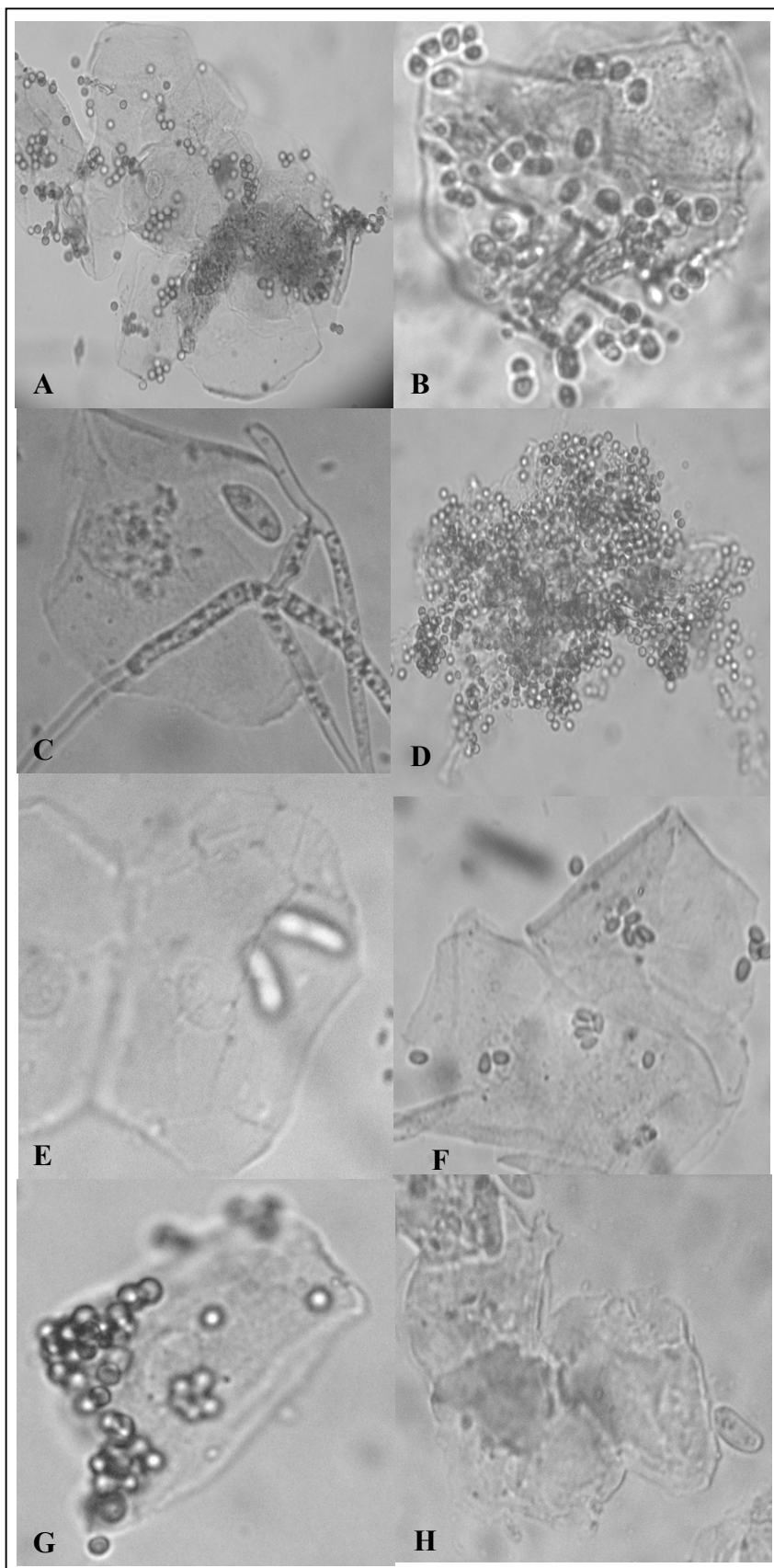


Tabela 1. Aderência às células epiteliais bucais de fungos filamentosos e leveduras obtidas de raspados de córnea.

Número de Registro	Espécies de Fungos	Aderência
01	<i>Aspergillus fumigatus</i>	M
02	<i>A. fumigatus</i>	M
03	<i>Candida albicans</i>	M
04	<i>Fusarium dimerum</i>	w
05	<i>F. oxysporum</i>	n
06	<i>F. solani</i>	M
07	<i>F. solani</i>	M
08	<i>F. solani</i>	M
09	<i>F. solani</i>	M
10	<i>F. solani</i>	M
11	<i>Microdochium nivale</i>	n
12	<i>Penicillium comune</i>	M
13	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	w
14	<i>Trichosporon cutaneum</i>	w

M - máxima aderência, w – fraca aderência, n – sem aderência.

Figura 2. Aderência máxima às células epiteliais bucais por *Aspergillus fumigatus* (A), *Candida albicans* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium comune* (D); Fraca aderência por *F. dimerum* (E), *Trichoderma longibrachiatum* (F), *Trichosporon cutaneum* (G) e Sem aderência *F. oxysporum* (H).



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir:

- Infecções fúngicas oculares ocorrem frequentemente em pacientes expostos a fatores predisponentes.
- O diagnóstico precoce é fundamental para o tratamento, prognóstico e cura da ceratite fúngica.
- O diagnóstico de infecções fúngicas oculares só é possível através do exame direto e/ou cultura.
- Diabetes mellitus, hanseníase e trauma ocular predis põem às infecções fúngicas oculares.
- *Fusarium solani* em paciente com diabetes mellitus causa perda de globo ocular e *Candida albicans* em paciente com hanseníase causa perda de visão.
- Os agentes etiológicos mais freqüentes de infecções fúngicas oculares são *Fusarium solani* e *Aspergillus fumigatus*.
- Este é o primeiro relato de *Penicillium comune* e *Trichoderma longibrachiatum* como agentes de infecção fúngica da córnea.
- *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Penicilium comune* apresentam forte grau de aderência às células epiteliais bucais, *F. dimerum*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichosporon cutaneum* mostram fraca aderência e *F. nivale* e *F. oxysporum* são incapazes de se aderir.
- Entre isolados de uma mesma espécie, ocorrem diferenças na aderência às células epiteliais bucais.

REFERÊNCIAS

- Bharathi, M.J.; Ramakrishnan, R.; Vasu, S.; Meenakshi, R.; Palaniappan, R. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. **Indian j Ophthalmol.** v. 51 n.4 p. 315-21, 2003
- Bourcier,T.; Touzeau, O.; Thomas, F.; Chaumeil, C.; Baudrimont, M.; Borderie, V.; Laroche, L. *Candida parapsilosis* keratitis. **Cornea.** V. 22, n.1, p.51-5, 2003.
- Bykov, V.L.; Velichko, E.V. Experimental study of corticosteroids on the adherence of fungi of the genus *candida* to mucosal epithelial cells. **Zh Mikro Epid Immun.**, n. 8, p.115-118, 1988.
- Carvalho, A.C.A.; Ruthes, H.I.; Maia, M.; Yana, D.; Sato, M.T.; Moreira, H.; Fernandes-Bordignon, G.; Queiroz-Teles F. Ceratite fúngica no estado do Paraná – Brasil: aspectos epidemiológicos, etiológicos e diagnósticos. **Ver Iberoam Micol.** v. 18, p. 76-78, 2001.
- Choi, D. M.; Goldstein, M. H.; Salierno, A.; Drieb, W. T. Fungal Keratitis in a daily disposable soft contact lens wearer. **Clao J.** v. 27, n.2, p. 111-2, 2001.
- Chowdhary, A.; Singh, K. Spectrum of fungal keratitis in North India. **Córnea.** v. 24, n.1, p.8-15, 2005.
- Dagdeviren, M.; Cerikcioglu, N.; Karavus, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. **Mycoses.** v. 48, p.321–326, 2005.
- DE Oliveira, P. R.; Resende, S. M.; DE Oliveira, F. C.; DE Oliveira A. C. **Ceratite fúngica.** Arq Bras Oftalmol, n.64 p.75-9, 2001.
- Douglas, L.J. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. **Microbiol Scien.** v.2, n.8, p. 243-247, 1985.
- Ellepola, A.N.; Samaranayake, L.P. Adhesion of oral *Candida albicans* to human buccal epithelial cells following limited exposure to antifungal agents. **J Oral Path Med.** v.27, n.7, p.325-332, 1998.

