

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

ELVISLENE CAMELO SOARES LEITE

**CERATITE INFECCIOSA, ENDOFTALMITE E AVALIAÇÃO DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME FÚNGICA E NOVAFORMULAÇÃO
ANTISÉPTICA PARA LENTES DE CONTATO**

Recife
2014

ELVISLENE CAMELO SOARES LEITE

**CERATITE INFECCIOSA, ENDOFTALMITE E AVALIAÇÃO DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME FÚNGICA E NOVA FORMULAÇÃO
ANTISÉPTICA PARA LENTES DE CONTATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos da Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE), como parte dos requisitos
para conclusão do curso de doutorado.

Orientação: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Co-orientação: Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leite, Elvislene Camelo Soares

Ceratite infecciosa, endoftalmite e avaliação da formação de biofilme fúngica e nova formulação antiséptica para lentes de contato / Recife: O Autor, 2014.

82 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Coorientador: Carlos Teixeira Brandt

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, Recife, 2014.

Inclui referências e apêndices

- 1. Micoses 2. Lentes de contato 3. I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Brandt, Carlos Teixeira (coorient.) III. Título**

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 630

ELVISLENE CAMELO SOARES LEITE

**CERATITE INFECCIOSA, ENDOFTALMITE E AVALIAÇÃO DA
FORMAÇÃO DE BIOFILME FÚNGICA E NOVAFORMULAÇÃO
ANTISÉPTICA PARA LENTES DE CONTATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de
Fungos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como parte
dos requisitos para obtenção do título de doutora. Área de
Concentração: Micologia Aplicada

Orientação: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Co-orientação: Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Aprovada em 25/02/2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a Rejane Pereira Neves (Orientadora) / UFPE

Dr. Nicodemos Teles de Pontes / UFPE

Dr^a Larissa Rolim / UFPE

Dr Reginaldo Gonçalves de Lima Neto / UFPE

Dr^a Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo / UFPE

Dr^a Cristina Maria de Souza-Motta / UFPE

Dr^a Ana Maria Rabelo Parahim/ UFPE

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.

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

Ao Prof. Armando Masrden por ter sido essencial no desenvolvimento dessa pesquisa,

Ao Prof. Reginaldo Gonçalves pela ajuda indispensável no desenvolvimento dessa pesquisa.

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 doutorado pelos momentos de aprendizagem, descontração e amizade.

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

A todos os professores do Departamento de Micologia.

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

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

RESUMO

A ceratite e a endoftalmite fúngicas, são clinicamente de caráter oportunista e multifatorial, podendo conduzir danos irreparáveis como perda da visão e do globo ocular. Assim esta pesquisa objetivou diagnosticar oculomicoses, avaliar os agentes etiológicos quanto à capacidade de formar biofilme em lentes de contato e testar três novas formulações como anti-biofilme. De Fevereiro/2011 a Maio/2012, pacientes atendidos em serviço oftalmológico de Recife-PE que apresentavam lesões sugestivas de micose, foram submetidos à coleta de raspados de córnea para diagnóstico micológico. As amostras foram coradas com Gram e Giemsa para exame direto e semeadas em ágar sangue bem como ágar Sabouraud e *BHI*. Foram diagnosticados 73 casos de oculomicoses através de exame direto, contudo o isolamento dos agentes ocorreu em 15(20,5%) casos. As espécies isoladas incluíram *Fusarium solani* 9(60%), *F. oxysporum* 4(26,6%), *Aspergillus fumigatus* 1(6,67%) e *A. parasiticus* 1(6,67%). O acometimento da micose ocorreu em ambos os sexos e variadas profissões, sem diferença significativa. O tratamento de escolha foi anfotericina B, com sucesso em 50% dos casos. Ceratoplastia penetrante foi realizada em 8(53,0%) casos, recobrimento conjuntival em 7(47,0%) e dois casos submetidos a evisceração. Todos os isolados formaram biofilme nas lentes, com destaque para uma formulação que promoveu a morte das células fúngicas após 24 horas de exposição. A capacidade de formar biofilmes por fungos conduz a quadros clínicos severos, tornando essencial o diagnóstico precoce além da busca por novas formulações anti-biofilmes.

Palavras-chaves: Oculomicose. Ceratite fúngica. Endoftalmite fúngica. Biofilme. Formulação Anti-biofilme.

ABSTRACT

Ocular mycosis, including infectious keratitis, are clinically apparent in opportunists and multifactorial situations. To identify the etiologic agents and evaluate epidemiological aspects of fungal keratitis in patients treated in emergency ophthalmological services, Recife-PE, in the period February 2011 to May 2012. We collected 73 corneal scrapings of patients with infectious keratitis and referred to the Medical Mycology Laboratory, Federal University of Pernambuco. They were fixed and colored by Gram and Giemsa methods, have been done the direct exam and sowed in means of cultures ágar blood, ágar Sabouraud and BHI (Brain-Heart-Infusion). Of the 73 patients with infectious keratitis, 15 (20.5%) were fungal. Of these, 09 (60%) were *Fusarium solani*, 04 (26.6%) *F. oxysporum*, 01 (6.67%), *Aspergillus fumigatus*, and 01 (6.67%) *A. parasiticus*. Of the cases positive for CF, 08 (53%) were male and 07 (47%) were female. With respect to labor activities, 06 were farmers, 05 were housewives, and 04 patients (16%) reported 01 cook, 01 salesman, 01 master works and 01 general service aid, trauma with vegetable matter. The average time of onset of symptoms and arrival at the service was 07 days, ranging from 01 to 30 days. A penetrating keratoplasty was performed in 08 (53.0%) cases, and conjunctival Coating was performed in 07 (47.0%) patients, two patients who underwent evisceration. The most frequent etiologic agent in our region was the *Fusarium solani*, being correlated with ocular trauma with vegetable matter in a portion of the population. Amphotericin B topical is effective, but half of the patients required penetrating keratoplasty and two were submitted to evisceration.

Keywords: Oculomycosis. Fungal keratitis. Fungal endophthalmitis. Biofilm. Anti-biofilm formulation.

SUMÁRIO

	Pág
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 CERATITE FÚNGICA	14
2.1.1 FATORES PREDISPOONENTES	14
2.1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS	16
2.1.3 ENDOFTALMITE	18
2.1.4 ENDOFTALMITE EXÓGENA	19
2.1.5 ENDOFTALMITE ENDOGENA	22
2.2 BIOFILME FÚNGICO	25
3. PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS	31
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE RASPADO DE CÓRNEA	31
3.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS	32
3.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME	32
3.4 DESINFECÇÃO DAS LENTES DE CONTATO	32
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 CERATITE FUNGICA	33
4.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME	36
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6. REFERÊNCIAS	40

APÊNDICE A. <i>Aspergillus parasiticus</i> endophthalmitis following eye evisceration.	54
APÊNDICE B. Fungal Endophthalmitis Due to <i>Aspergillus terreus</i> Following Cataract Surgery: A case report.	57
APÊNDICE C. Perfil da ceratite fúngica em serviço oftalmológico de referência em Pernambuco – Brasil.	64
APÊNDICE D. Efeito de soluções desinfetante sobre biofilmes associados a lentes de contato gelatinosas	75

1 INTRODUÇÃO

A infecção ocular é um problema oftalmológico mundialmente importante, sobretudo porque muitos casos podem progredir para infecção fulminante com possível perda de visão (Constantinou et al., 2009). Neste processo infeccioso, a ceratite e a endoftalmite são complicações graves que podem culminar com a ceratoplastia penetrante (Proença-Pina et al., 2010; Jacqueline et al., 2013).

As estruturas externas do olho são alvos constantes de infecção, as quais podem resultar em cirurgia ou evoluir à doença sistêmica. Entretanto, alguns fatores de risco são importantes para o desenvolvimento de infecção ocular como tracoma cicatricial e olho seco, ceratite herpética recorrente e defeito epitelial persistente no pós-operatório, medicações tópicas com corticóides, trauma, doenças sistêmicas ou drogas imunossupressoras (Taneja et al., 2013).

O uso de lentes de contatos oculares é outro fator de risco que contribui para infecção da córnea por micro-organismos, a qual pode torna-se severa. Os micro-organismos, destacando-se os fungos podem crescer no interior da matriz da lente conduzindo à erosão do epitélio pelo atrito destas contra a córnea, tanto pelo manuseio inadequado, quanto por reação tóxica a produtos utilizados na sua manutenção/higiene. O risco está presente nos usuários de lentes de contato refrativas, cosméticas e principalmente naqueles que fazem uso terapêutico ou apresentam defesas comprometidas, facilitando a instalação da infecção fúngica (Locatelli et al., 2004; Thomas; Kalliamurthy, 2013).

A ceratite e a endoftalmite micótica frequentemente é causada por fungos contaminantes que mediante variados fatores predisponentes tornam-se patógenos oportunistas, incluindo espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Candida*, entre outros (Badiie, 2013).

Infecções causadas por *Candida* em grande parte estão relacionadas com a formação de biofilme, os quais constituem crescimento microbiano cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistências a agentes antimicrobianos. As células que formam o biofilme apresentam características fenotípicas diferentes das células em suspensão, tais como aumento de resistência aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro (Seneviratne et al., 2009; Mukherjee et al., 2012).

O usuário de lentes pode permanecer saudável durante anos, contudo, a situação ocular pode se modificar a qualquer momento porque o olho, as lentes de contato e possíveis fatores

ambientais estão constantemente interagindo (Kara-José, 2005). Com a mudança das condições normais da superfície ocular, os fungos, com seus fatores de virulência, tornam-se mais resistentes às defesas naturais e aumentam sua capacidade infecciosa. Para que a infecção ocular se instale é necessário aderência, penetração, invasão, persistência e replicação do microrganismo, independentemente dos mecanismos de defesa existentes. Após a adesão à superfície do hospedeiro, inicia-se a formação de biofilme (Harding et al., 2009; Estivill et al., 2012).

As ceratites e endoftalmite podem alterar a integridade do olho e produzir significativa destruição tecidual, tornando-se dessa forma, indispensável o diagnóstico laboratorial micológico para evitar terapia inespecífica com possível perda de acuidade visual (Uesugui *et al.*, 2002). Nos últimos anos a oftalmologia tem passado por um extraordinário progresso, com a introdução de vários tipos de lentes oculares. As lentes têm tido participação efetiva nesta evolução, beneficiando na correção visual. Contudo, apesar dos inquestionáveis avanços, são frequentes as complicações, incluindo ceratites, endoftalmite e outras complicações graves da córnea (Oliveira *et al.*, 2004). A investigação quanto à formação de biofilme pelos agentes etiológicos é crucial, uma vez que, este servirá de nicho aos agentes patogênicos. Os cuidados de higienização e manutenção das lentes são indispensáveis para evitar a formação do biofilme fúngico sendo necessário o uso de desinfetantes apropriados para lentes (Souza *et al.*, 2008).

Contudo, estes nem sempre são eficazes em impedir colonização por fungos e principalmente remover estes microrganismos. Alternativas que visem testar novos desinfetantes são estratégias para minimizar as consequências indesejáveis aos usuários de lentes de contato.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 GERAL

Avaliar o envolvimento fúngico na ceratite infecciosa e endoftalmite, analisar a capacidade dos fungos na formação de biofilme e o efeito de soluções desinfetantes sobre lentes de contato.

1.1.2 ESPECÍFICOS

- Obter amostras clínicas de casos de ceratite e endoftalmite;

- Realizar exame direto das amostras clínicas;
- Identificar fungos isolados das amostras clínicas dos casos de ceratite e endoftalmite;
- Detectar a capacidade dos agentes etiológicos de ceratite e endoftalmite na formação de biofilme sobre lentes de contato;
- Analisar o efeito de soluções desinfetantes na viabilidade, morfologia e remoção de fungos presentes em biofilmes sobre lentes de contato.

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, e pode ser causada por uma ampla variedade de fungos. Diferentemente de outras micoses, não é uma patologia fatal, porém certamente é de extremo comprometimento visual e dificuldade terapêutica (Thomas; Kaliamurthy, 2013).

As principais manifestações clínicas observadas na ceratite fúngicas são espessamento do epitélio, infiltrado esbranquiçado ou branco-acinzentado, lesões finas ou granulares, de localização intra-epitelial ou estromal, a presença de uma placa endotelial e hipópio.

As micoses oculares como outras infecções fúngicas são comumente presentes em pacientes imunocomprometidos, porém, essas infecções também têm sido relatadas em pacientes imunocompetentes. Podendo ocorrer em qualquer idade e em qualquer gênero, porém o grupo mais suscetível são os homens com idade de 31 a 40 anos engajados na agricultura ou outro trabalho ao ar livre (Badiie, 2013).

2.1.1 FATORES PREDISPOONENTES

As ceratites infecciosas e dentre essas, em especial as ceratites fúngicas, têm assumido papel importante na oftalmologia pela crescente incidência. Atualmente, cerca de 30.000 novos casos por ano são reportados nos Estados Unidos da América (McLeod et al., 2004; Gajjar et al., 2013). Este fato pode ser atribuído ao desenvolvimento e ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro e de corticoides, uso de lentes de contato e aumento do número de cirurgias corneanas (Salera et al., 2002; Goldschmidt et al., 2012).

O uso tópico de esteroides está associado com o desenvolvimento e a piora de ceratite fúngica. A resposta imune associada à fagocitose tem papel importante na defesa antifúngica e os corticosteroides inibem esta função dos neutrófilos e macrófagos (Osamah et al., 2013).