- Ferrer, C.; ALIO, J.; Rodriguez, A.; Andreu, M.; Colom, F. Endophthalmitis Caused by *Fusarium proliferatum*. **J clin microbiol.** v.43, n.10, p. 5372–5375, 2005
- Foster, C.S. Fungal keratitis. **Infect Dis Clin North Am.**v.6, p.851-7, 1992.
- Ghannoum, M.A.; Edwards Jr; J.E. *Candida* adherence to epithelial cells. **J Mycol Med.**, v.2, n.1, p.10-13, 1992.
- Godoy, G.; Wahab, S. A.; Höfling DE Lima, A. L.; Moreira, H. Endoftalmite por *Candida albicans* após transplante penetrante de córnea-Relato de caso. **Arq Brás Oftalmol.** v.67, p.349-52, 2004
- Gomes, F. S.; Alves, M. A. A. Ceratites Fúngicas. **Revista Médica.** v. 37, n. 2, 2003
- Guarro, J.; Höfling-Lima A. L.; Gené, J.; DE Freitas, D.; Godoy, P.; Zorat-YU, M L.; Zaror, L.; Fischman, O. Corneal Ulcer Caused by the New Fungal Species *Sarcopodium oculorum*. **J clin microbiol.** p. 3071–3075, 2002.
- Hamdam, J.; Guimarães, I.S.; Oréfice, F. Uveítes fúngicas. In: Oréfice O, editor. Uveíte clínica e cirúrgica. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**; 2000. p.569-93.
- Hofling-Lima, A. L.; Forseto, A.; Duprat, J. P.; Andrad, A.; Sousa, L. B.; Freitas, D. Estudo laboratorial das micoses oculares e fatores associados a ceratites. **Arq Bras Oftalmol.** v. 68, n. 1, p. 21-27, 2005. (a)
- Hofling-Lima, A. L.; Garro, J.; Freitas, D.; Godoy,P.; Gené, J.; Sousa, L. B.; Zaror, L.; Romano, A. Clinical treatment of corneal infection due to *Fonsecaea pedrosoi*- Case report. **Arq Bras Oftalmol.** v. 68, n. 2, p. 270-2, 2005. (b)
- Jabra-Rizk, M.A.; Falkler-JR, W.A.; Merz, W.G.; Baqui, A.A.; Kelley, J.I.; Meiller, T.F. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. **Rev Ibero Micol.**, v.8, n.1, p.17-22, 2001.
- Khaled, H.; Abu-ELTeen. Effects of date extract on adhesion of *Candida* species to human buccal epithelial cells *in vitro*. **J Oral Pathol Med.** v.29 p. 200–5, 2000.
- King, R. D.; Lee, J.C.; Morris, A. L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. **Infection and immunity.** p. 667-674,1980.

KLOTZ, A. S.; PENN, C.C.; NEGVESKY, G. J.; BUTRUS, S. I. Fungal and parasitic infections of the eye. **Clin Microbiol Rev.** v.13, n.4, p.662-685, 2000.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; and PERAÇOLI, M. T. S. Virulence Factors IN Fungi OF Systemic Mycoses. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** v.40, n.3, p.125-136, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9th edn. São Paulo: Sarvier, 2002.

MACURA, A.B.; TONDYRA, E. Influence of some carbohydrates and concanavalin A on the adherence of *Candida albicans* “in vitro” to buccal epithelial cells. **Zentra. Bakt.** v.272, n.2, p.196-201, 1989.

MAIDANA, E.; GONZÁLEZ, R.; MELO JÚNIOR, L.A. S. DE.; SOUZA, L. B. DE. Ceratite infecciosa em crianças: estudo microbiológico e epidemiológico em um hospital universitário de Assunção – Paraguai. **Arq Bras Oftalmol.** v.68, n.6, p.828-32, 2005.

McLEOD, S.D.; ISFAHANI, A.K.; ROSTAMIAN, K.; FLOWERS, C.W.; LEE, P.P.; MCDONNELL, P.J. The role of smears, cultures, and antibiotic sensitivity testing in the management of suspected infectious keratitis. **Ophthalmology.** v. 103, p. 23-28, 1992.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; RICCI, T.A.; HANNA, S.A.; SALINA, M.A. Fatores envolvidos na patogênese fúngica. **Rev Cienc Farm.** V.18, n. 2, p.207-29, 1997

PANAGODA, G. J.; ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses.** V. 44, p.29-35, 2001.

PANDA, A.; SHARMA, N.; DAS, G.; KUMAR, N.; SATPATHY, G. Mycotic keratitis in children: epidemiologic and microbiologic evaluation. **Cornea.** v.16 n.3 p.295-9, 1997

PAULA, J. S.; BRYK, A.; ARGEMIRO, J.; FILHO, L.; ROMÃO, E. Glaucoma secundário a endoftalmite bilateral por Secondary glaucoma associated with bilateral *Aspergillus niger* endophthalmitis in an HIV-positive patient: case report. **Arq Bras Oftalmol.** v.69, n.3, p.395-7, 2006

RODEAU, N.; BOURCIER, T.; CHAUMEIL, C.; BORDERIE, V.; TOUZEAU, O.; SCAT, Y.; THOMAS, F.; BAUDOUIN, C.; NORDMANN, J. P.; LAROCHE L. [Fungal Keratitis at

the Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts: retrospective study of 19 cases] **J Fr Ophtalmol.** v. 25 n. 9, p. 890-6, 2002.

SALERA, C. M.; TANURE, M. A. G.; LIMA, W. T. M.; CAMPOS, C. M.; TRINDADE, F. C.; MOREIRA, J. A. Perfil das ceratites fúngicas no Hospital São Geraldo Belo Horizonte-MG. **Arq. Brás. Oftalmol.** v. 65, p. 9-13, 2002.

SHIN, J.Y.; KIM, H.M.; HONG, J.W. Keratitis caused by *Verticillium* species. **Cornea.** v.21 n.2 p.240-2, 2002

SIDRIM, J.J.C; ROCHA,M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 388p.

SOBEL, J.D.; MYERS, P.G.; KAYE, D.; LEVISON, M.E. Adherence of *candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. **J. Infect. Dis.** v.143, n.1, p.76-82, 1981.

SRIDHAR, M. S.; GARG, P.; BANSAL, A. K.; GOPINATHAN, U. *Aspergillus flavus* keratitis after laser in situ keratomileusis. **Am. J. Ophthalmol.** v. 129, n. 6, p. 802-4, 2000.

SUZUKI, T.; NOBUHIDE, H.;TOMOKO, M.;YUKIKO H.; AND KIYOFUMI M. Keratitis Caused by a Rare Fungus, *Malassezia restricta*. **Jpn J Ophthalmol.** v.51, p.292–294, 2007.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.40, n.1, p.91-93, 2007.

THOMAS, P. A. Fungal infections of the cornea. **Eye.** v. 17, p. 852-862, 2003

TSANG, C.S.P. AND SAMARANAYAKE, L.P. Factors affecting the adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in human immunodeficiency virus Infection. **British Journal of Dermatology.** 141: 852:858,1999.

VERMA, S.; AND TUFT, S. J. *Fusarium solani* keratitis following LASIK for myopia. **Br J Ophthalmol.** V.86, n.10, p. 1190–1191, 2002.

VIDOTTO, V.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G.; AOKI, S.; & ITO-KUWA, S. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. **Rev Iberoam Micol.** v. 20, p. 52-54, 2003.

VIEIRA, L.A. Ceratite micótica. In: BELFORT JR R, KARA-JOSÉ N. **Córnea Clínicacirúrgica**. São Paulo: Roca; p.189-203, 1997.

WONG, T.Y.; FONG, K.S.; TAN, D.T. Clinical and microbial epectrum of fungal keratitis in Singapore: a 5-year retrospective study. **Int. Ofhthalmol.** v.21 n.3 p. 127-30, 1997.

APÊNDICES – ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO

**APÊNDICE A - EVISCERAÇÃO DE OLHO POR *FUSARIUM SOLANI* EM
PACIENTE DIABÉTICO**

**ARTIGO SUBMETIDO À
MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
RIO DE JANEIRO RJ - BRASIL**

EVISCERAÇÃO DE OLHO POR *FUSARIUM SOLANI* EM PACIENTE DIABÉTICO

Elvislene Camelo Soares Leite¹, Débora Maria Massa Lima¹, Oliane Maria Correia Magalhães¹,
Rejane Pereira Neves^{1*}

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco Av. Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author: rejadel@ufpe.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8481

EVISCERAÇÃO DE OLHO POR *FUSARIUM SOLANI* EM PACIENTE DIABÉTICO

Resumo

O gênero *Fusarium* está entre os agentes que mais freqüentemente causam ceratomicoses em humanos de forma supurativa, usualmente como doença ulcerativa de córnea. Trauma de córnea é o fator predisponente mais comum para ceratomicoses. Outros trabalhos reportaram fatores predisponentes que incluíam doenças como diabetes mellitus. Os autores relataram um caso de perda de olho em um homem de 61 anos de idade, com diabetes mellitus insulina dependente tipo II atendido no Serviço de Oftalmologia do Hospital das Clínicas em Pernambuco, Brasil. O diagnóstico foi confirmado através de exame direto e cultura o qual revelou a presença de hifas septada sendo a espécie identificada como *F. solani* através de cultura.

Palavras-chave: Evisceração de olho, *Fusarium solani*, diabetes mellitus.

O gênero *Fusarium* é conhecido como um sapróbio de solo e um patógeno de planta de interesse econômico. Todavia, estão frequentemente implicados em infecções humanas os fatores predisponentes incluem trauma de córnea e doenças sistêmicas tais como diabetes mellitus. *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. moniliforme* são conhecidos por causarem infecções de pele, unha, olhos e também por terem a habilidade de se aderirem a materiais prostéticos (lentes de contato, catéteres) (Tanure et al. 2000, Anandi et al. 2005, Anuradha & Kirti 2005).

Tem sido sugerido que a razão para a marcante virulência de *Fusarium* é a produção de substâncias que facilitam o fungo a penetrar na córnea ou toxinas que ajudam a produzir lesões (Guarro et al. 2003, Dignani & Anaissie 2004).

Ceratomicoses podem rapidamente conduzir a destruição progressiva da córnea e a perda de visão na maioria dos casos (Guarro et al. 2003, Dignani & Anaissie 2004).

Um homem de 61 anos de idade, aposentado, com diabetes mellitus tipo II insulina dependente foi atendido no Serviço de Oftalmologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco, Brasil, 2006. Paciente reclamava de dores no olho direito por aproximadamente dez dias, negava doenças oculares prévias ou injúrias por traumas. Ao exame clínico, apresentou secreção esverdeada, hiperemia conjuntival, úlcera de córnea central com bordos irregulares e hipópio (Fig. 1A).

O paciente iniciou tratamento com vancomicina tópica (25mg/mL), amicacina (50mg/mL) e fungison (2µg/mL) de hora em hora.

Raspados de córnea profunda foram coletados com espátula de Kimura para exame direto. Montagens coradas pelo método de Gram revelaram a presença de hifas septadas (Fig. 1B) e culturas em Sabouraud (Difco), infusão de cérebro e coração (Difco) e ágar sangue (Merk), foram incubadas a 25 °C e 37 °C. Após cinco dias *F. solani* (Fig. 1) foi identificado em cultura.

O paciente iniciou tratamento oral com amphotericina B (200mg) duas vezes ao dia. Todavia, os sintomas persistiram e pioraram; evisceração foi realizada como a única forma possível de tratamento.

Ceratomicose é uma doença relativamente comum que pode rapidamente conduzir à destruição progressiva de córnea e perda de visão na maioria dos casos como na diabetes mellitus (Dóczi et al. 2004). A ocorrência de ceratomicoses é de grande importância não apenas pelos problemas no diagnóstico, mas também devido à severidade das manifestações clínicas e ao pobre prognóstico apesar do tratamento antifúngico. A severidade e progressão das infecções fúngicas usualmente dependem da existência de doenças de base prévias, mecanismos de defesa local prejudicado e espécies fúngicas envolvidas (Thomas 2003).

O prognóstico das manifestações clínicas e visuais da ceratite fúngica depende do tipo de fungo, e do desenvolvimento de procedimentos para detecção e identificação de patógenos fúngicos além de tratamento rápido (Ferrer et al. 2001). Espécies de *Fusarium* são relativamente resistentes ao tratamento com agentes antifúngicos (Pujol et al. 2001).

O presente relato de caso destaca a relevância do exame direto, identificação do agente causal e doenças pré-existentes as quais devem ser examinadas rapidamente a fim de evitar agravamento.

REFERÊNCIAS

- Anuradha C, Kirti S 2005. Spectrum of fungal keratitis in North India. *Cornea* 24: 8-15.
- Anandi V, Vishwanathan P, Sasikala S, Rangarajan M, Subramaniyan CS, Chidambaram N 2005. *Fusarium solani* breast abscess. *Ind J Med Microbiol* 23: 198-199.
- Dignani MC, Anaissie E 2004. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect Dis* 10 : 67-75.
- Dóczi T, Gyetvai L, Kredics , Nagy E 2004. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. *Clin Microbiol Infect* 10: 773-776.
- Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 39: 2873-2879.
- Guarro J, Rubio C, Gene J, Cano J, Gil J, Benito R, Morandier MJ, Miguez E 2003. Case of keratitis caused by an uncommon *Fusarium* species. *J Clin Microbiol* 41: 5823-5826.
- Pujol I, Guarro J, Gene J, Sala J 1997. *In-vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J Antimicrob Chemother* 39: 163-7.
- Tanure MA, Cohen EJ, Sudesh S, Rapuano CJ, Laibson PR 2000. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania. *Cornea* 19: 307-312.
- Thomas PA 2003. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 16: 730-797.

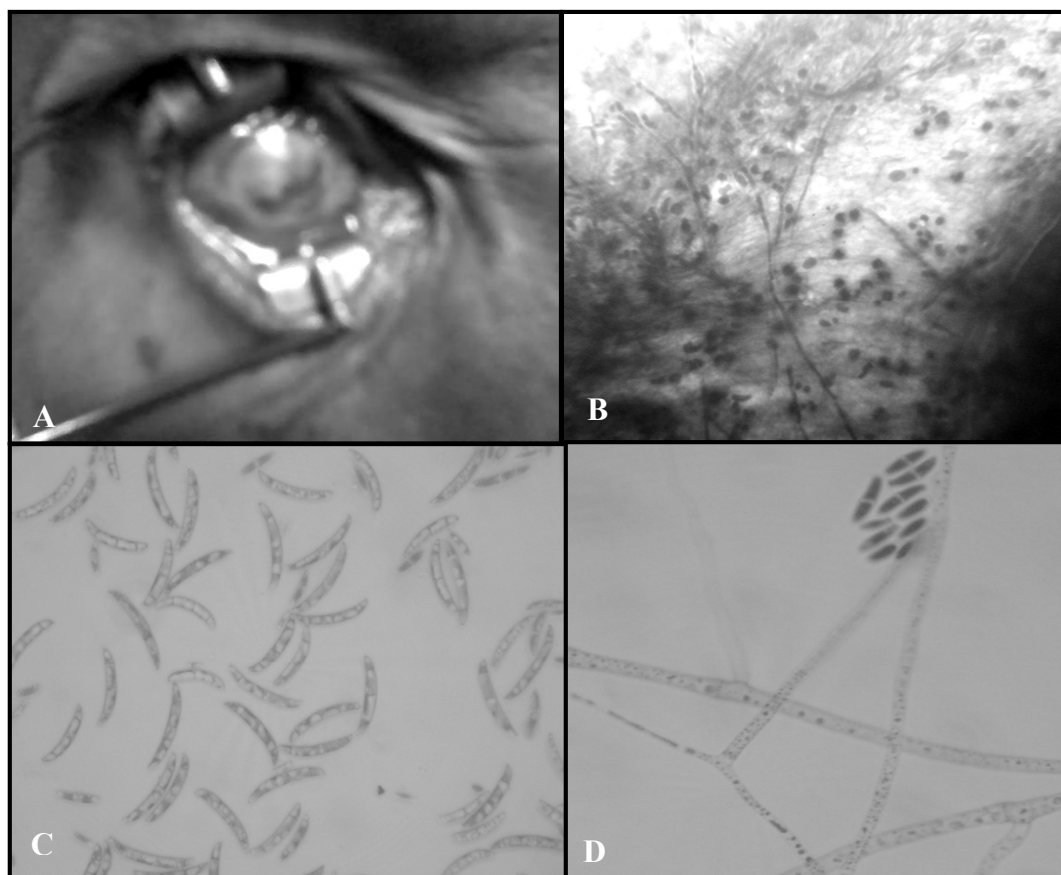


Figura 1. Aspecto clínico do olho apresentando hiperemia conjuntival, úlcera central de córnea com bordos irregulares e hipópio (A); montagem por coloração de Gram exibindo hifas (B); macroconídios falcados (C); hifas septadas e ramificadas, conidióforo produzindo microconídios (D).

**APÊNDICE B - CORNEAL TRANSPLANTATION IN A CHILD WITH ACUTE
FUNGAL KERATITIS**

ARTIGO SUBMETIDO

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

SÃO PAULO SP - BRASIL

TRANSPLANTE DE CÓRNEA EM CRIANÇA COM CERATITE FÚNGICA AGUDA

Elvislene Camelo Soares Leite¹, Carlos Teixeira Brandt², Graziela Luna³, Fabíola Maria Marques do Couto¹, Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo¹; Rejane Pereira Neves^{1*}

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, ² Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Hospital das Clínicas Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil; ³ Fundação Altino Ventura, Rua da Soledade, 170-Boa Vista, 50070-040 Recife, PE, Brasil;

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

CORNEAL TRANSPLANTATION IN A CHILD WITH ACUTE FUNGAL KERATITIS

ABSTRACT

Mycotic keratitis is a devastating eye infection usually caused by filamentous fungi which occurs in all age groups though children tend to be less affected. *Aspergillus fumigatus* is rarely cited as agent of this eye infection. Here we report a case of fungal keratitis in a child with loss of cornea after injury. Corneal scraping was collected for smears. Direct examination of clinical samples revealed abundant dichotomous branching and septation of hyphae. Cultures were positive for *A. fumigatus*. Treatment with pimaricin was not effective and keratoplasty was indicated.

Key words: Mycotic keratitis, *Aspergillus fumigatus*, corneal transplantation.

TRANSPLANTE DE CÓRNEA EM CRIANÇA COM CERATITE FÚNGICA AGUDA

RESUMO

Ceratite micótica é uma grave infecção de olho usualmente causada por fungos filamentosos e ocorre em todas as faixas etárias sendo as crianças menos afetadas. *Aspergillus fumigatus* é raramente citado como agente desta infecção ocular. Nós reportamos um caso de ceratite fúngica em criança com perda de córnea após dano ocular. Raspados da córnea foram coletados para esfregaços. Exame direto das amostras clínicas revelou hifas septadas e dicotômicas. As culturas foram positivas para *A. fumigatus*. Tratamento com pimaricina não foi efetivo e ceratoplastia foi indicado.

Palavras-chave: Ceratite micótica, *Aspergillus fumigatus*, transplante de córnea.

Ceratite micótica é uma infecção ocular devastadora adquirida após lesão e apresenta maior morbidade do que as infecções bacterianas, o diagnóstico é frequentemente tardio e as drogas disponíveis nem sempre são eficazes (19). Esta micose é comum em ambientes rurais, contudo tem sido cada vez mais relatado após procedimento de cirurgia ocular (6,20).

Fungos filamentosos são frequentemente causas de ceratomicose em humanos e potencialmente de perda de visão, particularmente em países em desenvolvimento (8,16). Múltiplas espécies de fungos são relatadas infectando a córnea humana, e mais de trinta gêneros estão envolvidos nessa doença (4). O mais comum agente etiológico de úlcera de córnea é *Fusarium* seguido por espécies de *Aspergillus* (22).

Infecções por *Aspergillus* têm crescido em importância nos últimos anos e *A. fumigatus* é a espécie prevalente do gênero (11). Trauma penetrante no olho, cirurgia de catarata e disseminação hematogênica são condições associadas à endoftalmite endógena por *Aspergillus* (7,9).