Atualmente, a oftalmologia vem obtendo um rápido desenvolvimento no que se referem a novas tecnologias, técnicas e procedimentos, proporcionando aos pacientes um acesso cada vez maior aos benefícios que a medicina pode trazer a visão. Dentro deste contexto, um grande número de pessoas é submetido diariamente a cirurgias refrativas e a ceratite fúngica, embora rara, é uma complicação potencialmente grave, tendo sido relatada após *Photorefractive Keratectomy* (PRK) e *Laser In Situ Keratomileusis* (LASIK) (Kim et

al.,2013).

O trauma de córnea com material vegetal ou orgânico e até mesmo partículas de poeira é o fator predisponente mais comum de ceratite fúngica (Taneja et al.,2012). Os fungos geralmente não penetram na córnea íntegra, sendo necessária a ruptura do epitélio da córnea para que ocorra a penetração dos mesmos. Após a penetração através da membrana de Descemet, os fungos ganham acesso à câmara anterior ou segmento posterior e com a produção de enzimas proteolíticas e micotoxinas causam necrose tecidual (Badiee, 2013).

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). Apesar do tratamento intensivo, o infiltrado de córnea progrediu e a paciente foi submetida a um transplante penetrante terapêutico de córnea.

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 a *Laser In Situ Keratomileusis* (LASIK) para correção de miopia.

Guarro et al. (2002), relataram um caso de ceratite por *Sacopodium oculorum* em um garoto de 12 anos, após cinco meses de tratamento com corticoides. A infecção foi resolvida com natamicina e cetoconazol.

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

Höfling-Lima et al. (2005), 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

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.

Al – Yousuf (2009), estudou o perfil das ceratite microbianas com foco especial nos fatores de riscos, analisou os prontuários de 285 pacientes com ceratite no período de três anos entre janeiro de 2005 a janeiro de 2007. Os fatores de risco identificados foram uso de

lentes de contatos, trauma, olhos secos, blefarite, e cirurgia refrativa. Entre os fatores predisponentes estudados o uso de lentes de contatos foi o principal fator de risco para ceratite microbiana. Dormir com as lentes de contato é o principal fator de risco entre usuários de lentes de contato. Conscientizar o público, especialmente no cuidado com o uso das lentes de contato, pode ajudar a reduzir esta morbidade visual.

Bahadir et al. (2012), relataram um caso de infecção por espécie de *Candida* em uma paciente de 23 anos de idade, a qual apresentava depósitos assintomáticos branco-creme na interface do enxerto quatro semanas após cirurgia de ceratoplastia lamelar. O exame microbiológico revelou infecção por *Candida* sp. Os autores consideraram a ceratite por espécie de *Candida* uma infecção rara, observada após cirurgia de ceratoplastia lamelar anterior. Ainda afirmam que o quadro clínico assintomático e à semelhança de crescimento epitelial pode adiar o diagnóstico e consequentemente o tratamento. Em conclusão, os autores citam que diante de depósitos de interface visto após a cirurgia lamelar, deve-se considerar ceratite por *Candida* sp.

2.1.2 AGENTES ETIOLÓGICOS

Os gêneros de fungos mais frequentemente implicados como causas de ceratite micótica em todo o mundo incluem *Aspergillus*, *Candida*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium* (Sangwan et al., 2013). Além disso, outras espécies de fungos como *Scedosporium apiospermum* e *Paecilomyces* podem causar ceratite fúngica (Thomas, Kalliamurthy, 2013).

O agente etiológico de ceratite fúngica mais comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais é o *Fusarium* sp. Sendo *F. solani* e *F. oxysporum* as espécies mais importantes, embora outras espécies, incluindo *F. dimerum*, *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* tenha-se isolado (Troke et al. 2013).

Espécies de *Aspergillus* são relatadas com frequência como agentes etiológicos de ceratite fúngica, não só particularmente em países tropicais, mas também em climas temperados. As espécies *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. parasiticus*, tem sido relatados. (Manikandan et al., 2011; Gajjar et al. 2013; Baranyi et al., 2013).

As ceratites causadas por fungos leveduriformes são mais frequentemente encontradas em pacientes imunodeprimidos ou pacientes debilitados estando associado a patologias crônicas da córnea. *C. albicans* é a espécie mais comum associada à ceratite. No entanto, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* tem adquirida uma maior importância nos

últimos anos (Goldschmidt et al. 2012;).

No Centro Hospitalar Nacional de Oftalmologia (Paris), entre os anos de 1993 a 2001, foram relatados 19 casos de ceratite fúngica, dos quais 12 eram pacientes do gênero 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%). Os fungos *C. parapsilosis* e *C. albicans* foram os mais isolados (58%) seguidos por *Aspergillus* sp. (21%) e *Fusarium* sp. (21%) (Rondeal et al. 2002).

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 gênero masculino; os fatores predisponentes relatados no estudo foram: trauma ocular em mais da metade dos pacientes, sete foram submetidos à terapia com corticoides e dois usavam lentes de contato. Os fungos prevalentes foram *Fusarium* sp. seguido por *A. flavus*.

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 significativo 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.

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 frequentemente causadas por espécies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Curvularia* e *Candida*. Os autores concluíram que infecção fúngica da córnea continua sendo uma importante causa de morbidade ocular, particularmente em comunidades agrícolas de países em desenvolvimento.

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(77%) pacientes e destas 78 (70%)

foram de etiologia bacteriana e 35 (30%) de etiologia fúngica, as principais espécies foram *Acremonium* spp (25%), *Fusarium* spp (14%) e *A. fumigatus* (14%).

Wang et al. (2009), investigaram a epidemiologia, fatores de risco, e espectro dos fungos no Henan Instituto do Olho na China no período de janeiro de 2000 a março de 2009. Foi diagnosticada ceratite fúngica em 2064 casos (2064 olhos). As espécies fúngicas predominante isoladas foram *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Alternaria* spp. Ceratite fúngica foi mais comum entre os homens e a maioria eram agricultores, Trauma ocular foi identificado como causa significativa para ceratite fúngica. Os autores concluíram que *Fusarium* e *Aspergillus* são sempre os patógenos mais isolados de ceratite fúngica na região central da China, seguido por *Alternaria*.

Balne et al. (2012), relataram um caso de ceratite micótica causada por um fungo raro *Chaetomium atrobrunneum*. O exame clínico, biomicroscopia, e avaliação microbiológica de úlcera de córnea foram feitos, e com base nas características morfológicas e análise de sequenciamento de DNA, o isolado foi identificado como *C. atrobrunneum*. De acordo com os autores este é o primeiro relato de ceratite causada por um fungo raro, *C. atrobrunneum*, a qual foi resolvida completamente com natamicina tópica e cetoconazol oral.

No processo da ceratite fúngica, uma das complicações oftalmológicas graves é a endoftalmite (Proença-Pina et al.2010).

2.1.3 ENDOFTALMITE

Trata-se de infecção intraocular acompanhada de processo inflamatório que pode, em casos graves, atingir o vítreo, a câmara anterior, e por contiguidade acometer a retina e a coróide (Safneck et al.2012). Entre os principais sintomas e manifestações clínicas apresentadas podemos citar, diminuição da acuidade visual, dor, hiperemia conjuntival, reação de câmara anterior, vitreíte, edema da córnea, quemose e edema da pálpebra (Georgala, et al.2010). A maioria das endoftalmite é de origem bacteriana, porém, fungos, vírus e parasitas também podem causar infecção ocular (Bhagat et al.2011).

A endoftalmite constitui uma das complicações mais graves e de pior resultado funcional entre as afecções oftalmológicas. Pode ser de origem exógena ou endógena, dependendo do modo de infecção, os agentes etiológicos mais comuns são *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*. (Hashemi, et al. 2009, Chhablani 2011).

2.1.4 ENDOFTALMITE EXÓGENA

A endoftalmite exógena é causada por micro-organismo do ambiente externo e que adentram aos olhos após cirurgia ou trauma. Esta complicação é bastante rara após procedimentos cirúrgicos eletivos, como, cirurgia de catarata, transplante de córnea, sendo um pouco mais frequente após trauma. As causas mais comuns para endoftalmite exógena são pós-traumático e a endoftalmite secundária a ceratite, o que seria explicado devido às condições de assepsia, desorganização das estruturas oculares e maior virulência dos agentes presentes no trauma (Safneck 2012).

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.

Zarkovic, Guest (2007), escreveram um caso de endoftalmite após trauma devido a *Scedosporium apiospermum*, a qual foi tratada com sucesso com uma combinação de voriconazol intravítreo e sistêmico. Uma dose elevada de 200 mg foi utilizado intravítrea sem quaisquer complicações aparentes. Uma breve visão geral do uso de voriconazol para o tratamento de infecções oculares é apresentado, e é feita uma comparação com agentes antifúngicos oftalmológicos utilizados tradicionalmente.

Wykoff et al. (2008), avaliaram os agentes etiológicos, estratégias de tratamento e resultados clínicos em uma série de casos de pacientes com endoftalmite fúngica exógena atendidos no Bascom Palmer Instituto de olho entre 01 de janeiro de 1990 e 30 de junho, 2006. No estudo obtiveram cultura positiva de amostras clinicas em 41 olhos. Os fungos filamentosos representaram 35 casos (85%), *Fusarium* e *Aspergillus* foram os gêneros mais comumente isolados, e espécies de *Candida* representaram seis casos (15%). A anfotericina B foi o agente antifúngico mais utilizado em que 44% dos pacientes alcançaram uma acuidade visual final de 20/80.

Muzaliha et al. (2009), relataram um caso de endoftalmite por *C. glabrata* seguida por ceratoplastia penetrante em um homem de 57anos. Os autores citaram que *C. glabrata*, é um patógeno ocular raro, no entanto, está se tornando crescente a sua incidência e com predileção notável por pós-ceratoplastia. Estas infecções podem ser difíceis de tratar porque esta espécie é muitas vezes resistente aos agentes antifúngicos comumente utilizados nos casos de candidíases.

Murata et al. (2009), citam um caso de endoftalmite refratário por *Fusarium* sp. após procedimento cirúrgico em um paciente de 71 anos que apresentou perda visual no olho esquerdo cinco meses após a cirurgia de catarata. Amostras de humor aquoso apresentaram resultados microbiológicos negativos. A vitrectomia e remoção de lente intraocular foi realizada, e *Fusarium* sp. foi isolado a partir da cápsula da lente removida. Os autores concluíram que o diagnóstico de endoftalmite fúngica é difícil através da amostra do humor aquoso, sendo possível através da cultura da lente intraocular (LIO) ou cápsula da lente. Em casos refratários como este, vitrectomia combinada com aspiração da amostra é recomendada.

Proença-Pina et al. (2010), descrevem o curso clínico de uma ceratite por *Fusarium* em um paciente usuário de lentes de contato que não respondeu ao tratamento com voriconazol local e sistêmico, e evoluiu para uma ceratite grave com endoftalmite, exigindo ceratoplastia terapêutica. Após oito meses de seguimento, a visão recuperou para 20/50. A diminuição da atividade antifúngica, de soluções desinfetantes para a lente devido à absorção de biguanidas pode está relacionada com os casos de ceratites em usuários de lentes de contato. Como afirmam os autores endoftalmite por *Fusarium* sp. pode resultar em uma infecção devastadora com um mau resultado visual. Ainda consideram que para usuários de lentes de contato, a educação sobre boas práticas de higiene são necessário para evitar este tipo de infecção.

Rensch et al. (2010), relataram uma série de quatro casos que apresentaram endoftalmite de três a sete meses após cirurgia de catarata. Em todos os pacientes, o saco capsular foi irrigado várias vezes e anfotericina B foi instilada intraocularmente sistemicamente. Vitrectomia pars planas foi realizada e análise microbiológica das amostras de humor aquoso revelaram *C. parapsilosis* em três amostras clínicas e *C. albicans* na de um paciente. Estes micro-organismos foram considerados os agentes etiológicos dos referidos casos. Os resultados mostram que uma endoftalmite de etiologia micótica de baixo grau no pós-operatório deve ser considerada, conclui os autores.

Chander et al. (2011), relataram um caso de endoftalmite fúngica exógena em um agricultor de 35 anos de idade com uma história de vermelhidão e diminuição súbita da visão após trauma por vegetal, com infiltração da córnea, hifema, reflexo e exsudatos na câmara anterior do olho esquerdo. Ao exame clínico foi feito diagnóstico provisório de endoftalmite. O exame direto com hidróxido de potássio (KOH) do humor vítreo revelou a presença de hifas septadas. As culturas de fungos foram colocadas no meio ágar batata dextrose (BDA). Com base nas características morfológicas o organismo foi identificado como *F. sacchari*.

Confirmação do diagnóstico e a identificação do agente etiológico foram considerados essenciais para uma terapia específica adequada.

Edelstein et al. (2011), relataram um caso de ceratite multi-resistente por *Fusarium* sp que evoluiu para endoftalmite em usuário de lentes de contato gelatinosas. Ao exame clínico apresentou abrasão na córnea. Os raspados de córnea revelaram hifas filamentosas e septadas. Apesar da terapia antifúngica a ceratite progrediu, e um transplante de córnea foi realizado. Infecção recorrente do enxerto progrediu para endoftalmite a qual foi tratada com repetidas injeções intravítrea de anfotericina B. Mesmo após o uso sistêmico de itraconazol, voriconazol e uso tópico de voriconazol, a infecção progrediu e uma enucleação foi necessária. Espécie multirresistente de *Fusarium* sp é rara, porém, pode ter consequências devastadoras em pacientes com ceratite avançada. Terapia antifúngica empírica geralmente é instituída usando um ou mais agentes antifúngicos, sem verificar sensibilidades antifúngicas. No entanto, diante do aumento da resistência das cepas, os autores propõem um limiar mais baixo para verificar se há sensibilidade em face da não resposta a infecções fúngicas.