Muitos fatores predisponentes são mencionados para ceratomicose, como uso de esteróides tópicos ou sistêmicos, trauma, desordem preexistente na superfície ocular, que pode produzir uma superfície sem epitélio, uso de antibióticos e doenças sistêmicas (4,10). O trauma por material vegetal pode ocorrer com introdução de fungo diretamente na córnea ou a infecção se estabelecer após um defeito epitelial (13). Comumente ocorre consequência ocular devastadora quando a infecção não tem diagnóstico precoce e tratamento adequado (22).

Neste relato, apresentamos um caso de infecção grave de córnea por *A. fumigatus* em uma criança de três anos de idade, atendida no setor de oftalmologia da Fundação Altino Ventura, Recife-Brasil em junho de 2007 com ceratite aguda no olho esquerdo. Aproximadamente uma semana antes o paciente, quando brincava, sofreu um trauma por corpo estranho. Desde então, o mesmo se queixava de crescente desconforto no olho.

O paciente apresentou úlcera de córnea central de 4 mm de diâmetro com bordos irregulares, sem perfuração, sendo observado um hipópio de 1.0 mm.

Amostras foram coletadas por raspagem do centro e bordos da úlcera de córnea, usando espátula de Kimura esterilizada em chama, a qual foi submetida à análise bacteriológica e micológica. O exame direto das amostras clínicas foi realizado pela coloração de Gram e Giemsa.

As culturas foram preparadas usando ágar sangue, ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol (Difco) incubado a 30°C e 35°C em uma atmosfera aeróbica e anaeróbica. Após cinco dias, numerosas colônias

esbranquiçadas se desenvolveram em todos os meios. Subculturas foram preparadas e as colônias puras foram transferidas para a superfície do meio ágar Czapeck para identificação características macroscópicas e microscópicas da morfologia colonial (5,12). Culturas foram consideradas positivas quando o crescimento do fungo aconteceu em duas ou mais placas de Petri de acordo com a positividade do exame direto.

O exame direto do raspado usando coloração de Gram revelou a presença de hifas septadas e dicotômicas. O agente etiológico cresceu de cinco dias e o número de colônias, aparentemente da mesma espécie fúngica cresceu em todos os meios e nas diferentes temperaturas. Macroscopicamente a cultura produziu uma colônia plana e branca que rapidamente tornando-se cinza-esverdeada, com a produção de conídios, textura variou de aveludada a flocosa, com reverso incolor. As cabeças conidiais colunares e agrupadas, variaram de 200-400 μ por 50 μ . Microscopicamente foram observados conidióforos curtos, lisos, com até 300 μ de comprimento e 5-8 μ de diâmetro. O fungo foi identificado como *A. fumigatus* de acordo com Klick (12). Os resultados das culturas bacteriológicas foram negativos.

Desde que o diagnóstico foi estabelecido, o tratamento foi iniciado com primaricina 5% aplicado topicamente a cada hora por 25 dias. Este medicamento não foi efetivo e ceratoplastia foi indicado após insucesso terapêutico.

Ceratite micótica pode ocorrer em uma variedade de zonas climáticas e são mais comuns, em regiões com clima tropical e subtropical, ambos encontrado na maior parte do Brasil (5,17). Nos países em desenvolvimento e de clima úmido, são favoráveis a ceratite infecciosa por trauma, a atividade agrícola associada à má nutrição. Além disso, os fungos estão normalmente presentes como comensal na microbiota de olhos saudáveis em cerca de 3-28% (1,5,18) e pode invadir a córnea em condições favoráveis como após trauma, administração de corticosteróides (2). Ocorre em todas as faixas etárias embora as crianças sejam menos afetadas (4,15).

Fungos filamentosos são mais comuns em pacientes com história de trauma no olho. Contudo fungos são agentes oportunistas que raramente infectam córnea saudável de indivíduos imunocompetentes (22).

Ceratite por *Aspergillus* causa úlcera de córnea com infiltração e bordos irregulares (21), como em nosso caso. Aqui relatamos um caso severo de ceratite por *A. fumigatus* com perda de córnea após injúria. *A. fumigatus* é pouco freqüente em infecção de olho humano. A espécie é mais comumente encontrada no solo e a injúria ocular atribuída à contaminação proveniente do solo (14).

As manifestações clínicas e prognóstico visual da ceratite fúngica dependem do tipo de fungo, conseqüentemente, o desenvolvimento de procedimentos para detecção e identificação rápida do fungo patógeno são importantes (21). Assim, técnicas rápidas e confiáveis de diagnósticos podem salvar a visão de muitas pessoas com ceratite fúngica o que justifica a importância do exame direto e cultura positiva como ferramenta de diagnóstico, acompanhamento e tratamento de ceratite fúngica o atraso no diagnóstico e tratamento errado pode levar a perda da visão (3).

Nosso relato confirma que ceratite fúngica causada por *A. fumigatus* ocorre em crianças e não apresenta boa resposta terapêutica com primaricina.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado por subsídios da Cordenção de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Ando, N.; Takatori, K. (1982). Fungal flora of the conjunctival sac. *Am. J. Ophthalmol.*, 94, 67-74.
2. Chowdhary, A.; Singh, K. (2005). Spectrum of fungal keratitis in north India. *Cornea*, 24(11), 8-15.
3. Avunduk, A.M.; Beuerman, R.W.; Varnell, E.D.; Kaufman, H.E. (2003). Confocal microscopy of *Aspergillus fumigatus* keratitis. *Br. J. Ophthalmol.*, 87, 409-410.
4. Behrens-Braumann, W. (1999). Mycosis of the eye and its adnexa. *Dev. Ophthalmol.*, 32, 1-201.
5. Bennett, J.E. (1998). Aspergilose. In: Fauci, A.S.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J.; Martin, W. J. B.; Kasper, D.L.; Hauser, S.L.; et al. *Medicina Interna*. 14^a ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill Interamericana do Brasil, 1238-1239.
6. Bhermi, G.; Gillespie, I.; Mathalone, B. (2000). *Scedosporium* (*Pseudallescheria*) fungal infection of a sponge explant. *Eye*, 14, 247-249.
7. Brar, G.S.; Ram, J.; Kaushik, S.; Chakraborti, A.; Dogra, M.R.A. (2002). *Aspergillus niger* endophthalmitis after cataract surgery. *J. Cataract. Refract. Surg.*, 28(10), 1882-1883.
8. Brasnu, E.; Bourcier, T.; Dupas, B.; Degorge, S.; Rodallec, T.; Laroche, L.; Borderie, V.; Baudouin, C. (2007). In vivo confocal microscopy in fungal keratitis. *Br. J. Ophthalmol.*, 91(5), 588-591.

9. Feman, S.S.; Nichols, J.C.; Chung, S.M.; Theobald, T.A. (2002). Endophthalmitis in patients with disseminated fungal disease. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 100, 67-70.
10. Foster, C.S. (1992). Fungal keratitis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 6, 851-857.
11. Hedayati, M.T.; Pasqualotto, A.C.; Warn, P.A.; Bowyer, P.; Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. 153(6), 1677-1692.
12. Klich, M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Louisiana: Centraalbureau voor Schimmelcultuur Utrecht/ The Netherlands, 116p.
13. Klotz, S.A.; Penn, C.C.; Gerald, J.; Negvesky; Butrus, S.I. (2000). Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13(4), 662-685.
14. Latgé, J. P. (2003). *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. *Mycologist*, 17, 56-61.
15. Maidana, E.; González, R.; Melo Júnior, L.A.; Souza, L.B. (2005). Infectious keratitis in children: an epidemiological and microbiological study in a university hospital in Asunción – Paraguay. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 68(6), 828-832.
16. Prashant, B.; Mark, D.; Marios, C.; Islan, F.A.; Taylor, H.R. (2007). Fungal keratitis in Melbourne. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, 35, 124-130.
17. Rosa, R.H.; Miller, D.; Alfonso, E.C. (1994). The changing spectrum of fungal keratitis in South Florida. *Ophthalmology*, 101, 1005-1013.
18. Sehgal, S.C.; Dhawan, S.; Chhiber, S.; et al. (1981). Frequency and significance of fungal isolations from conjunctival sac and their role in ocular infections. *Mycopathologia*, 73, 17-19.
19. Sicília, M.J.L.; Lacomba, M.S.; Cuesta, F.S.; Pedraza, R.S.; Gómez, T.N.; Román, M.C. (2003). *Scedosporium apiospermum* keratitis. *Rev. Iberoam. Micol.*, 20, 68-70.
20. Surg Sridhar, M.S.; Garg, P.; Bausal, A.K.; Sharma, S. (2000). Fungal keratitis after laser *in situ* keratomileusis. *J. Cataract. Refract.*, 26, 613-615.
21. Suzuki, T.; Hori, N.; Miyake, T.; Hori, Y.; Mochizuki, K. (2007). Keratitis caused by a rare fungus, *Malassezia restricta*. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 51, 292-294.
22. Thomas, P. (1994). Mycotic keratitis - an underestimated mycosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, 32, 235-256.

**APÊNDICE C - CERATITE FÚNGICA E FATORES DE RISCO EM PACIENTES
IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES**

ARTIGO SUBMETIDO

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

SÃO PAULO SP - BRASIL

CERATITE FÚNGICA E FATORES DE RISCO EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES

¹Elvislene Camelo Soares Leite, ²Graziela Luna, ³Carlos Teixeira Brandt, ⁴Maria de Fátima Gayoso, ¹Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, ¹Rejane Pereira Neves*.

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil. ²Fundação Altino Ventura, Rua da Soledade, 170-Boa Vista, 50070-040 Recife, PE, Brasil; ³Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil; ⁴Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

***Corresponding author:** rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

FUNGAL KERATITIS AND RISK FACTORS IN IMMUNOCOMPROMISED AND IMMUNOCOMPETENT PATIENTS

ABSTRACT

Fungal keratitis is an important ophthalmologic problem. Clinical manifestations and visual prognosis of this mycosis depend on the type of fungus, and thus the procedures for detecting and identifying fungal pathogens rapidly is important. The aim of this research was to determine the aethiological agents and predisposing factors in patients with suspect of fungal keratitis. Diagnosis was established by direct microscopic examination of Gram and Giemsa-stained smear and cultures in different media (sheep blood agar, Sabouraud glucose agar supplemented with chloramphenicol, and into brain heart infusion broth) of corneal scrapings incubated at 28°C and 37°C. Twenty patients (75%) were male. The average was 46.5 years (range 23-70 years). Ocular trauma was the principal predisposing factor (81.25%) and *Fusarium solani* was the most commonly isolated species, followed by *Aspergillus fumigatus*. To develop a strategy for diagnosis, treatment, and prevention of fungal keratitis it is imperative to know the pathogenic organisms responsible and to identify risk factors.

Key words: Fungal keratitis, risk factors, clinical manifestation, diagnosis.

CERATITE FÚNGICA E FATORES DE RISCO EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES

RESUMO

Ceratite fúngica é um importante problema oftalmológico. As manifestações clínicas e o prognóstico visual desta micose dependem do tipo de fungo, sendo assim os procedimentos para detecção rápida e identificação dos patógenos fúngicos são imprescindíveis. Os objetivos desta pesquisa foram determinar os agentes etiológicos e fatores predisponentes em pacientes com suspeita de ceratite fúngica. O diagnóstico dos raspados de córnea foi estabelecido através do exame microscópico direto por coloração de Gram e Giemsa, além de obtenção de culturas em diferentes meios (ágar sangue de carneiro, ágar Sabouraud dextrose adicionado de cloranfenicol e Infusão de cérebro coração) incubados a 28°C e 37°C. Doze pacientes (75%) eram homens. A idade média foi de 46,5 anos (variando entre 23-70 anos). Trauma ocular foi o principal fator predisponente (81,25%) e *Fusarium solani* foi a espécie mais comumente isolada, seguida por *Aspergillus fumigatus*. Para desenvolver uma estratégia de diagnóstico, tratamento e prevenção de ceratite fúngica é essencial conhecer os organismos patogênicos responsáveis e identificar os fatores de risco.

Palavras-chave: Ceratite fúngica, fatores de risco, manifestação clínica, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Ceratite fúngica é um importante problema oftalmológico causando deficiência visual. Durante as últimas quatro décadas tem aumentado os relatos dessa infecção em diferentes partes do mundo (16,19). Alguns fatores são responsáveis por essa micose como, uso disseminado de antibióticos e esteróides de largo espectro, uso freqüente e prolongado de lentes de contacto, bem como o crescente número de cirurgias de córnea sendo realizadas. Em hospedeiros imunocompetentes, a micose ocorre após trauma ou cirurgias. Em nosso país o clima tropical em conjunto com a população primariamente agrária são fatores predisponentes adicionais (10, 12).

Os agentes etiológicos de ceratite micótica evidenciam padrão variável em relação à localização geográfica e condições climáticas. Espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* têm sido citados como agentes predominantes de ceratite micótica com muitos relatos mundiais. Embora diagnóstico presuntivo possa ser realizado através exame direto de raspados de córnea, culturas fúngicas de espécimes são necessárias com o objetivo de uma terapia efetiva (16).

As manifestações clínicas e prognóstico visual de ceratite fúngica dependem do tipo de fungo, e assim o desenvolvimento de procedimentos para detecção e identificação rápida do patógeno é imprescindível (15).

Os objetivos desse estudo foram determinar os agentes etiológicos e fatores predisponentes em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes com suspeita de ceratite fúngica.

PACIENTES E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre outubro de 2006 a outubro de 2007, com 80 pacientes atendidos na Unidade de Emergência da Fundação Altino Ventura e Hospital das Clínicas (Universidade Federal de Pernambuco-Brasil) apresentando lesão de córnea com suspeita de ceratite fúngica (Figura 1). Raspados de córnea foram obtidos assepticamente de cada caso da região central e margem da úlcera, usando espátula de Kimura esterilizada. As amostras de raspado de córnea foram examinadas microscopicamente em esfregaços corados com Gram e Giemsa e semeadas em ágar sangue de carneiro, ágar Sabouraud dextrose suplementados com cloranfenicol e caldo de infusão de cérebro e coração, incubadas a 28°C e 37°C e examinadas diariamente durante dez dias (8).

Os agentes etiológicos foram identificados de acordo com Barnett et al. (1), De Hoog et al. (4), Leslie e Summerell (9), Rapper e Fennel (11).

RESULTADOS

Ceratite fúngica foi diagnosticada em 16 (20%) do total de 80 pacientes estudados, desses os mais comumente acometidos eram homens com 75% dos casos de ceratite e as mulheres com 25%. A maioria dos casos de ceratite foi relatada em pacientes com idade entre 23 a 70 anos. Os principais fatores predisponentes identificados neste estudo foram trauma (81,25%), lagofalmo (6,25%) e condições sistêmicas como imunossupressão incluindo diabetes mellitus (6,25%) e hanseníase (6,25%). Foram isoladas de raspados de córnea um total de 14 fungos filamentosos e duas leveduras.

Dos 16 (20%) pacientes, o exame direto de esfregaços de raspados da córnea corados com Gram e Giemsa revelou a presença de estruturas fúngicas (Figura 1) com obtenção de fungos em culturas. Dos casos de trauma foram isolados *Aspergillus fumigatus* (1), *F. dimerum* (1), *F. oxysporum* (1), *F. solani* (4), *Microdochium nivale* (1), *Mycelia sterilia* (3), *Penicillium commune* (1) e *Trichoderma longibrachiatum* (1). De doença ocular (lagofalmo), diabetes mellitus e de hanseníase *F. solani* (1) *C. albicans* (1) e *Trichosporon cutaneum* (1) respectivamente. Quando diagnosticado ceratite por fungos filamentosos e leveduras foi realizado após oito dias, nova avaliação dos raspados de córnea.

Antifúngicos foram prescritos nos casos em que os esfregaços revelaram a presença de estruturas fúngicas. Atualmente, nenhuma droga antimicótica é ideal (não tóxica, fungicida com boa penetração na córnea), assim, a escolha é freqüentemente baseada na resposta clínica. Os protocolos de tratamento com natamicina a 5% tópica (pimaricina) e anfotericina

B a 0,5% foi similar aos usados pela maioria dos pesquisadores (12,16). Antifúngico oral foi usado de acordo com o tratamento estabelecido (17,19). Em 6,25% dos pacientes o agente antifúngico foi eficaz com melhora da lesão de córnea, no entanto na maioria dos casos a condição do olho piorou com aumento do infiltrado da córnea e hipópio. Nesses pacientes, foi realizado exame biomicroscópico que revelou leucoma central e baixa acuidade visual, sendo indicado transplante de córnea.

DISCUSSÃO

Ceratite fúngica é considerada uma doença devastadora que é responsável pela perda da córnea, e a segunda causa de cegueira em país em desenvolvimento (7,10). Em geral, essa micose é mais comum nos homens que em mulheres. Isto provavelmente é porque os homens estão mais associados com extensa atividade ao ar livre, o que implica uma maior exposição a corpos estranhos (2). No entanto, Tanure et al. (16) relataram que homens e mulheres da América do Norte são igualmente afetados.

Outros relatos também afirmam que trauma é o fator comum no espectro da ceratite fúngica (5,16). Outros fatores de riscos são diabetes mellitus (5,12) e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (16). No presente estudo identificamos apenas um paciente com diabetes mellitus e um com hanseníase.

Em nosso trabalho, fungos filamentosos foram os principais agentes de ceratite antecedido por trauma. De acordo com Chowdhary et al. (3), ceratite infecciosa geralmente ocorre em paciente com córnea lesionada e com as defesas imunes comprometidas. Nossos dois casos de ceratite por *Candida albicans* e *Trichosporon cutaneum* ocorreram em córnea de imunocomprometidos (diabetes mellitus e hanseníase). Dois casos de infecção pós-operatória por *Trichosporon cutaneum* foi descrita por Sheikh et al. (13) em degeneração ocular levando a perda da visão em um olho e enucleação do outro.

Em outros países em desenvolvimento as espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* têm sido os fungos mais isolados (18, 20). Similarmente nos países desenvolvidos como Estados Unidos e Grã-Bretanha as espécies de *Candida* são mais isoladas nos casos de ceratites fúngicas (6,16).

As manifestações clínicas das ceratites fúngicas dependem do tipo de fungo. As ceratites por *Candida* geralmente manifestam-se com bordas regulares, enquanto as causadas por fungos filamentosos, como *Fusarium* sp e *Aspergillus* sp, mostram úlceras com bordar irregulares, infiltração e hipópio (3), como nos nossos casos. De acordo com De Hoog (4) a espécie mais comum de infecção ocular é *F. solani*, entretanto, outras espécies como *F. dimerium*, *F. oxysporum*, *F. sacchari* e *F. verticillioides* são raramente envolvidos.

Interessantemente, nós descrevemos *F. dimerium* e *F. oxysporum* como agentes de infecção ocular.

Foi isolado também em três dos nossos casos *Mycelia sterilia*, o qual é citado por Sun et al. (14) em pacientes Chineses apresentando esta micose. Em três dos nossos casos *Microdochium nivale*, *P. commune* e *T. longibrachiatum* foram encontrados sendo o primeiro relato em infecção ocular.