Shivaprakash et al. (2011), alertam que os fungos de plantas do gênero *Colletotrichum* são cada vez mais relatados como responsável por causar infecções oftálmológicas em seres humanos. Os quais relatam cinco casos de infecções oculares sendo dois de endoftalmite e três de ceratite devido ao *Colletotrichum truncatum*, uma espécie nunca relatada anteriormente por causar infecção humana. O progresso das lesões nesses pacientes foram lentas comparada com a de lesões causadas por infecções por *Aspergillus* ou *Fusarium*. Como medidas terapêuticas foram incluídas ceratoplastia penetrante total em pacientes com ceratite e vitrectomia *via pars* plana em endoftalmite. Dois pacientes foram tratados adicionalmente com anfotericina B intravítrea, um paciente com itraconazol oral, e outro paciente com fluconazol oral e tópico. O presente relato, portanto, destaca o espectro crescente de agentes causadores de infecções oculares e a inclusão de *C. truncatum* como um agente patogênico humano.

Chan e Holland (2012), estudaram a incidência e características clínicas da endoftalmite infecciosa após implantação de ceratoprótese Boston Tipo 1 (KPro). Os quais analisaram prontuários de 105 pacientes (126 olhos) que tiveram implantação de KPro em Cincinnati Instituto de olho nos Estados unidos entre novembro de 2004 e novembro de 2010.

A incidência de endoftalmite foi de 2,4%, e da cultura do humor vítreo foram isolados *Ochrobactrum anthropi*, *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*. Todos os pacientes receberam anfotericina, vancomicina e / ou cefatazidima intravítrea como medida profilática.

Os autores concluíram que a endoftalmite infecciosa é uma complicação devastadora a qual pode ocorrer após a implantação de ceratoprótese Boston tipo 1 mesmo com medidas profilática, os fungos e bactérias gram-negativas são uma causa de preocupação crescente.

2.1.5 ENDOFTALMITE ENDOGENA

A endoftalmite fúngica endógena é uma infecção intraocular grave, que normalmente acomete pacientes imunocomprometidos. Antibioticoterapia, terapia imunossupressora, doenças sistêmica, doenças malignas, procedimentos invasivo, como cateteres intravenosos e uso de drogas intravenosas estão entre as causas mais frequentes para esta infecção (Mochizuki et al., 2011; Espinosa-Heidmann et al., 2012).

A endoftalmite endógena representa 2% a 10% de todos os casos de endoftalmite (Shen; Xu, 2009). Os micro-organismos atingem o olho através da corrente sanguínea e se recolhem em áreas de alto fluxo de sangue, tais como a retina e coroide, por isso, a infecção intraocular é o resultado de metástase da infecção de um local distante (Safneck et al., 2012),

Os fungos são os agentes mais comuns na endoftalmite endógena, representados em sua maioria pelas espécies de *Candida* (Pelegrin et al., 2010). De acordo com Godoy et al. (2004), o acometimento intraocular por *C. albicans* pode ocorrer através de disseminação hematogênica do agente ou por inoculação direta do fungo. Os autores relatam ainda 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 corticoide tópico, porém a paciente desenvolveu endoftalmite por *C. albicans*. Eles concluem que casos como este devem servir de alerta aos oftalmologistas quanto à possibilidade de infecção fúngica em pacientes submetidos a transplantes penetrantes de córnea e que apresentam inflamação atípica de difícil controle.

De acordo com Paula et al. (2006), a 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 intraocular 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.

Pelegrin et al (2007), descreveram um caso de endoftalmite em um homem de 41 anos HIV positivo que foi internado na emergência de olhos, com história de febre e perda visual em olho direito. O exame oftalmológico revelou severa inflamação vítrea, porém segmento

anterior do olho não mostrou sinais de inflamação. Após sete dias acuidade visual caiu para movimento de mão. Diagnóstico-terapêutico por vitrectomia via pars plana foi realizada. Em seguida cultura do humor vítreo resultou positiva para *C. dubliniensis*, testes de sensibilidade a antifúngicos para *C. dubliniensis* revelaram sensibilidade a azol e o paciente recebeu fluconazol (200 mg três vezes ao dia) via oral. Após dois meses de seguimento, a sua acuidade visual foi mantida em 20/60, sem sinais de infecção ocular ou sistêmica.

A ocorrência de infecções anteriormente rara devidos a agentes patogênicos oportunistas vem aumentando, apesar do uso de novas estratégias de tratamento para pacientes imunocomprometidos. Como afirmam Kapp et al. (2007) e relatam um caso de um paciente que desenvolveu endoftalmite bilateral após transplante hematopoiético de célula-tronco. *F. solani* foi isolado a partir de amostras de sangue periférico e identificado como causa de perda de visão bilateral gradual, apesar da profilaxia antifúngica apropriada, além de vitrectomia e instilação intraocular de agentes antifúngicos. O paciente entrou em coma, meningite basal, envolvendo ambos os nervos ópticos e morreu após oito dias, devido a falhas múltiplas de órgãos. As observações clínicas relatadas aqui segundo os autores podem ajudar os médicos que atendem pacientes imunocomprometidos no sentido de acelerar o diagnóstico e iniciar o tratamento precoce no início da complicação, e destaca a necessidade urgente de gestão interdisciplinar da fusariose invasiva.

Hara et al. (2007), relatam dois casos em que os pacientes com neoplasia hematológica desenvolveram endoftalmite por *Trichosporon beigelii* durante o tratamento com poliquimioterapia. Hemoculturas revelaram *T. beigelii* para ambos os pacientes. Os quais foram tratados com fluconazol (FLCZ) e 5-fluorocitosina, porém a endoftalmite foi resistente a ambas as drogas. Posteriormente foi administrado anfotericina B (ANF-B). Em ambos os pacientes, tratamento sistêmico com ANF-B resolveu com sucesso a endoftalmite. Os autores concluíram que endoftalmite é difícil de tratar e administração de ANF-B é provável que seja mais eficaz no tratamento de endoftalmite devido à trichosporonosis quando a doença se encontra numa fase precoce.

Endoftalmite endógena por *Aspergillus* é uma complicação rara de aspergilose invasiva em pacientes transplantados, segundo Hashemi et al. (2009), os quais descrevem um caso de paciente que foi submetido a transplante de fígado devido a cirrose induzida por drogas colestática e menos de duas semanas após a cirurgia desenvolveu endoftalmite por *Aspergillus*. Reação em cadeia de polimerase do sangue foi positiva para *Aspergillus*. Vermelhidão, unilateral, e outros sinais de endoftalmite foram confirmados ao exame clínico

por um oftalmologista, e posteriormente por microscopia e cultura do fluido vítreo e biópsia da retina. Foi ministrada injeção intravítrea de voriconazol seguido por voriconazol intravenosa, porém os sintomas e nenhuma melhora foram observados na acuidade visual. Dor e sinais de inflamação no olho permaneceram após duas semanas. Por fim, o paciente foi submetido à enucleação para evitar o envolvimento do outro olho por aspergilose ou oftalmia simpática.

Sachdev et al. (2010), mencionaram um caso de endoftalmite endógena bilateral por *Aspergillus* sp. em uma paciente de 26 anos, imunocompetente, que tinha recebido uma infusão intravenosa de dextrose, como tratamento para malária, duas semanas antes desse episódio. O exame de esfregaço de humor vítreo do olho esquerdo revelou hifas septadas com ramificação em ângulo agudo, e a cultura demonstrou crescimento de *A. fumigatus*. Uma avaliação detalhada não revelou qualquer foco sistêmico ou fator predisponente para infecção fúngica. Os autores concluíram que paciente imunocompetente pode apresentar-se com endoftalmite endógena bilateral simultânea por *A. fumigatus* após receber infusão intravenosa de solução de dextrose presumivelmente contaminada.

Lingappan et al. (2012), fizeram uma análise retrospectiva no período 01 de janeiro de 1990, a 1 de julho de 2009 nos prontuários de 65 olhos de 55 pacientes com cultura positiva para endoftalmite fúngica. Leveduras foi o organismo causal mais comum com 38 (75%) dos olhos em comparação com os fungos filamentosos com 13(25%) pacientes. Descolamento de retina ocorreu em 17 olhos (26%). Os autores concluíram que endoftalmite endógena geralmente está associada à baixa acuidade visual, especialmente quando causada por fungos, e que o descolamento de retina é uma ocorrência frequente durante este seguimento.

Espinosa-Heidmann et al. (2012), descreveram um caso incomum de endoftalmite fúngica endógena em um jovem imunocompetente de 27 anos o qual apresentava perda de visão, uveíte densa e infiltrado coriorretinianas. Culturas microbiológicas obtido por vitrectomia foram positivas para *C. dubliniensis*. Este processo infeccioso foi em seguida, devidamente tratado com anfotericina B intravítrea e fluconazol sistêmico, com resolução da endoftalmite. Endoftalmite fúngica endógena foi considerada uma condição que pode mascarar outras causas mais comuns de endoftalmite. Os casos atípicos de endoftalmite podem ser diagnosticados por vitrectomia pars plana para um rápido diagnóstico e tratamento

Sigler e Huang (2012), relataram um caso de endoftalmite em um homem de 63 anos de idade, com história de carcinoma de nasofaringe submetido a terapia de prednisona por via oral o qual apresentou dor de cabeça e perda de visão aguda. Foi

realizado uma vitrectomia, e teste de reação em cadeia de polimerase foi negativo para o vírus herpes simplex, contudo em culturas do humor vítreo cresceu *A. fumigatus*. O paciente foi tratado com injeção intravítrea de anfotericina B e voriconazol oral. Os autores afirmam que este é o primeiro relato de endoftalmite endógena por *A. fumigatus*.

Sallam et al. (2012), estudaram os fatores que afetam o resultado da acuidade visual em pacientes com endoftalmite endógena por *Candida* sp. Estudo retrospectivo de 44 olhos de 36 pacientes com diagnóstico de endoftalmite por *Candida* sp. em dois centros de uveíte terciário de referência. De acordo com esse estudo os autores concluíram que endoftalmite por *Candida* sp está associado com uma elevada taxa de perda visual, particularmente em pacientes que apresentam uma má acuidade visual ou lesões localizadas centralmente. E que, se realizada no início vitrectomia reduz o risco de descolamento da retina.

De acordo com Estivill et al., (2011) e Chandra et al., (2012) muitas práticas médicas envolvem o uso frequente de implantes e dispositivos médicos residentes (IDMR) como, cateteres, próteses, lentes de contacto e outros dispositivos, resultando em crescentes infecções nosocomial. Infecções associadas a IDMR, geralmente envolvem colonização microbiana as quais levam a formação de agregados celulares denominados de biofilmes.

2.2 BIOFILMES FÚNGICO

Os biofilmes são tipicamente sistemas complexos e heterogêneos caracterizado principalmente por associações de micro-organismos aderidos a uma estrutura solidas e matrizes extracelulares (Ramagem et al., 2012). Também são caracterizados por conferir maior resistência às drogas antifúngicas comumente utilizadas do que as células dispersas denominadas de planctônica (Chandra et al., 2012). Os biofilmes fúngicos possuem algumas características morfológicas comuns e essenciais para desempenho e eficiência (Villena et al., 2010). O micro-organismo nos biofilmes exibe fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento, a transcrição do gene, e resistência física e química a stress biológicos. (Singh et al., 2011).

Até recentemente, os fungos filamentosos não eram considerados micro-organismos formadores de biofilme quando comparado com as bactérias e as leveduras, ambos têm sido amplamente estudados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal a laser (CLSM), no entanto os fungos filamentosos têm recebido atenção apenas recentemente (Villena et al., 2010; Gutiérrez-Correa et al., 2012).

Infecções relacionadas a biofilme por leveduras e fungos filamentosos têm sido cada vez mais descritas, incluindo *Pneumocystis*, *Coccidioides*, *Aspergillus*, *Zygomycetes*, *Blastoschizomyces*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Trichosporon*, e *Cryptococcus* (Ramagem et al., 2012).

Complicação infecciosa oculares tem sido associada com o desgaste de lentes de contato gelatinosas. O uso de lentes, acessórios e soluções contaminadas, assim como, a adesão de micro-organismos a superfície da lente e formação de biofilme são fatores considerados no desenvolvimento de ceratite microbiana (Onurdağ et al., 2011).

A formação de biofilme é um atributo importante de virulência em micro-organismos e contribui para a maioria das infecções humanas. Portanto, a compreensão, dos processos pertencentes ao seu desenvolvimento é um pré-requisito importante para a concepção de novas estratégias para prevenir ou erradicar infecções relacionadas com o a formação de biofilme fúngico (Seneviratne,2009). Os biofilmes vêm sendo considerados como a característica mais importante no desenvolvimento nas infecções fúngicas oculares. A erradicação do biofilme é um grande desafio para superar a incidência de resistência às drogas antifúngicas (Sengupta et al., 2012).