Exame microscópico direto de esfregaço corado com Gram e Giemsa representa rápido, confiável e de baixo custo para o diagnóstico, bem como apresenta alta sensibilidade, facilitando terapia antifúngica precoce, antes do resultado da cultura (3).

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado Pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Barnett, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. (2000). Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Behrens-Braumann, W. (1999). Mycosis of the eye and its adnexa. *Dev. Ophthalmol.*, 32, 1-201.
3. Chowdhary, A.; Singh, K. (2005). Spectrum of fungal keratitis in North India. *Cornea*, 24, 8-15.
4. De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Fene, J.; Figueras, M.J. (2000). Atlas of Clinical Fungi. 2ªed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands
5. Gopinathan, U. ; Garg, P. ; Fernandes, M. ; et al. (2002). The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care centre in South India. *Cornea*, 21, 555-559.
6. Griffiths, M.F.P.; Clayton, Y.M.; Dart, J.K.G. (1994). Antifungal sensitivity testing of keratitis isolates at Moorfields Eye Hospital 1975-1990: therapeutic implications. In: Bialasiewicz AA, Schaal KP, eds. *Infect. Dis. Eye*. Boston: Butterworth Heinemann, 90-194.
7. Kunitomo, D.Y.; Sharma, S.; Garg, P. et al. (2000). Corneal ulceration in the elderly in Hyderabad, South India. *Br. J. Ophthalmol.*, 84, 54-59.
8. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Vaccari, E.M.H.; Melo, N.T. *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier, São Paulo, 2002, 1104 p.

9. Leslie, J. F.; Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Sydney: Blackwell Publishing, 388.
10. Panda, A.; Sharma, N.; Das G.; et al. (1997). Mycotic keratitis in children: epidemiological and microbiological evaluation. *Cornea*, 16, 295-299.
11. Rapper, K.B.; Fennel, D.I. (1977). *The genus Aspergillus*. Publishing Company Malabar, Florida, 686p.
12. Rosa, R.H.; Miller, D.; Alfonso, E.C. (1994). The changing spectrum of fungal keratitis in South Florida. *Ophthalmology*, 101, 1005-1012.
13. Sheikh, A.H.; Mahgoub, S.; Badi, K. (1974). Postoperative endophthalmitis due to *Trichosporon cutaneum*. *Brit. J. Ophthalmol.*, 58, 591.
14. Sun, X.G.; Zhang, Y.; Li, R.; Wang, Z.Q.; Luo, S.Y.; Jin, X.Y.; Zhang, W.H. (2004). Ethiological analysis on ocular fungal infection in the period of 1989-2000. *Chin. Med. J.*, 117(4), 598-600.
15. Suzuki, T.; Hori, N.; Miyake, T.; Hori, Y.; Mochizuki, K. (2007). Keratitis caused by a rare fungus, *Malassezia restricta*. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 51, 292-294.
16. Tanure, M.A.; Cohen, E.J. ; Sudesh, S. et al. (2000). Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania. *Cornea*, 19, 307-312.
17. Thomas, P.A.; Kalavathy, C.M.; Abraham, D.J.; et al. (1987). Oral ketoconazole in keratomycosis. *Ind. J. Ophthalmol.*, 35, 197-203.
18. Upadhyay, M.P.; Karmacharya, P.C.D.; Koirala, S.; et al. (1991). Epidemiological characteristics, predisposing factors and etiologic diagnosis of corneal ulceration in Nepal. *Am. J. Ophthalmol.*, 111, 92-97.
19. Williamson, J.; Gordon, A.M.; Wood, R.; et al. (1968). Fungal flora of the conjunctival sac in health and disease. *Br. J. Ophthalmol.*, 52, 127-137.
20. Xie, L.; Dong, X.; Shi, W. (2001). Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty. *Br. J. Ophthalmol.*, 85, 1070-1074.

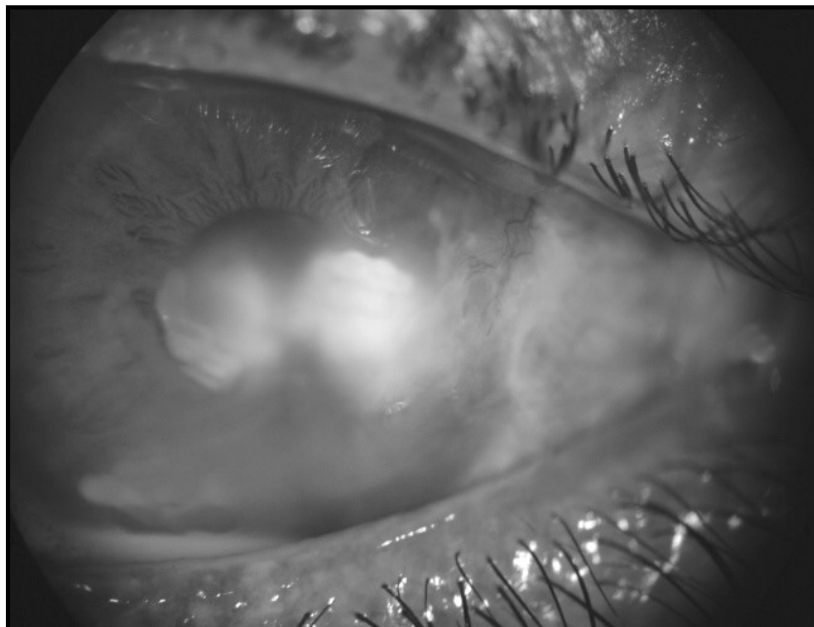


Figure 1. Lesão da Córnea com intensa ulceração central e abscesso mostrando margem indistinta, envolvendo a zona paracentral da córnea, edema estromal e discreto hipópio.

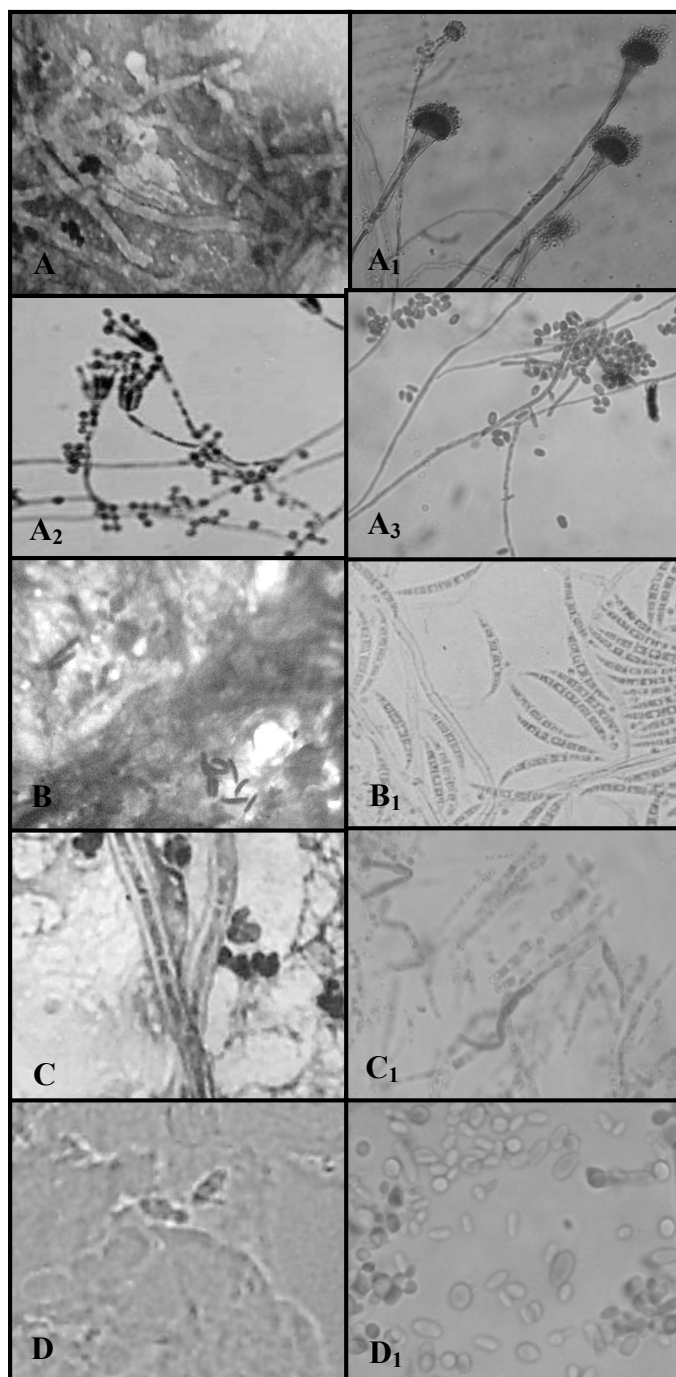


Figura 2. Raspado de córnea corado com Giemsa mostrando hifa hialina (A), conídios (B), hifa artrosporada (C), células de leveduras (D). Aumento X 1000. Respectivamente, estruturas microscópicas de *Aspergillus fumigatus* (A₁), *Penicillium commune* (A₂), *Trichoderma longibrachiatum* (A₃), *Fusarium oxysporum* (B₁), *Trichosporon cutaneum*. (C₁), *Candida albicans* (D₁). Aumento X 400.

**APÊNDICE D - ADERÊNCIA *IN VITRO* DE FUNGOS FILAMENTOSOS E
LEVEDURAS EM INFECÇÕES DE CÓRNEA**

ARTIGO A SER SUBMETIDO

JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS

NETHERLANDS

**ADERÊNCIA *IN VITRO* DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS EM
INFECÇÕES DE Córnea**

Elvislene Camelo Soares Leite, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, *Rejane Pereira Neves.