Em geral, o desenvolvimento de um biofilme por fungos filamentosos implica em seis estágios sequenciais: O primeiro estágio seria o de adsorção de propágulos, adesão de esporos ou de fragmentos de hifas. Neste, ocorreria basicamente à aderência dos micro-organismos a uma superfície específica biótica ou abiótica. Em seguida, viria o estágio de adesão ativa à superfície, no qual ocorreria a secreção de substâncias adesivas pelos esporos germinados e hifas. No terceiro estágio há discreta formação e organização das células, formação de microcolônia, a partir da multiplicação, do alongamento apical e da ramificação das hifas, e ocorre também a produção de matriz polimérica extracelular, que permite uma forte adesão da colônia em crescimento com a superfície. A quarta fase seria a de maturação inicial do biofilme, este momento envolve a formação de uma rede mais compacta de hifas ou micélios e adesão entre hifas. Ocorre também a formação de feixes de hifas grudados uns aos outros pela matriz polimérica extracelular e a formação de canais de água através da repulsão hidrofóbica entre as hifas. Na fase seguinte, a de maturação ou desenvolvimento reprodutivo, ocorre a formação de corpos de frutificação, células esporogênicas, escleródios e outras estruturas de sobrevivência. Nesta fase, tem intensificado o crescimento aéreo da colônia, evento fundamental para a frutificação e dispersão do fungo. Por fim, o sexto estágio seria o de dispersão, no qual seriam liberados esporos ou fragmentos do biofilme, que atuariam como

novos propágulos podendo dar origem a novos biofilmes e fechariam o ciclo. (Harding et al., 2009; Seneviratne et al., 2009).

Bullock et al. (2008), investigaram o efeito da temperatura de armazenamento em soluções para lentes de contato quanto a capacidade em inibir o crescimento de espécies de *Fusarium*. Visto que em 2005 e 2006, o Departamento de Saúde de Hong Kong registrou um aumento da incidência de ceratite por *Fusarium* sp, em usuários de lentes de contato as quais foram associadas ao uso do antisséptico ReNu. Seis soluções para lentes de contato foram testadas: Renu com MoistureLoc (ReNu ML), ReNu MultiPlus, Moistureplus completo, AQuify, Care Clear, e OPTI-FREE RepleniSH. Dois frascos de cada solução foram separadamente armazenados à temperatura de 23°C e 60°C durante quatro semanas, em seguida foram testados quanto à capacidade de inibir o crescimento em 11 isolados de *Fusarium*. Quando exposto a elevada temperatura por tempo prolongado, ReNu ML perdeu a atividade fungistática *in vitro* mais do que os outros produtos. Os autores concluíram que o controle de temperatura inadequada do ReNu ML pode ter contribuído para aumento de ceratite por *Fusarium* em 2005-2006.

Hasan et al. (2009), avaliaram a formação de biofilme por XTT [2,3-bis (2- methoxy-4nitro-5-sulfo-phenyl) -2H-tetra-zolium-5-carboxanilide] em cepas de *Candida* isoladas de amostra clínica de 32 pacientes com candidemia, comparando com a formação de biofilme por *Candida* isolada de lesões de orofaringe em 19 pacientes com AIDS. A formação de biofilme variou entre as espécies, e *C. albican*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* produziram mais biofilme que outras espécies de *Candida*. Os autores concluíram que a formação de biofilme é estável, mas, característica específica do isolado pode variar bastante entre *C. albican* e *Candida* não-albicans, e desempenha papel importante na persistência da infecção.

Lazzell et al. (2009), desenvolveram modelo de candidíase em camundongos utilizando cateter venoso central e examinaram a eficácia de caspofungina para tratar e prevenir biofilmes por *C. albicans*. Os autores demonstraram *in vivo* que biofilmes formados por *C. albicans* apresentam características estruturais semelhantes às formadas *in-vitro*. Após o desenvolvimento do modelo 0,25 ml de caspofungina foi instilada sobre o cateter para o tratamento de biofilmes pré-formados, o qual reduziu significativamente a carga de biofilme fúngico nos cateteres. Um segundo conjunto de experiências, em que cateteres foram pré-tratados instilando 60 ml de caspofungina antes do teste com *C. albicans*, uma significativa redução da carga de biofilme fúngica (em comparação aos controles) foi relatado. Os autores

concluíram que os modelos *in vivo* têm favorecido a compreensão da patogênese de biofilme por *C. albicans* e o papel do biofilme nas infecções, como também as ferramentas fornecidas para avaliar os potenciais dos agentes antibiofilmes.

Uppuluri et al. (2009), comparando o desenvolvimento, arquitetura e resistência às drogas antifúngicas de biofilme por *C. albicans* cultivados *in vitro* sob condições estática e biofilme sob fluxo de meio contínuo demonstraram que biofilmes formados por *C. albicans* usando sistema de fluxo mostrou aumento da complexidade arquitetônica em relação aos biofilmes cultivados em condições estáticas. Medições de biomassa e observações microscópicas revelaram ainda que, após 24 h de incubação, biofilmes sob fluxo de meio contínuo foi duas vezes mais espesso que os biofilmes cultivados em condições estáticas e a superfície destes biofilmes foram extremamente compacto e enrugada, ao contrário da camada de hifas aberta tipicamente vista em 24 h nos biofilmes estático. As análises microscópicas revelaram que testes de sensibilidade antifúngica mostraram que as células de *C. albicans* em biofilmes sob fluxo de meio contínuo apresentaram aumento da resistência às drogas antifúngicas mais usadas clinicamente.

Silva et al. (2010) analisaram a atividade metabólica *in vitro* de biofilme formado por

C. parapsilosis, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, os autores afirmam que a atividade metabólica total do biofilme depende das cepas. Desta forma *C. glabrata* exibiu a atividade metabólica do biofilme mais baixa apesar de ter o maior número de células cultiváveis. Do mesmo modo, a atividade metabólica das células ressuspensas do biofilme e de células planctônicas dessa espécie foram menores do que a das outras espécies. Este estudo demonstra a existência de diferenças intrínseca de atividade entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, o que poderia ter implicações importantes em termos de espécies em relação a virulência. No entanto os autores questionam sobre qual seria o parâmetro de avaliação ideal do biofilme e que correlação há entre o número de células cultiváveis e a atividade metabólica total do biofilme.

Kovaleva et al. (2010), avaliaram os efeitos do ácido paracético na limpeza e desinfecção com e sem secagem adicionais sobre biofilmes formados por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, isolados de endoscópios flexíveis contaminados. O ácido paracético foi eficaz contra o biofilme e células planctônicas de todos os micro-organismos avaliados imediatamente após o tratamento, porém permitiu regeneração de todos os biofilmes quando procedimento de secagem foi ignorado. De acordo com esse estudo os pesquisadores concluíram que o procedimento de limpeza rotineiro não remove de forma confiável os biofilmes presente nos canais de

endoscópios se o procedimento de secagem aplicado não for eficiente. Isto pode explicar o fracasso de descontaminação durante o reprocessamento do endoscópio.

Lattif, et al. (2010), estudaram a caracterização e formação de biofilme por *C. parapsilosis*, e duas novas espécies *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* e concluíram que as três espécies apresentam capacidade semelhante de formar biofilme.

Estivill et al. (2011), analisaram a capacidade de formação de biofilme por 84 cepas de *Candida* distribuídas em *C. albicans* (23), *C. parapsilosis* (23), *C. tropicalis*, (16), *C. glabrata*

(17) e *C. krusei* (5). Foram avaliados três materiais utilizados em dispositivos médicos através da quantificação de células viáveis. Todas as cepas de

Candida testadas foram capazes de formar biofilmes, ocorrendo maior formação em TeflonTM, exceto *C. glabrata* que exibiu maior capacidade de formação de biofilme em PVC. Os autores concluíram que a formação de biofilme por espécies de *Candida* varia a depender do tipo de material, da espécie e da cepa de *Candida*.

Villar-Vidal et al. (2011), estudaram a variação na formação de biofilme entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* isolados de sangue e cavidades orais, utilizando poliestireno como substrato. Todos os isolados testados produziram biofilme, no entanto, a formação de biofilme por *C. albicans* foi significativamente maior que a formação de biofilme por isolados de *C. dubliniensis*. As diferenças na produção de biofilme entre isolados deve ser analisada quanto à atividade anti-biofilme dos agentes antifúngicos ou outros fatores de virulência testados *in vitro*.

Boucherit-Atmani et al.(2011), estudando a formação de biofilmes por *C. albicans* isoladas de cateteres e sondas e sua resistência à anfotericina B verificaram que as células sésseis de *C. albicans* foram muito mais resistentes do que as células planctônicas (células em suspensão). O aumento da resistência ocorreu especialmente durante as diferentes fases da formação de biofilme até que atingiu o seu limite no estagio de maturação (48 h). Além disso, microscopia eletrônica de varredura das cepas isoladas revelou a formação de biofilmes por *C. albicans* nos cateteres. Surpreendentemente, as observações revelaram a presença de uma nova estrutura nestes biofilmes,ou seja a formação de clamidósporos.

Onurdağ et al. (2011), analisando as diferenças na aderência de *Pseudomonas* e *C. albicans* em cinco tipos de lentes de contato gelatinosas, observaram que o número de *Pseudomonas* aderente foi decrescente nas lentes polymacon, etafilcon A, hilafilcon,

ocufilcon e lotrafilcon. O número de leveduras aderentes foi maior nas lentes de contato lotrafilcon e ocufilcon seguida por hilafilcon e etafilcon A e polymacon. Este estudo demonstra que, além das propriedades das lentes de contato, os próprios micro-organismos e suas interações com o material da lente também desempenham um papel importante na adesão.

Sengupta et al. (2012), verificaram a capacidade *in vitro* da formação de biofilme em lentes de contato por *A. fumigatus*, *F. solani*, e *C. albicans* isolados de pacientes com ceratite e o efeito de uma solução protótipo (Lactoferricin B) para lentes de contato sobre os biofilmes. Os autores concluíram que todas as cepas foram capazes de formar biofilme após 72 horas de incubação. Além disso, o efeito da solução para lentes (Lactoferricin B) foi considerado parcialmente eficaz na erradicação do biofilme fúngico em lentes de contato. Segundo os autores estes resultados sugerem que lactoferricin B pode ser um candidato promissor como um aditivo antibiofilme-antifúngico em solução para lentes de contato.

Paiva et al. (2012), Avaliaram a formação de biofilme e as características ultraestruturais *in vitro* em espécies de *Candida* isoladas de candidíase vulvovaginal. Todas as leveduras produziram biofilme e mostraram viabilidade até 48 h após a conclusão do ensaio, confirmado por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser. Também revelou que todos os isolados aderiram apenas na forma de blastoconídeos, exceto *C. parapsilosis*. A alta formação do biofilme, atividade metabólica e hidrofobicidade da superfície celular, bem como, as características ultraestruturais mostraram que *C. albicans* e *C. parapsilosis*, exibem maior capacidade de aderência em relação as outras espécies. Os autores afirmam que o potencial de virulência é multifatorial e que outros fatores não avaliados no estudo, podem estar envolvidos na fisiopatogenia da candidíase vulvovaginal.

Retuerto et al. (2012), avaliaram o efeito no desgaste em três tipos de lente de contato gelatinosa (lotrafilcon A, etafilcon A e balafilcon A) associadas com formação de biofilmes por *F. solani* e *F. oxysporum* e a eficácia de três soluções para limpeza e desinfecção de lentes de contato disponível comercialmente. Os autores concluíram que as espécies testadas são capazes de formar biofilme em lentes de contato e que apenas uma das soluções testada à base de peróxido de hidrogênio mostrou atividade antifúngica eficaz em ambas às espécies e nos três tipos de lentes.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE RASPADOS DE CÓRNEA

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 Fevereiro de 2011 a Maio de 2013 foram atendidos 308 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 gênero, 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 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS

Culturas de *F. Solani*, *A. fumigatus* e *A. terreus* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 72 h. Os conídios foram coletados por lavagem da superfície das culturas utilizando 5ml de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 contendo Tween 20 na concentração de 0,025% (v/v), subsequentemente foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer e o inóculo ajustado para a concentração de 1×10^5 células em RPMI 1640 (Sigma) tamponado para pH 7.0 com MOPS 0,165M (Mowat *et al.*, 2007).

3.3 FORMAÇÕES DE BIOFILME

Para a produção do biofilme sobre as lentes de contato, estas foram colocadas em placas de microtitulação contendo 24 poços (TPP, Switzerland), sobre estas foram dispensados 200µl da suspensão fúngica padronizada em tampão MOPS-RPMI 1640 em cada orifício de forma a ficarem totalmente submersas no conteúdo e incubadas a 37°C por 24 horas. Cessando este tempo, o meio de cultura foi removido dos orifícios e as lentes lavadas três vezes com PBS pH 7,2 para total remoção de células não aderentes (Mowat *et al.*, 2007).

3.4 DESINFECÇÕES DAS LENTES DE CONTATO

As lentes de contato foram submersas em quatro tipos de soluções desinfetantes (Solução A, B e C) disponíveis comercialmente e (D) solução teste. Para controle foi utilizado a solução fisiológica.

Para verificação “in vitro” do poder fungicida do produto D(solução teste) utilizado na desinfecção das lentes, foram testadas as lentes de contato colonizadas por fungos, as quais separadamente ficaram imersas em poços contendo os produtos padrões e teste, bem como solução fisiológica (controle). Após 24 horas foram analisado o efeito das soluções desinfetantes sobre a viabilidade e remoção dos fungos no biofilme sobre lentes de contato através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), retrocultivo e confirmação taxonômica.

3.5 MICROSCOPIAS ELETRONICA DE VARREDURA

A topografia da superfície destes biofilmes foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CERATITE FÚNGICA

No período avaliado foram diagnosticados 15 casos (15 olhos) de ceratite fúngica. As principais manifestações clínicas apresentadas foram hiperemia de conjuntival, úlcera de córnea e hipópio (Figura1). Todos confirmados através do diagnóstico laboratorial micológico. Ao Exame direto foram visualizados vários filamentos micelianos hialinos e septados (figura 2).

Dos casos positivos para ceratite fúngica, 08 (53%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 07 (47%) sexo feminino. A média de idade foi de 50 anos, variando de 31 a 78 anos. Com relação às atividades laborais, seis (40%) pacientes eram agricultores, cinco (33,3%) era donas de casa, um (6,6%) cozinheiro, um (6,6%) vendedor, um (6,6%) mestre de obras e um (6,6%) auxiliar de serviços gerais. Os fatores associados por trauma ocular foram referidos por seis (40%) pacientes, destes, quatro (16%) dos pacientes com material vegetal. A tabela 1 representa um quadro resumo dos aspectos etiológicos, epidemiológicos e perfil de tratamento dos casos de ceratite fúngica apresentados neste estudo.

O tempo médio de início dos sintomas e chegada ao serviço foi de sete dias, variando de 01 a 30 dias. Oito pacientes foram provenientes de Recife/região metropolitana e sete do interior do estado de Pernambuco. Os pacientes da capital e região metropolitana apresentaram uma média de cinco dias para entrada no serviço oftalmológico e os pacientes do interior uma média de nove dias.

Quanto aos agentes causadores de ceratite fúngica, foi identificado *F. solani* com nove (60%) casos, *F. oxysporum*, quatro (26,6%), *A. fumigatus* e *A. parasiticus* com um (6,67%) caso cada (Figura 3). Anfotericina B tópica foi iniciada em 13(86,6%) pacientes sendo substituída por natamicina tópica em dois (13,3%) casos. Cetoconazol sistêmico foi utilizado em seis (40%) pacientes. Todos os pacientes utilizaram antibiótico tópico.

O procedimento de ceratoplastia penetrante foi realizado em oito (53,0%) dos casos, sendo a lavagem de câmara anterior com anfotericina B, realizada previamente em oito (53,0%) desses pacientes. O recobrimento conjuntival foi realizado em sete (47,0%) pacientes, sendo que destes, dois casos submetidos à evisceração.

Dos sete pacientes que não foram submetidos à ceratoplastia penetrante, cinco foram submetidos ao recobrimento conjuntival associado à lavagem de câmara anterior com anfotericina B, resultando na melhora do quadro infeccioso

Ceratite fúngica é uma infecção que afeta principalmente o epitélio da córnea, estroma com envolvimento do endotélio e da câmara anterior do olho em casos graves (Taneja et al., 2013). Mais de 50 gêneros de fungos já foram descritos como agente etiológico dessa infecção, sendo, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Curvularia*, e *Candida* os mais comuns em todo mundo (autor).

Esta infecção ocorre com maior frequência na população rural, sendo os homens mais acometidos. No presente estudo observou-se maior número de pacientes do gênero masculino acometidos por ceratite fúngica sugerindo maior exposição desse grupo de pacientes aos agentes predisponentes (Yildiz et al., 2008; Jastaneiah et al., 2011).

A história de trauma ocular com matéria vegetal foi referida nesse estudo em 16% dos pacientes. Este resultado está de acordo com dados obtidos por Ibrahim et al. (2011). Os referidos autores associam trauma vegetal como relato agravante para originar as ceratites fúngicas. Outros autores também afirmam que trauma com lesão de córnea, em especial com material de origem vegetal, é considerado como o principal fator de risco para o desenvolvimento de ceratite fúngica. O uso de lentes de contatos também é bastante relatado, porém não encontrado nesta pesquisa (Hofling-Lima et al. 2005, Yildiz et al. 2010, Knape et al. 2011).

Dos pacientes estudados, 43,5% eram procedentes de zona rural, sendo todos os demais, da capital e região metropolitana do Recife. No presente estudo as atividades agrícolas constituíram a maioria dos casos, sendo um total 40,0% das atividades laborais relatadas. Uma correlação entre atividades agrícolas e um aumento no número de casos no período de safra foi sugerida por outros autores (Ibrahim et al. 2008).

A cultura foi positiva em 15 amostras, procedidas de 15 pacientes que totalizou 20,54% do total de casos suspeitos de ceratite fúngica. Na literatura encontramos um índice de culturas negativas que varia de 40 a 70% dos casos, caracterizando a dificuldade de isolamento de fungos por cultura (Yilmaz et al. 2007). A variação destes níveis pode ser atribuída a uma série de fatores que incluem coleta inadequada do material, tratamento prévio com antibióticos e uso de anestésico tópico na obtenção da amostra (Badenoch et al. 2005). Embora um exame minucioso possa ajudar na formulação de um diagnóstico clínico, as ceratites fúngicas continuam sendo motivo de dúvida entre as causas de ceratites infecciosas. Os sinais mais sugestivos de ceratite fúngica são margens hifadas, bordas elevadas, presença de fibrina na superfície da lesão e lesão com outra cor que não amarela (Thomas et al. 2005).

O agente etiológico mais citado em nossa pesquisa foi *F. solani* (nove casos), que constituiu 60% das amostras com cultura positiva. O outro agente isolado foi o *A. fumigatus* (dois casos). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores realizados na América do Sul, onde os principais fungos isolados foram *Fusarium* sp e *Aspergillus* sp, que de fato são os patógenos mais frequentemente isolados em regiões tropicais nas últimas décadas. (Hofling-Lima et al. 2005, Ibrahim et al. 2008, Wang et al. 2009, Gopinathan et al. 2010). Acreditamos que este fato possa ser explicado por diferenças no clima e no meio ambiente, sendo a *Candida* sp o agente mais prevalente em países desenvolvidos e de clima temperado (Yildiz et al. 2010, Bahadir et al. 2012).

O tempo médio de procura dos pacientes ao serviço oftalmológico foi de aproximadamente sete dias, variando de 01 a 30 dias, período semelhante relatado em estudo realizado por Ibrahim et al. (2008), em estudo na região Sudeste do Brasil. Ainda em nossa pesquisa, uma média de cinco a nove dias foi o tempo determinado para os pacientes darem entrada no serviço especializado. Essa diferença pode ser explicada pela dificuldade de acesso a serviços de saúde pela população do interior do estado que necessitam de informação para qual serviço se direcionar e dependem de transporte para o local de assistência.

O tratamento mais utilizado foi a anfotericina B e natamicina. A anfotericina B age principalmente contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, mas pode também agir contra espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, sendo necessária a remoção do epitélio e do estroma anterior para uma maior penetração do antifúngico. A Natamicina age principalmente contra fungos filamentosos, especialmente *Fusarium* sp e *Aspergillus* sp, sendo também necessário o procedimento de debridaç o da lesão (Oliveira et al. 2001).

O uso de anfotericina B prescrito para a maioria dos pacientes neste estudo foi justificado pelo fato de o serviço fornecer a medica o gratuitamente. Sendo também prescrito a natamicina, porém a maioria dos pacientes não adquire a medica o pelo custo elevado e pela dificuldade de seguir corretamente as orienta es médicas. Assim, o uso concomitante da natamicina também   importante para um prognóstico melhor da infec o.

O tratamento sistêmico foi realizado em 53,3% dos pacientes (oito casos) com cetoconazol sistêmico que   eficaz contra espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Curvularia* (Oliveira et al. 2001). O tratamento clínico foi eficaz em 52,2% dos pacientes (11 casos) sendo que desses, três pacientes foram submetidos a recobrimento conjuntival e evoluíram com boa resposta terapêutica. A ceratoplastia penetrante foi realizada em 53,3% (oito casos) devido ao quadro de perfura o ocular ou não resposta ao tratamento instituido.

Em trabalho realizado na região Sudeste observou-se que 70% dos pacientes evoluíram para ceratoplastia penetrante, com recidiva do quadro em 41,9% dos transplantes, sendo a natamicina, o antifúngico tópico utilizado em 70% dos casos (Salera et al. 2002).

O transplante de córnea é indicado com o objetivo de remover o tecido envolvido e preservar a integridade do globo ocular, ainda assim os fungos podem permanecer na borda do tecido da córnea ou na câmara anterior levando à recidivas da infecção fúngica (Salera et al. 2002).

4.2 FORMAÇÕES DO BIOFILME

No presente estudo, foi desenvolvido um modelo *in vitro* de formação de biofilme em lentes de contato entre os principais agentes etiológicos de ceratite fúngica, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *F. solani*. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que as três espécies estudadas formaram biofilmes na superfície de lentes de contato. Sendo observado biofilme maduro após 72 horas de incubação para todas as cepas.

A análise topográfica da MEV mostrou que a produção do biofilme por *A. fumigatus* e *F. solani* foi mais robustos e uniformemente distribuídos, que o biofilme formado por *A. terreus*. (figura 01). Estes resultados são consistentes com os relatado por (Imamura et al. 2008) o qual afirmam que a formação de biofilme por espécies de *Fusarium* e *Candida albicans* ocorre em qualquer tipo de lentes de contato e Mowat et al. (2007) têm demonstrado que o *A. fumigatus* possui a capacidade para formar biofilme os quais são resistentes aos efeitos de antifúngicos.

A formação de biofilme por fungos filamentosos também foi descrito em *A. niger* cultivado em malha de poliéster e caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV); por *A. fumigatus* e caracterizados por microscopia confocal laser scanning (LSCM) e por *F. solani* e *F. oxysporum* analisados por LSCM e antibiograma (Mowat et al., 2008; Gamarra et al., 2010).

De acordo com Kucharíkova et al. (2011) a formação de biofilme fúngica é fortemente influenciada pela capacidade de aderência dos fungos ao substrato e pelas propriedades da superfície de adesão, as lentes têm uma superfície hidrófila uniforme que é diretamente correlacionada com a capacidade absorção de água e capacidade de aderência de biomoléculas, que podem ajudar na formação de biofilme fúngico.

O risco de contaminação da superfície da lente de contato é considerado um dos principais problemas associados com o uso da lente. Durante os cuidados de manutenção, a

lente de contato pode ser colonizada por micro-organismo de superfícies (estojo da lente) ou pela solução de conservação/manutenção contaminada (Souza et al.2008)

A solução desinfetante proposta foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de biofilme em lentes de contato comparada com as soluções padrões, disponível comercialmente (Figura 02). Retuerto et al.(2012) avaliaram a eficácia de soluções para desinfecção de lentes de contato sobre biofilme formados por *F. solani* e *F. oxysporum* as espécies testadas foram resistentes a maioria das soluções testadas.

Bullock et al.(2008) investigaram o efeito da temperatura de armazenamento de soluções para lentes de contato na capacidade de inibir o crescimento de espécies de *Fusarium*. Eles afirmam que quando exposto a temperatura elevada por um período prolongada, ReNu ML perde a atividade fungistática *in vitro* contribuído para o aumento da ceratite por espécies de *Fusarium*.

Em estudo realizado por Jurkunas et al. (2009), infecções fúngicas da córnea relacionada ao uso de lentes de contato gelatinosas foi responsável por 41% das ceratite em 2004-2007, em comparação com apenas 17% em 1999-2002. Os autores afirmam que os pacientes devem ser aconselhados a manter os mais altos padrões de cuidado da lente de contato, esfregando a superfície da lente, pois isso foi demonstrado que melhora a eficácia da desinfecção das lentes.

Podemos dizer que biofilme se trata de uma comunidade de micro-organismos associados e firmemente aderidos a uma superfície por meio de uma matriz extracelular de polímeros, uma das vantagens dos biofilmes é maior resistência a estresses biológicos, químicos e físicos. Consequentemente há maior resistência aos antibióticos e antimicrobianos quando os micro-organismos infecciosos estão sob a forma de biofilme.

No entanto, as investigações de biofilmes fúngicos associados às lentes de contato são praticamente inexistentes, e a falta de um modelo *in vitro* adequado resulta em poucas informações sobre a patogênese da ceratite fúngicas.

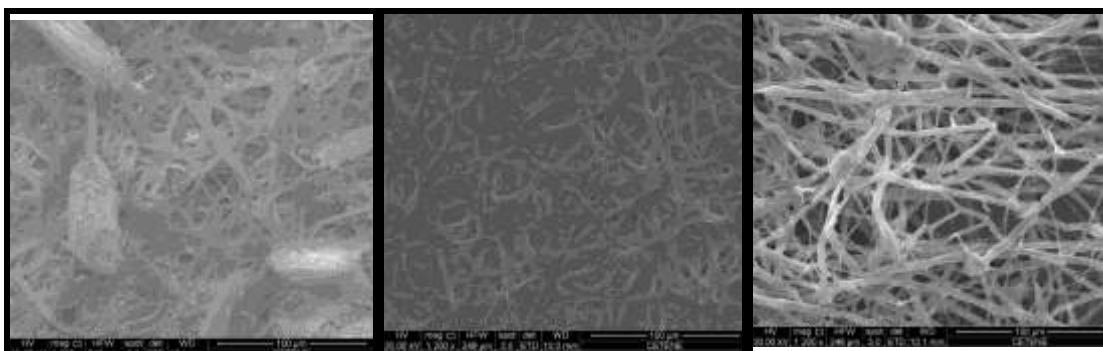


Figura 1. Microscopia Electronica de Varredura, imagens de biofilme formados em lentes de contato por *Aspergillus fumigatus* (A); *Fusarium solani* (B) e *Aspergillus terreus* (C)