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

* **Autor correspondente:** rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

ADERÊNCIA *IN VITRO* DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS EM INFECÇÕES DE CÓRNEA

RESUMO

Várias espécies de fungos são relatadas por infectar a córnea humana. O agente etiológico mais comum desta micose é *Fusarium* seguido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e leveduras. Os mecanismos de aderência dos fungos são múltiplos e não têm sido definidos precisamente. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade de fungos isolados em casos infecções de córnea em se aderir às células epiteliais bucais humanas. A adesão às células foi realizada utilizando-se tampão PBS para suspensão das células epiteliais bucais e fúngicas. A capacidade máxima de aderências às células bucais foi evidenciada por *A.fumigatus*, *C. albicans*, *F. solani*, *P. comune*; fraca aderência *F. dimerum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichosporon cutaneum* e sem aderência *F. oxysporum* e *Microdochium nivale*. Pesquisas sobre a patogenicidade de fungos isolados de infecções oculares contribuem para prevenir, tratar adequadamente e controlar a disseminação da doença.

Palavras-chave: Aderência, infecção de córnea, fungos filamentosos, leveduras.

1. INTRODUÇÃO

A hidrofobicidade da superfície celular parece contribuir durante as etapas iniciais da aderência, devido às forças atrativas e desempenham um papel importante na adesão de células fúngicas às células do hospedeiro (Blanco et al., 2006).

Durante os últimos anos, vários grupos têm focado suas pesquisas na identificação dos fatores de parede celular associados a patogenicidade das espécies de fungos. Todavia a parede celular localizada na interface entre o fungo e as células do hospedeiro, contribui de forma significativa no estabelecimento da infecção (Jahn et al., 1997). Da mesma forma, existem evidências de que a aderência de conídios a tecidos danificados é mediada por interações específicas de fungos com alguns componentes da matriz extracelular, por exemplo, colágenos tipo I e tipo IV, fibrinogênio, fibronectina e laminina da membrana basal (Tronchin et al., 2002).

Os mecanismos usados por espécies de *Candida* para adesão são múltiplos e não têm sido definidos precisamente (Blanco et al., 2006).

Várias espécies de fungos são relatadas por infectar a córnea humana, e mais de trinta gêneros de fungos estão envolvidos nas infecções fúngicas oculares. Aderência, germinação, produção de enzimas e morfogênese podem contribuir para a virulência destes agentes etiológicos (Behrens-Braumann, 1999; Sudbery et al., 2004).

Fungos filamentosos são causas freqüentes de ceratomicoses em humanos, potencialmente capazes de produzir doença ocular com cegueira, particularmente em países em desenvolvimento (Brasnu et al., 2007; Prashant et al., 2007).

O agente etiológico mais comum de úlcera fúngica de córnea é *Fusarium* seguido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (Thomas, 1994). Usualmente sapróbio, *Aspergillus fumigatus* cresce e esporula em ambientes úmidos com matéria orgânica em decomposição, com conídios altamente dispersíveis. Com o desenvolvimento dos transplantes de órgãos e medula óssea, este fungo tem se tornado um importante patógeno hospitalar (McWhinney et al., 2003).

O propósito deste trabalho foi avaliar a capacidade de aderência de espécies fúngicas às células epiteliais isoladas de raspados de córnea.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes foram coletados através da raspagem da margem dos abscessos e úlceras de córneas, utilizando-se espátula Kimura esterilizada por chama, os quais foram submetidos à análise micológica. O exame direto das amostras clínicas foi realizado através da coloração

de Gram e Giemsa. As culturas foram preparadas usando ágar sangue, infusão de cérebro coração (BHI) e Sabouraud dextrose ágar adicionado de cloranfenicol (Difco Laboratories) incubadas a 30°C e 35°C em uma atmosfera aeróbica. Após cinco dias, numerosas colônias pequenas apareceram nas culturas em placas de Petri das amostras clínicas.

Subculturas foram preparadas e as colônias puras foram transferidas para a superfície de meios específicos para identificação baseada nas características macroscópicas, microscópicas e quando necessário, fisiológicas (Barnett et al., 2000; De Hoog et al., 2000; Leslie e Summerell, 2006; Rapper e Fennel, 1977). Infecções fúngicas de córnea foram consideradas positivas se o crescimento dos fungos estiver corroborado pela microscopia direta positiva.

Culturas fúngicas, obtidas de pacientes com infecções de córnea atendidos em um serviço público de referência em saúde do Recife, Brasil, foram crescidos em Sabouraud dextrose ágar por 24h à 72h a 25°C e a 37°C. A aderência de fungos filamentosos e leveduras às células epiteliais bucais (CEB), foi realizada utilizando-se o método de Kimura e Pearsall modificado como descrito por Ellepola e Samanarayake (1998). CEB foram obtidas através de *swab* da boca de um indivíduo saudável. As células foram lavadas três vezes por centrifugação em solução tampão salina fosfato (PBS) (pH 7.4, 0.1M), resuspensas e ajustadas a uma concentração de 2×10^5 células epiteliais bucais/mL. A aderência entre CEB e as células fúngicas foi testada através da adição de 50µL de suspensão a 1% de células de levedura ou conídios nos poços de placas de titulação. As placas foram então submetidas à mistura por 2 min (selecionados como tempo de interação ótimo no teste preliminar), e depois observadas para verificar agregação visível. Controles negativos dos poços contendo 50µL de CEB com 50µL de PBS e 50µL de suspensão de células de leveduras ou conídios com 50µL PBS foram realizados em cada placa de microtitulação. O teste para cada isolado foi repetido três vezes. Os resultados foram avaliados cegamente por vários leitores.

O sistema de graduação que segue foi utilizado para determinar os seguintes resultados: (M) máxima agregação visualizada; aderindo entre 50% a 100% da área superficial; (w) agregação fraca ou difusa, por aderir até 50%; (n) aderência não visualizada.

Para observar a aderência microscopicamente, uma gota do corante azul de metileno foi colocada em lâmina limpa, coberta por uma lamínula e observada microscopicamente com objetiva de 40x. Cada lamina tinha 100 células epiteliais e foi avaliada de acordo com a porcentagem da área superficial aderida por conídios e células de leveduras. A aderência as CEB foi fotograficamente registrada.

3. RESULTADOS

O exame direto de esfregaços dos raspados de córnea usando as colorações de Giemsa e Gram revelou estruturas fúngicas abundantes. Os agentes etiológicos cresceram em todos os meios e em ambas as condições de temperatura dentro de cinco dias. As espécies fúngicas foram subseqüentemente identificadas como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium dimerum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Microdochium nivale*, *Penicillium commune*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichosporon cutaneum* (Tabela 1).

A figura 1 ilustra a capacidade máxima de aderências as CEB por *Aspergillus fumigatus* (A), *Candida albicans* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium comune* (D); fraca aderência por *F. dimerum* (E), *Trichoderma longibrachiatum* (F), *Trichosporon cutaneum* (G) e sem aderência por *F. oxysporum* e *Microdochium nivale* (H).

A principal diferença no grau de aderência as CEB foi interespecífica, entre *F. solani* e as demais espécies (Tabela 1).

4. DISCUSSÃO

Aderência fúngica é inicialmente afetada por combinação de interação hidrofóbica e eletrostática e a capacidade de aderência depende de vários fatores, como o estado hidrofóbico da parede celular fúngica (Blanco et al., 1997; Jabra-Rizk et al., 2001), as características da superfície do substrato (Imbert et al., 2002), e as condições do método empregado (Sullivan et al., 2004). Nossos resultados confirmam que a adesão as CEB pode ocorrer tanto por leveduras quanto por fungos filamentosos apresentando variados graus de aderência.

Dos agentes etiológicos responsáveis pela infecção de córnea dos nossos pacientes, *Microdochium nivale*, *Penicillium commune* e *Trichoderma longibrachiatum* são citados pela primeira vez em lesão ocular e testados quanto à capacidade de aderência, só há relatos com *C. albicans*. Esta é um comensal da microbiota do olho e outras espécies são mais comumente adquiridas após trauma de córnea, cirurgia, hospitalização e imunossupressão (Thomas, 2003; Wu et al., 2003).

Nas infecções, a aderência e produção de enzimas contribuem para virulência de leveduras, porém a formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro conduzem a patogenicidade (Sudbery, 2004).

A espécie mais comum em casos de infecção ocular é *F. solani* (De Hoog et al., 2000), contudo *F. dimerum* e *F. oxysporum* estão mais raramente envolvidas em infecção ocular (Guarro and Gené, 1995). Tem sido sugerido que a razão para definir a virulência de *Fusarium* em infecções da córnea não está relacionada com a capacidade de aderência deste gênero, mas a produção de substâncias contribui na penetração e toxinas que auxiliam para o desenvolvimento das lesões (Kuriakose e Thomas, 1991).

Resultados contraditórios têm sido encontrados com aderência as CEB e hidrofobicidade da superfície celular. Alguns autores consideram que hidrofobicidade celular quando comparadas às células hidrofílicas são mais aderentes às células bucais (Jabra-Rizk et al., 2001), entretanto, McCarron et al. (2004) encontraram uma relação inversa entre a hidrofobicidade da superfície celular e a aderência. Samaranayake et al. (2003), demonstraram uma correlação positiva em um único isotipo, contudo, nenhuma correlação significativa foi observada quando isolados de *Candida* foram testados conjuntamente e avaliados como um grupo. Nossos resultados mostram que a hidrofobicidade não interferiu na aderência as CEB, visto que, leveduras (hidrofóbicas) e espécies filamentosas (menos hidrofóbicas) mostraram máxima aderência.