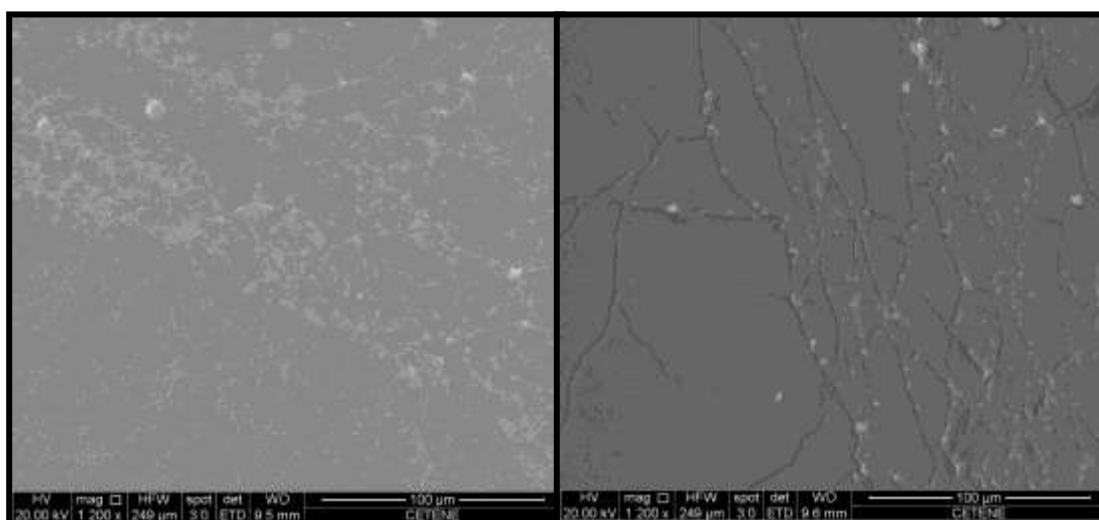


Figura 02. Microscopia Electronica de Varredura, imagens após a desinfecção das lentes de contatos colonizadas. Nova formulação desinfetante (A); Solução Padrão(B)

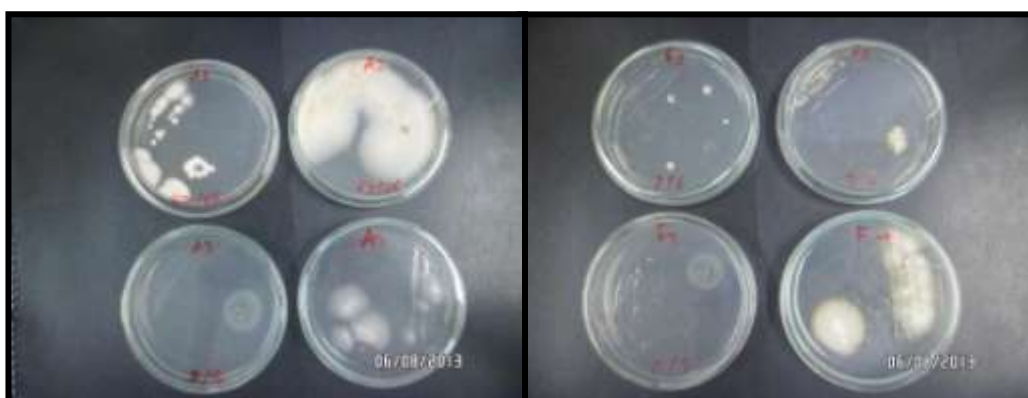


Figura 03. Retrocultivo do biofilme fúngico após a desinfecção das lentes de contatos colonizadas

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir:

- Infecções fúngicas oculares ocorrem freqüentemente 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 é possível através do exame direto e/ou cultura.
- Cirurgias de cararata predis põem infecções fúngicas intra-oculares.
- Os agentes etiológicos mais freqüentes de infecções fúngicas oculares são *Fusarium solani* e *Aspergillus fumigatus*.
- *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *Fusarium solani* e *F.oxysporum* são capazes de formar biofilme sobre lentes de contato.
- A nova formulação antisséptica proposta tem capacidade de agir contra biofilmes em lentes de contato.

6 REFERÊNCIAS

- Alío, J.L.; Perez-Santonja, J.J.; Tervo, T.; Tabbara, K.F.; Vesaluoma, M.; Smith, R.J. 2000. Postoperative inflammation, microbial complications, and wound healing following laser in situ keratomileusis. *Journal of Refractive Surgery* 16(5): 523-38.
- Al-Yousuf, N. 2009. Microbial Keratitis in Kingdom of Bahrain: Clinical and Microbiology Study. *Middle East Afr J Ophthalmol* 16(1): 3–7.
- Andrade, A.J.M., Vieira, L.A., Höfling-Lima, A.L., Yu, M.C.Z., Gompertz, O.F. 2000. Laboratorial analyses of fungal keratitis in a university service. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 63(1):59-63.
- Annamalai T, Fong KC, Choo MM. 2011. Intravenous fluconazole for bilateral endogenous Candida endophthalmitis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 27(1):105-7
- Badenoch, P. R. e D. J. Coster. Antimicrobial activity of topical anaesthetic preparations. *Br J Ophthalmol*, v.66, n.6, Jun, p.364-7. 1982.
- Bahadır, A. E., Bozkurt, T. K., Kutan, S. A., Yanyali, C. A., Acar, S. 2012. Candida interface keratitis following deep anterior lamellar keratoplasty. 32(4):383-386.
- Bahadır, A.E., Bozkurt, T. K., Kutan, S. A., Yanyali, C.A., Acar, S. 2012. Candida interface keratitis following deep anterior lamellar keratoplasty. *Int Ophthalmol*. 32(4): 383-386.
- Balne, P.K., Nalamada, S., Kodiganti, M., Taneja, M. 2012. Fungal keratitis caused by *Chaetomium atrobrunneum*. *Cornea* 31(1): 94-95.
- Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D. 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge: University Press.
- Bharathi, M.J., Ramakrishnan, R., Vasu, S., Meenakshi, R., Palaniappan, R. 2003. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. *Indian journal of Ophthalmology* 51(4): 315-21.
- Bilateral simultaneous endogenous *Aspergillus* endophthalmitis in an immunocompetent patient. *Retinal Cases and Brief Reports* 4(1): 14-17

- Boucherit-Atmani, Z., Seddiki, S.M.L., Boucherit, K., Sari-Belkharoubi, L. Kunkel, D. (2011). *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal de Mycologie Médicale* 21(03): 182—187
- Bourcier, T., Touzeau, O., Thomas, F., Chaumeil, C., Baudrimont, M., borderie, V., Laroche, L 2003. *Candida parapsilosis* keratitis. *Cornea* 22(1): 51-55.
- Bullock, J. D., Warwar, R. E., Elder, L., Northern, W. I . 2008. Temperature Instability of ReNu with MoistureLoc: A New Theory To Explain The Worldwide *Fusarium* Keratitis Epidemic Of 2004-2006. *Archves of Ophthalmology* 126(11): 1493-1498.
- Caretti, L., Babighian, S., Rapizzi, E., Ponzin, D., Galan, A. 2011. Fungal keratitis following deep lamellar keratoplasty. *Seminars in Ophthalmology* 26(1): 33-5.
- Cariello, A. J., Passos, R.M., Yu, M.C.Z., Hofling-Lima, A.L. 2011. Microbial Keratitis at a referral Center in Brazil. *International Ophtalmology* 31(3): 197-204.
- Carvalho, A.C.A., Ruthes, H.I., Maia, M., Yana, D., Sato, M.T., Moreira, H., Fernandes-Bordignon, G., Queiroz-Teles, F. 2001. Ceratite fúngica no estado do Paraná – Brasil: aspectos epidemiológicos, etiológicos e diagnósticos. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18: 76-78.
- Chan, C.C., Holland, E.J. 2012. Infectious endophthalmitis after boston type 1 keratoprosthesis implantation. *Cornea*. 31(04): 346-349.
- Chander, J., Singla, N., Gulati, N. , Sood, S. (2011). *Fusarium sacchari*: A Cause of Exogenous Fungal Endophthalmitis: First Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia*. 171:431–434.
- Chandra, J., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A. (2012). *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses* 55(1): 46–57.
- Chhablani, J., 2011. Fungal endophthalmitis, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 9(12) : 1191-1201.
- Choi, D. M., Goldstein, M. H., Salierno, A., Drieb, W. T. 2001. Fugal Keratitis in a daoly disposable soft contact lens wearer. *Clao Journal* 27(2): 111-2.

- Chowdhary, A., Singh, K. 2005. Spectrum of fungal keratitis in North India. *Córnea* 24(1):8-15.
- De Hoog, G.S.; Garro, J. Gené, J.; Figueira, M.J. 2000. Atlas of clinical fungi, Centraalburcau voor Schimmecultures, Utreecht, The Netherlands. 1126.
- Edelstein, S.L., Akduman, L., Durham, B.H., Fothergill, A.W., Hsu, H.Y. 2011. Resistant fusarium keratitis progressing to endophthalmitis. *Eye Contact Lens*.
- Espinosa-Heidmann, D. G., McMillan, B. D., Lasala P. R., Stanley, J., Larzo, C. R. (2012) *Candida dubliniensis* endophthalmitis: first case in North America. *International Ophthalmology* 32:41–45.
- Estivill, D., Arias, A., Torres-Lana, A., Carrillo-Muñoz, A. J., Arévalo, M. P. 2011. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods* 86(2): 238–242.
- Ferrer, C., Alio, J., Rodriguez, A., Andreu, M., Colom, F. 2005. Endophthalmitis Caused by *Fusarium proliferatum*. *Journal clinical microbiology* 43(10): 5372– 5375.
- Foster C.S. 1992. Fungal keratitis. *Infectious Disease Clinics North America* 6: 851-7.
- Garcia-Delpech, S., Díaz-Llopis, M., Udaondo, P., Salom, D. 2010. Fusarium keratitis 3 weeks after healed corneal cross-linking. *Journal of Refractive Surgery* 26(12):994-995.
- Godoy, G., Wahab, S. A., Höfling De Lima, A. L., Moreira, H. 2004. Endoftalmite por *Candida albicans* após transplante penetrante de córnea: Relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 67: 349-52.
- Gomes, F. S., Alves, M. A. A. 2003. Ceratites Fúngicas. *Revista Médica* 37(2): 08-12
- Guarro, J., Höfling-lima A. L., Gené, J., De Freitas, D., Godoy, P., Zorat-Yu, M L., Zaror, L., Fischman, O. 2002. Corneal Ulcer Caused by the New Fungal Species *Sarcopodium oculorum*. *Journal clinical microbiology* 40(8): 3071–3075.

- Gutiérrez-Correa, M., Ludeña, Y., Ramage, G., Villena, G. K. 2012. Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Hamdam, J., Guimarães, I.S., Oréfice, F. 2000. Uveítes fúngicas. In: Oréfice O, editor. Uveíte clínica e cirúrgica. Rio de Janeiro: *Cultura Médica* 569-593.
- Hara, S., Yokote, T., Oka, S., Akioka, T., Kobayashi, K., Hirata, Y., Miyoshi, T., Tsuji, M., Hanafusa, T. 2007. Endophthalmitis due to *Trichosporon beigelii* in acute leukemia. *International Journal of Hematology*. 85(5): 415-7
- Harding, M.W., Marques, L.L., Howard, R. J., Olson, M. E. 2009. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in Microbiology* 17(11): 475-80.
- Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., Fries, B.C. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection* 11(8-9): 753-61.
- Hashemi, S. B., Shishegar, M., Nikeghbalian, S., Salahi, H., Bahador, A., Kazemi, K., Dehghani, M., Kakaei, F., Gholami, S., Janghorban, P., Malek-Hosseini SA. 2009. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis occurring after liver transplantation: a case report. *Transplantation Proceedings* 41(7): 2933-5.
- Höfling-Lima, A. L., Forseto, A., Duprat, J. P., Andrade, A., de Souza, L. B., Godoy, P., Freitas D. 2005. Estudo laboratorial das micoses oculares e fatores associados às ceratites. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 68(1): 21-7.
- Hofling-lima, A. L., Garro, J., Freitas, D., Godoy, P., Gené, J., Sousa, L. B., Zaror, L., Romano, A. 2005(b). Clinical treatment of corneal infection due to *Fonsecaea pedrosoi*- Case report. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 68(2): 270-2.
- Hofling-Lima, A. L.; Forseto, A.; Duprat, J. P.; Andrad, A.; Sousa, L. B.; Freitas, D. 2005. (a) Estudo laboratorial das micoses oculares e fatores associados a ceratites. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 68(1): 21-27.
- Ibrahim, M., Rocha, E.M.R., Castro, R.S. 2008. Aspectos clínicos e epidemiológicos da ceratite fúngica. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 71(4): 28-28.

- Kapp, M., Schargus, M., Deuchert, T., Springer, J., Wendel, F., Loeffler, J., Grigoleit, G.U., Kurzai, O., Heinz, W., Einsele, H., Stuhler, G. 2011. Endophthalmitis as primary clinical manifestation of fatal fusariosis in an allogeneic stem cell recipient. *Transplant Infectious Disease*. 13(4): 374-379.
- Kara-José, N., Coral-Ghanem, C. 2005. Complicações palpebrais e conjuntivais associadas ao uso de lentes de contato. In: Kara-José N, Coral Ghanem, editores. Lentes de contato na clínica oftalmológica. Rio de Janeiro: Cultura Médica 181-90,
- Klotz, A. S.; Penn, C.C.; Negvesky, G. J.; Butrus, S. I. 2000. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clinical Microbiology* 13(4): 662-685.
- Knape, R.M., Motamarry, S. P., Sakhalkar, M.V., Tuli, S.S. Driebe, W. T. 2011. Pseudodendritic fungal epithelial keratitis in an extended wear contact lens user. *Eye Contact Lens* 37(1): 36-8.
- Kovaleva, J., Degener, J. E., van der Mei, H.C. 2010, Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *Journal of Hospital Infection* 76(04): 345-350
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*, 9th edn. São Paulo: Sarvier.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9.ed. São Paulo: Sarvier. 1104.
- Lattif, A. A., Mukherjee, P. K., Chandra, J., Swindell, , Lockhart, S. R. Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Ghannoum, M. A. 2010. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *International Journal of Medical Microbiology* 300 (04): 265–270
- Lazzell, A. L., Chaturvedi, A. K., Pierce, C.G., Prasad, D., Uppuluri, P., Lopez-Ribot, J. L. 2009. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64: 567–70.

- Levartovsky, S., Rosenwasser, G., Goodman, D. 2001. Bacterial keratitis after [correctio of following] laser in situ keratomileusis. *Ophthalmology* 108(2): 321-5.
- Lingappan, A., Wykoff, C. C., Albini, T. A., Miller, D., Pathengay, A., Davis, J. L., Flynn. 2012. Endogenous fungal endophthalmitis: causative organisms, management strategies, and visual acuity outcomes. *American Journal of Ophthalmology*, 154(1): 213-214.
- Locatelli, C. I.; Englert, G. E.; Kwitko, S.; Simonetti, A. B. 2004. Aderência bacteriana in vitro a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. *Arquivo Brasileiro Oftalmologia* 67:4-8.
- Maidana, E., González, R., Melo Júnior, L.A. S. de., Souza, L. B. De. 2005. Ceratite infecciosa em crianças: estudo microbiológico e epidemiológico em um hospital universitário de Assunção – Paraguai. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 68(6): 828-32.
- Manikandan, P., Varga, J., Kocsubé, S., Revathi, R., Raghavan, A., Dóczi, I., Németh, T., Venkatapathy, N., Vágvölgyi, C., Bhaskar, M., Manoharan, C., Samson R., Kredics, L. 2010. Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. *Journal of Medical Case Reports* 64:68.
- Mcleod, S.D., Isfahani, A.K., Rostamian, K., Flowers, C.W., Lee, P.P., McDonnell, P.J. 2004. The role of smears, cultures, and antibiotic sensitivity testing in the management of suspected infectious keratitis. *Ophthalmology* 103: 23-28.
- Murata, K., Umeda, N., Ozaki, H., Ichigashira, N., Kozawa, M., Yamaguchi, A., Uchio, E. 2009. A case of delayed-onset endophthalmitis caused by *Fusarium* after cataract surgery. *Folia Japonica de Ophthalmologica Clinica*. 2(12):1184-1188.
- Muzaliha, M. N., Adil H., Ibrahim, M., Shatriah I. 2009. *Candida glabrata* endophthalmitis following penetrating keratoplasty in a patient with negative donor rim culture. *Journal Cataract & Refractive Surgery* 35:598–602.
- Nath, R., Baruah, S., Saikia, L., Devi, B., Borthakur, A., Mahanta, J. 2011, Mycotic corneal ulcers in upper Assam. *Indian Journal of Ophthalmology* 59(5): 367-371

- Onurdag, F. K., Ozkan, S., Ozgen, S., Olmuş, H., Abbasoglu, U. 2011. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on soft contact lenses. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 249(4): 559-64.
- Paiva, L.C., Vidigal, P.G., Donatti, L., Svidzinski, T.I., Consolaro, Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron*. 502.M. E. 2012. isolates from 43(2-3): 497
- Panda, A., Sharma, N., Das, G., Kumar, N., Satpathy, G. 1997. Mycotic keratitis in children: epidemiologic and microbiologic evaluation. *Cornea* 16(3): 295-9.
- Paula, J. S., Bryk, A., Argemiro, J., Filho, L., Romão, E. 2006. Glaucoma secundário a endoftalmite bilateral por Secondary glaucoma associated with bilateral *Aspergillus niger* endophthalmitis in an HIV-positive patient: case report. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 69(3): 395-7.
- Pelegrín, L., Mesquida, M., Adán, A., Cervera, C., Bosch-Mestres, J., Esteban-Redondo, C., Juiz- González, P., Llorenç V., Miró, J.M. (2011). *Candida dubliniensis* endophthalmitis in a HIV- infected intravenous drug abuser. *Mycoses*. 54(6): 856-8.
- Proença-Pina, J., Ssi Yan Kai, I., Bourcier, T., Fabre, M., Offret, H., Labetoulle, M. 2010. Fusarium keratitis and endophthalmitis associated with lens contact wear. *International Ophthalmology* 30(1): 103-107.
- Qing-feng, L., Xiu-ying, J. Xiang-lan, W., Xu-guang S. 2009. Effect of topical application of terbinafine on fungal keratitis. *Chinese Medical Journal* 22(16): 1884-1888.
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., Williams, C. 2012. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology* (2012): 07-14
- Rensch, F., Schlichtenbrede, F.C., Jonas, J.B. 2010. Postoperative mycotic endophthalmitis. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 36(7): 1233-1234.
- Retuerto, M. A., Szczotka-Flynn, L., Ho, D., Mukherjee, P., Ghannoum, M. A. 2012. Efficacy of care solutions against contact lens associated fusarium biofilms. *Optometry and Vision Science* 89(4): 382-391

- Ricicová, M., Kucharíková, S., Tournu, H., Hendrix, J., Bujdáková, H., Van Eldere, J., Lagrou, K., Van Dijck, P. 2010. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. *Microbiology* 156(3): 909-19.
- Rodeau, N., Bourcier, T., Chaumeil, C., Borderie, V., Touzeau, O., Scat, Y., Thomas, F., Baudouin, C., Nordmann, J. P., Laroche L. 2002. Fungal Keratitis at the Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts: retrospective study of 19 cases. *Journal Francais D' Ophtalmologie* 25(9): 890-6.
- Safneck, J. R. 2012. Endophthalmitis: A review of recent trends. *Saudi Journal of Ophthalmology* 26(2): 181-189.
- Salera, C. M., Tanure, M. A. G., Lima, W. T. M., Campos, C. M., Trindade, F. C., Moreira, J. A. 2002. Perfil das ceratites fúngicas no Hospital São Geraldo Belo Horizonte-MG. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 65: 9-13.
- Salera, C. M., Tanure, M. A. G., Lima, W. T. M., Campos, C. M., Trindade, F. C., Moreira, J. A. 2002. Perfil das ceratites fúngicas no Hospital São Geraldo Belo Horizonte - MG. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia* 65(1): 9-13.
- Sallam, A., Taylor, S. R. J., Khan, A., McCluskey, P., Lynn, W. A., Manku, K., Pacheco, P. A., Lightman, S. 2012. Factors determining visual outcome in endogenous *Candida* endophthalmitis. *Retina* 32 (6): 1129-1134.
- Seneviratne, C. J., Silva, W. J., Jin, L. J., Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P. 2009. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of Oral Biology*. 54(11): 1052-60.
- Sengupta, J., Khetan, A., Saha, S., Banerjee, D., Gangopadhyay, N., Pal, D. 2012. *Candida* keratitis: Emerging problem in India. *Cornea* 31(4): 371-375.
- Sengupta, J., Saha, S., Khetan, A., Sarkar, S. K., Mandal, S. M. 2012. Effects of lactoferricin B against keratitis-associated fungal biofilms. *Journal of Infection and Chemotherapy*.
- Shin, J. Y., Kim, H. M., Hong, J. W. 2002. Keratitis caused by *Verticillium* species. *Cornea* 21(2): 240-2,

- Shirodkar, A. R. , Pathengay, A.,Flynn Jr, H. W., Albini,T. A., Berrocal,A. M., Davis,J. L., Lalwani,G. A., Murray, T. G., Smiddy,W. E., Miller D. 2012. Delayed-Versus Acute-Onset Endophthalmitis After Cataract Surgery . *American Journal of Ophthalmology* 153(3): 391- 398.
- Shivaprakash, M.R., Appannanavar, S.B., Dhaliwal, M.,Gupta A,Gupta, S.,Gupta A.,Chakrabarti, A. 2011.Colletotrichum truncatum: an unusual pathogen causing mycotic keratitis and endophthalmitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(8): 2894-8
- Sidrim, J.J.C, Rocha, M.F.G. 2004.Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan* S.A. 388p.
- Sigler, E.J.,Huang, J.J. 2012. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis masquerading as temporal arteritis and acute retinal necrosis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 20(3): 210-212.
- Silva, S., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. ,Azeredo, J. (2010). In Vitro Biofilm Activity of Non-*Candida albicans* Candida Species. *Current Microbiology* 61:534–540.
- Singh, G., Palanisamy, M., Madhavan, B., Rajaraman, R., Narendran, K., Kour, A., Venkatapathy, N. 2006. Multivariate analysis of childhood microbial keratitis in South India. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 35: 185–9.
- Singh, R., Shivaprakash, M.R., Chakrabarti, A. (2011). Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology* 157(9): 2611–2618.
- Sridhar, M. S., Garg, P., Bansal, A. K.; Gopinathan, U. 2000. *Aspergillus flavus* keratitis after laser in situ keratomileusis. *American Journal of Ophithalmology* 129(6): 802-4.
- Srinivasan, M., Upadhyay, M. P., Priyadarsini, B., Mahalakshmi, R., Whitcher, J. P. 2006. Corneal ulceration in south-east Asia III: prevention of fungal keratitis at the village level in south India using topical antibiotics. *British Journal of Ophthalmology* 90(12): 1472–1475.
- Suzuki, T., Nobuhide, H.,Tomoko, M.,Yukiko H., Kiyofumi M. 2007. Keratitis Caused by a Rare Fungus, *Malassezia restricta*. *Japanese Journal Ophthalmology* 51: 292– 294.

- Tanure, M. A., Cohen, E. J., Sudesh, S., Rapuano, C. J., Laibson, P. R. 2000. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania. *Cornea*, 19(3): 307-12.
- Thomas, P.A., Leck, A.K., Myatt, M. 2005. Characteristic clinical features as an aid to the diagnosis of suppurative keratitis caused by filamentous fungi. *British Journal of Ophthalmology* 89(12): 1554-8.
- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Lopez-Ribot, J. L. 2009. Design of a Simple Model of *Candida albicans* Biofilms Formed under Conditions of Flow: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Mycopathologia* 168(03): 101–109
- Verma, S., Tuft, S. J. 2002. *Fusarium solani* keratitis following LASIK for myopia. *British Journal Ophthalmology* 86(10): 1190–1191.
- Vieira, L.A. Ceratite micótica. In: Belfort J.R., Kara-José, N. 1997. *Córnea Clínicacirúrgica*. São Paulo: Roca; p.189-203.
- Villar-Vidal, M., Marcos-Arias, C., Eraso, E., Quindós, G. 2011. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enfermedades Infecciosas y microbiologia Clinica* 29(09): 660-665.
- Villena, G. K., Fujikawa, T., Tsuyumu, S., Gutiérrez-Correa, M. (2010). Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresource Technology* 101(6): 1920–1926.
- Wang, L., Sun, S., Jing, Y., Han, L., Zhang, H., Yue. 2009. Spectrum of fungal keratitis in central China. *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology* 37(8): 763-71.
- Wong, T.Y., Fong, K.S., Tan, D.T. 1997. Clinical and microbial epectrum of fungal keratitis in Singapore: a 5-year retrospective study. *Int. Ofhthalmology* 21(3): 127-30.
- Wykoff, C. C., Flynn Jr, H. W., Miller, D., Scott, I. U., Alfonso, E.C. 2008. Exogenous fungal endophthalmitis: microbiology and clinical outcomes. *Ophthalmology* 115(9): 1501-7.
- Xie, L., Zhai, H., Shi, W. 2007. Penetrating keratoplasty for corneal perforations in fungal keratitis. *Cornea* 26(2): 158-62.

- Yildiz, E.H., Abdalla, Y.F., Elsahn, A. F., Rapuano, C.J., Hammersmith, K. M., Laibson, P.R., Cohen, E.J. 2010. Update on fungal keratitis from 1999 to 2008. *Cornea* 29(12): 1406-11.
- Yilmaz, S., Ozturk, I., Maden, A. 2007. Microbial keratitis in West Anatolia, Turkey: a retrospective review. *International Ophthalmology* 27(4): 261-8.
- Zarkovic, A., Guest, S. 2007. *Scedosporium apiospermum* traumatic endophthalmitis successfully treated with voriconazole. *International Ophthalmology*. 27(6): 391-394
- Mukherjee, P.K., Chandra, J., Yu, C., Sun, Y., Pearlman, E., Ghannoum, M.A. 2012.Characterization of fusarium keratitis outbreak isolates: contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(8): 4450-7.
- Constantinou, M., Jhanji, V., Tao, L.W., Vajpayee, R.B. 2009.Clinical review of corneal ulcers resulting in evisceration and enucleation in elderly population. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 247(10):1389–1393.
- Harding, M.W., Marques, L.L., Howard, R.J., Olson, M.E., 2009. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in Microbiology*. 17(11): 475–480.
- Taneja, M., Ashar, J.N., Mathur, A., Nalamada, S., Garg, P. 2013. Microbial keratitis following vegetative matter injury. *International Ophthalmology* 33(2):117-23.
- Badiee, P. 2013.Mycotic Keratitis, a State-of-the-Art Review. *Jundishapur Journal of Microbiology* 6(5): 8561.
- Jacqueline, K. Ng., Frederick, W., Fraunfelder, Kevin, L., Winthrop. 2013. Review and Update on the Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment of Fungal Keratitis. *Current Fungal Infection Reports* 7(4):293-300.
- Thomas PA, Kalliamurthy J. 2013. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clinical Microbiology and Infection*. 19(3):210-20.
- Gajjar, D.U., Pal, A.K., Ghodadra, B.K., Vasavada, A.R. 2013.Microscopic evaluation, molecular identification, antifungal susceptibility, and clinical outcomes in fusarium, *Aspergillus* and, dematiaceous keratitis. *BioMed Research International*. 2013:605308.

Sangwan, J., Lathwal, S., Juyal, D., Sharma, N..2013. *Fonsecaea Pedrosoi*: A Rare Etiology in Fungal Keratitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 7(10): 2272-2273.