Nós definimos as condições do estudo *in vitro* reprodutíveis, mas torna-se importantes estudos utilizando um número maior de isolados e condições *in vivo*.

Em conclusão, esse estudo demonstra que *A. fumigatus*, *C. albicans*, *F. solani* e *P. comune*, tiveram alta capacidade de se adaptarem às condições ambientais.

Pesquisas relacionadas com a patogenicidade de infecções fúngicas oculares são necessárias para desenvolver abordagens inovadoras na prevenção e controle da doença.

REFERÊNCIAS

- Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D., 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge.
- Behrens-Braumann, W., 1999. Mycosis of the eye and its adnexa. Dev. Ophthalmol. 32, 1-201.
- Blanco, M.T., Morales, J.J., Lucio, L., Pérez-Giraldo, C., Hurtado, C., Gómez-García, A.C., 2006. Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. Oral Microbiol. Immunol. 21, 69-72.
- Blanco, M.T., Blanco, J., Sánchez-Benito, R., Perez-Giraldo, C., Moran, F.J., Hurtado, C., et al., 1997. Incubation temperatures affect adherence to plastic of *Candida albicans* by changing the cellular surface hydrophobicity. Microbios 89, 23-28.
- Brasnu, E., Bourcier, T., Dupas, B., Degorge, S., Rodallec, T., Laroche, L., Borderie, V., Baudouin, C., 2007. *In vivo* confocal microscopy in fungal keratitis. Br. J. Ophthalmol. 91(5), 588-591.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2^{ed}. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands.
- Ellepola, A.N., Samaranayake, L.P., 1998. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. Arch. Oral Biol. 43, 879-887.
- Guarro, J., Gené, J., 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14, 741-754.
- Imbert, C., Rodier, M.H., Daniaul, G., Jacquemin, J.L., 2002. Influence of sub-inhibitory concentrations of conventional antifungals on metabolism of *Candida albicans* and on its adherence to polystyrene and extracellular matrix proteins. Med. Mycol. 40, 123-129.
- Jabra-Rizk, M.A., Falkler, W.A., Merz, W.G., Baqui, A.A., Kelley, J.I., Meiller, T.F., 2001. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. Rev. Iberoam. Micol. 18, 17-22.
- Jackson, B.E., Wilhelmus, K.R., Mitchell, B.M., 2007. Genetically regulated filamentation contributes to *Candida albicans* virulence during corneal infection. Microb. Pathog. 42, 88-93.

- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S., Brakhage, A., 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* 65, 5110-5117.
- Kuriakose, T., Thomas, P.A., 1991. Keratomycotic malignant glaucoma. *Indian J. Ophthalmol.* 39, 118-121.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Sydney: Blackwell Publishing, pp. 388.
- McCarron, P.A., Donnelly, R.F., Canning, P.E., McGovern, J.G., Jones, D.S., 2004. Bioadhesive, nondrug-loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidosis. *Biomaterials* 25, 2399-2407.
- McWhinney, P.H., Kibbler, C.C., Hamon, M.D., Smith, O.P., Gandhi, L.L., Berger, A., Walesby, R.K., Hoffbrand, A.V., Prentice, H.G., 1993. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years experience. *Clin. Infect. Dis.* 17, 397-404.
- Prashant, B., Mark, D., Marios, C., Islan, F.A., Taylor, H.R., 2007. Fungal keratitis in Melbourne. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 35, 124-130.
- Rapper, K.B., Fennel, D.I., 1977. The genus *Aspergillus*. Publishing Company Malabar, Florida, pp. 686.
- Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P., Yau, J.Y., Ellepola, A.N., Anil, S., Yeung, K.W., 2003. Adhesion and cell-surface-hydrophobicity of sequentially isolated genetic isotypes of *Candida albicans* in an HIV-infected Southern Chinese cohort. *Mycoses* 46, 375-383.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J., 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12, 317-324.
- Sullivan, D.J., Moran, G.P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C., et al., 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 4, 369-376.
- Thomas, P., 1994. Mycotic keratitis - an underestimated mycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 32, 235-256.
- Thomas, P.A., 2003. Fungal infections of the cornea. *Eye* 17, 852-862.
- Tronchin, G., Esnault, K., Sanchez, M., Larcher, G., Marot-Leblond, A., Bouchara, J.P., 2002. Purification and partial characterization of a 32-kilodalton sialic acid-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 70(12), 6891-6895.

Wu, T.G., Mitchell, B.M., Carothers, T.S., Coats, D.K., Brady-McCreery, K.M., Paysse, E.A., et al., 2003. Molecular analysis of the pediatric ocular surface for fungi. *Curr. Eye Res.* 26, 33-36.

Tabela 1. Aderência às células epiteliais bucais de fungos filamentosos e leveduras obtidas de raspados de córnea.

Número de Registro	Espécies de Fungos	Aderência
01	<i>Aspergillus fumigatus</i>	M
02	<i>A. fumigatus</i>	M
03	<i>Candida albicans</i>	M
04	<i>Fusarium dimerum</i>	w
05	<i>F. oxysporum</i>	n
06	<i>F. solani</i>	M
07	<i>F. solani</i>	M
08	<i>F. solani</i>	M
09	<i>F. solani</i>	M
10	<i>F. solani</i>	M
11	<i>Microdochium nivale</i>	n
12	<i>Penicillium comune</i>	M
13	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	w
14	<i>Trichosporon cutaneum</i>	w

M - máxima aderência, w – fraca aderência, n – sem aderência.

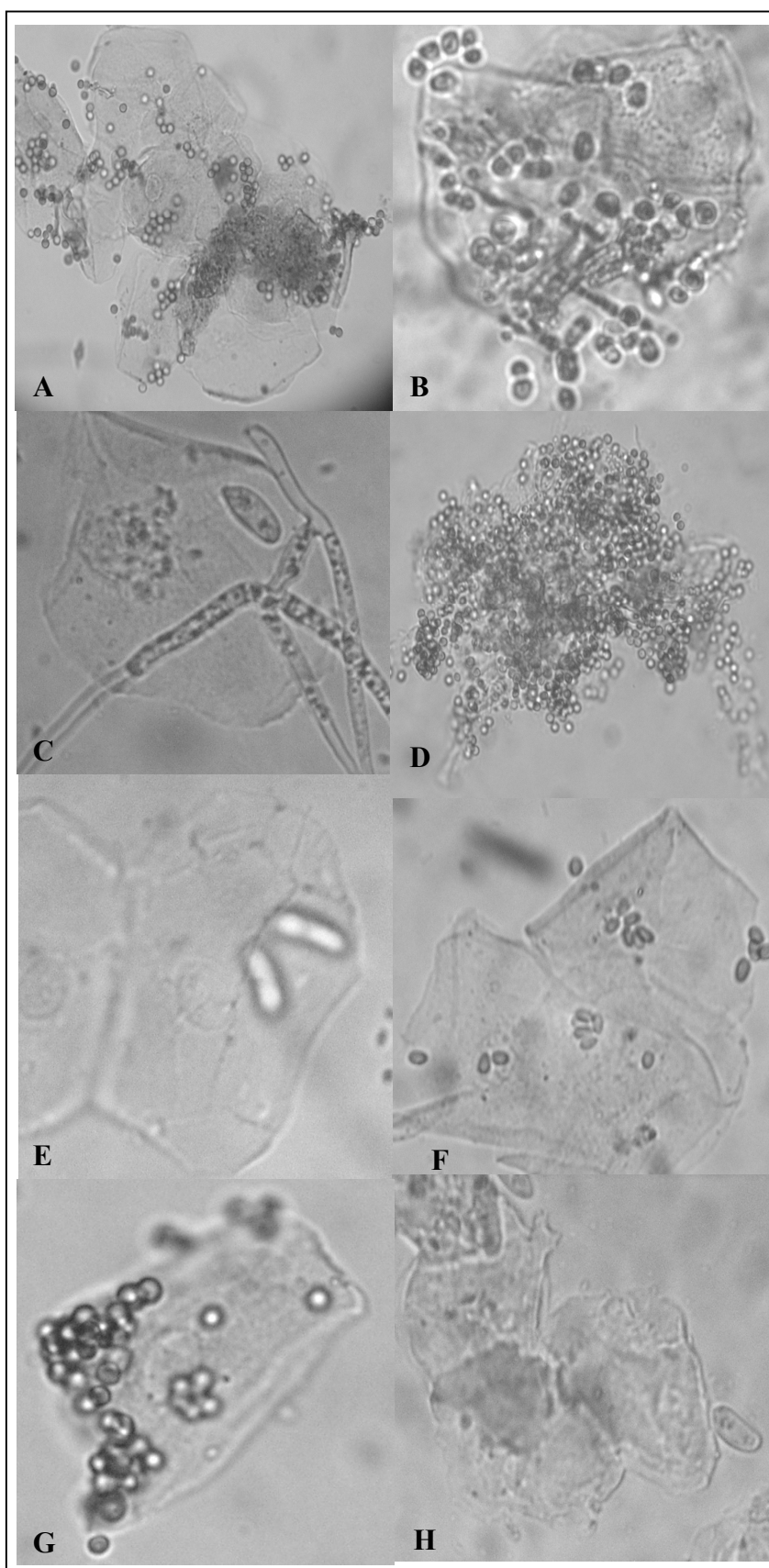


Figura 1. Aderência máxima às células epiteliais bucais por *Aspergillus fumigatus* (A), *Candida albicans* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium comune* (D); Fraca aderência por *F. dimerum* (E), *Trichoderma longibrachiatum* (F), *Trichosporon cutaneum* (G) e Sem aderência *F. oxysporum* (H).