Troke, P., Obenga, G., Gaujoux, T., Goldschmidt, P., Bienvenu, A.L., Cornet, M., Grenouillet, F., Pons, D., Ranque, S., Sitbon, K., Chaumeil, C., Borderie, V.,

Lortholary, O. 2013.The efficacy of voriconazole in 24 ocular *Fusarium* infections. *Infection*. 41(1):15-20.

Shen X, Xu G (2009) Vitrectomy for endogenous fungal endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm* 17:148–152.

Kim, M.J., Yu, F., Aldave, A.J. 2013. Microbial keratitis after Boston type I keratoprosthesis implantation: incidence, organisms, risk factors, and outcomes. *Ophthalmology*. 120(11):2209-16.

Baranyi, N., Kocsubé, S., Szekeres, A., Raghavan, A., Narendran, V., Vágvölgyi, C., Panneer Selvam, K., Babu Singh, Y.R., Kredics, L., Varga, J., Manikandan, P. 2013. Keratitis caused by *Aspergillus pseudotamarii*. *Medical Mycology Case Reports*. 12(2):91-4.

Garg, P. 2012. Fungal, mycobacterial, and *Nocardia* infections and the eye: an update. *Eye*. 26: 245-251.

Henry, C.R., Flynn, Jr. H.W., Miller, D., Forster, R.K., Alfonso, E.C. 2012.Infectious keratitisprogressing to endophthalmitis: a 15-year study of microbiology, associated factors, and clinical outcomes. *Ophthalmology*. 119: 2443-2449.

Leema, G., Kaliasurthy, J., Geraldine, P., Thomas, P.A. 2010. Keratitis due to *Aspergillus flavus*: clinical profile, molecular identification of fungal strains and detection of aflatoxin production. *Molecular Vision*; 16: 843-854.

Mochizuki, K., Niwa, Y., Ishida, K., Kawakami, H. 2013. Intraocular penetration of itraconazole in patient with fungal endophthalmitis. *Int Ophthalmol*. 33: 579-581.

- Lin, M., Zhang, W., Liu, Y., Wang, L., Ding, Y., Wu, X., Shi, Y., Sun, L., Li, Y. 2011. Nosocomial acute-onset postoperative endophthalmitis at a university teaching hospital in China. *Journal of Hospital Infection*. 79 323 e 327.
- Chhablani, J. Fungal endophthalmitis. 2011. *Expert Rev Anti Infect Ther.*; 12:1191-201.
- Hashemi, S.B., Shishegar, M., Nikeghbalian, S., Salahi, H., Bahador, A., Kazemi, K., Dehghani, M., Kakaei, F., Gholami, S., Janghorban, P., Malek-Hosseini, S.A. 2009. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis occurring after liver transplantation: a case report. *Transplant Proc.* 41:2933-5.
- Chander, J., Singla, N., Gulati, N., Sood, S. 2011. *Fusarium sacchari*: a cause of exogenous fungal endophthalmitis: first case report and review of literature. *Mycopathologia*. 17:431-4
- Wyckoff, C.C., Parrott, M.B., Flynn, Jr. H.W., Shi, W., Miller, D., Alfonso, E.C. 2010. Nosocomial acute-onset postoperative endophthalmitis at a university teaching hospital (2002–2009). *Am J Ophthalmol.*; 150:392–8.
- Sridhar, J., Flynn, H.W., Jr., Kuriyan, A.E., Miller, D., Albini, T. 2013. Endogenous fungal endophthalmitis: risk factors, clinical features, and treatment outcomes in mold and yeast infections. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 3:60
- Lamaris, G.A., Esmali, B., Chamilos, G., Desai, A., Chemaly, R.F., Raad, II, Safdar, A., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P. 2008. Fungal endophthalmitis in a tertiary care cancer center: a review of 23 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27:343-7
- Rensch, F., Schlichtenbrede, F.C., Jonas, J.B. 2010. Postoperative mycotic endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg.* 36:1233-1234.
- Espinosa-Heidmann, D.G., McMillan, B.D., Lasala, P.R., Stanley, J., Larzo, C.R. 2012. *Candida dubliniensis* endophthalmitis: first case in North America. *Int Ophthalmol.*; 32:41-5.
- Mattos, F.B., Saraiva, F.P., Angotti-Neto, H., Passos, A.F. 2013. Outbreak of *Ochrobactrum anthropi* endophthalmitis following cataract surgery. *Journal of Hospital Infection.* 83: 337- 340.

Jalili, M., Hashemi, H., Jabarvand, M., Tabatabai, S.A. 2012. *Aspergillus* Endophthalmitis in One Eye Subsequent to Bilateral Anterior Chamber Phakic Intraocular Lens Implantation. *J Refract Surg.* 28:363-5.

Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. 1995. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study: a randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. *Arch Ophthalmol.* 113:1479-1496.

Moinfar, N., Smiddy, W.E., Miller, D., Miller, D., Herschel, K. 2007. Posttraumatic *Aspergillus terreus* endophthalmitis masquerading as dispersed lens fragments. *J Cataract Refract Surg.* 33: 739–740.

Comez, A.T., Komur, B., Akcali, A., Otkun, M.T. 2012. Ocular aspergillosis: Obtaining a specimen is crucial for diagnosis. A report of three cases. *Med Mycol Case Rep.*; 16:39-41. Yavas, G.F., Oztürk, F., Küsbeci, T., Cetinkaya, Z., Ermis, S.S., Kiraz, N., Inan, U.U. 2008. Antifungal efficacy of voriconazole, itraconazole and amphotericin b in experimental *Fusarium solani* keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 246:275-9.

Sigler, E.J., Huang, J.J. 2012. Endogenous *Aspergillus* endophthalmitis masquerading as temporal arteritis and acute retinal necrosis. *Infectious Diseases in Clinical Practice.* 20: 210- 212.

Koc, A., Onal, S., Yenice, O., Kazokoglu, H. 2010. Pars plana vitrectomy and intravitreal liposomal amphotericin B in the treatment of *Candida* endophthalmitis. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging*; 9:1–3.

Lingappan, A., Wykoff, C.C., Albin, T.A., Miller, D., Pathengay, A., Davis, J.L., Flynn, Jr. H.W. 2012. Endogenous fungal endophthalmitis: Causative organisms, management strategies, and visual acuity outcomes. *American Journal of Ophthalmology.* 153: 162-166.

APÊNDICES - ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO

**Apêndice A - *Aspergillus parasiticus* endophthalmitis following eye
evisceration**

Artigo submetido para a revista EYE

***Aspergillus parasiticus* endophthalmitis following eye evisceration**

Elvislene C. Soares Leite; Danielle Patrícia Cerqueira, Macêdo; Alan slony Siqueira;
Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto; Rejane Pereira Neves *.

***Correspondência para:** Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária,
Recife-PE, CEP: 50670-420. Fone:812126.8481, Fax: 81.2126.8480

e-mail: rejadel@yahoo.com

***Aspergillus parasiticus* endophthalmitis following eye evisceration**

1 INTRODUÇÃO

A progressão de ceratite fúngica e endoftalmite é relativamente incomum embora espécies de *Aspergillus* possam ser envolvidos (Garg,2012; Henry et al.2012; Sridhar et al.2013). Aqui descrevemos um caso de endoftalmite por *A parasiticus* com evisceração ocular.

1.1 RELATO DE CASO

Um paciente 46 anos de idade do sexo masculino imunocompetente tinha um histórico de trauma do olho esquerdo por palha de arroz há seis dias. Ele foi atendido naquele momento queixando-se de dor e sensação de corpo estranho. Ao exame clínico do olho esquerdo foi observado exsudato, hiperemia de conjuntiva e úlcera de córnea medindo 3,5 e 2,8 mm com bordas irregulares mal definidas, defeito epitelial, edema estromal e infiltrado. Além disso, ele relatou o uso prévio de ceftazidima e vancomicina. Após seis dias, ele apresentou afinamento de córnea, hipópio, perda visual e segmento posterior mal visualizado. Subsequentemente, o tamanho da úlcera aumentou para 4,0 e 5,5 milímetros sendo então realizado debridamento. Além de lavagem de câmara anterior, os antibióticos foram suspensos para a administração de cefalotina e gentamicina.

Devido ao afinamento da córnea, aumento da úlcera medindo 7,2 e 6,8mm e sinais clínicos como edema e opacidade da córnea diagnóstico laboratorial foi realizado por meio de exame direto e cultura após o consentimento do paciente. Estes testes foram conclusivos para *Aspergillus parasiticus* como o agente etiológico (Figura1). Em seguida, o paciente foi tratado com a anfotericina B, sem sucesso e submetidos a ceratoplastia terapêutica. Os procedimentos terapêuticos foram ineficientes por este motivo, um recobrimento conjuntival seguido por uma segunda lavagem da câmara anterior, manutenção dos antibióticos e colocação de lentes de contato terapêuticas foram feitas com piora do quadro clínico. A endoftalmite foi diagnosticada em fase posterior e *Aspergillus parasiticus* também foi cultivado a partir de amostra do vítreo. A evisceração foi feita e uma esfera colocada na cavidade ocular.

Comentários

Consideramos que a demora na procura de cuidados oftalmológicos após o trauma e no diagnóstico micológica conduziu para a progressão da lesão ocular para os tecidos mais profundos (Mochizuki et al.,2012). Adicionalmente, o uso de antibacteriano empírico contribuiu ainda mais para o desenvolvimento da infecção emergente.

Micoses oculares são doenças raras que apresentam crescimento progressivo com destruição da córnea e diminuição da visão sendo necessário diagnóstico precoce para tratamento eficaz visando redução dos danos causados. Além disso, o uso de antibacterianos empíricos contribui ainda mais para o desenvolvimento de infecção emergente. *A. parasiticus* é um fungo produtor de aflatoxina que provoca efeitos deletérios. Sendo este o primeiro relato de *Aspergillus parasiticus* como agente etiológico de endoftalmite em pacientes imunocompetente.(Leema et al.,2010).

Apêndice B - Fungal Endophthalmitis Due to *Aspergillus terreus* Following Cataract Surgery: A Case Report

Artigo a ser submetido para a revista Journal of Hospital Infection

Endoftalmite fúngica por *Aspergillus terreus* após cirurgia de catarata:

Relato de Caso

Elvislene C. Soares Leite; Reginaldo G Lima-Neto, Armando Marsden Lacerda Filho, Ronaldo França, Rejane Pereira Neves *.

Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670- 910, Recife, Brasil.

***Correspondência para:** Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP:50670-420. Fone:812126.8481,Fax 81.2126.8480
e-mail: rejadel@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: Relatar quatro casos de endoftalmite fúngica de origem nosocomial causada por *Aspergillus terreus* após a cirurgia de catarata. **Relato de caso:** quatro pacientes do sexo feminino com 51, 51, 64, e 86, anos respectivamente, apresentaram diminuição da acuidade visual três dias após terem submetidas a uma cirurgia de catarata no olho esquerdo. Amostras de humor vítreo foram coletadas e exame direto da amostra vítrea mostrou hifas septadas com ramificação em ângulo agudo. A cultura de amostras do vítreo após sete dias de incubação foi identificado através das características morfológicas *A. terreus*. Após esses resultados foi iniciado tratamento com fluconazol (450mg), anfotericina B e injeção intravítrea de voriconazol. A remoção da lente intra-ocular foi indicado e realizada vitrectomia por causa da perda de visão gradual e inflamação local. Após repetidas injeções intravítreas de antifúngicos, além de antifúngico tópico, a inflamação no olho foi finalmente controlada. No entanto não houve recuperação da visão nos quatro casos. **Conclusão:** Endoftalmite causada por *A. terreus* é uma complicação rara após a cirurgia de catarata. O diagnóstico é difícil por amostra do humor aquosa, porém, é possível na amostra da LIO removida ou cápsula da lente. Em casos refratários como este, é recomendado vitrectomia combinada com aspiração da amostra.

Palavras-chave: Endoftalmite fúngica. Infecções oculares. *Aspergillus terreus*. Extração de catarata.

1 INTRODUÇÃO

Endoftalmite é uma condição ocular grave com resultados visuais potencialmente devastadores e pode ser endógena ou exógena, dependendo do modo de infecção [1,2]. A contaminação endógena pode ocorrer através de disseminação hematogênica do agente etiológico. No caso de contaminação exógena, o agente pode ser inoculado por perfuração na córnea ou cirurgias intra-oculares [3,4].

O microrganismo mais comum causador da endoftalmite fúngica é a *Candida albicans*, seguido por fungos filamentosos, tais como espécies de *Aspergillus* [3]. Espécies de *Fusarium* e fungos emergentes, incluindo *Scedosporium* e outros da classe dos Zygomycetes já foram encontrados causando essa micose [5,6].

O processo infeccioso começa dentro da coróide, passando para a retina e progride para para o vítreo, causando resposta inflamatória proporcional ao estado imunológico do hospedeiro [7]. Endoftalmite fúngica é uma complicação rara após cirurgia de catarata, sendo necessário o diagnóstico precoce para o tratamento eficaz e redução dos danos causados. Contudo, apesar de ser difícil, o diagnóstico é possível, através da cultura da amostra de vítreo de lentes intra-oculares ou cápsula das lentes [4,7].

O objetivo deste estudo foi relatar quatro casos de endoftalmite fúngica nosocomial causada por *Aspergillus terreus* após cirurgia de catarata. Os isolados teve sua identificação realizada pelo método clássico, através da análise da morfologia macroscópica e microscópica e sua semelhança por análise molecular.

1.1 RELATO DE CASO

Quatro mulheres com idades de 51, 51, 64, e 86 anos, respectivamente, submeteram a cirurgia de catarata com implante de lente intra-ocular no olho esquerdo, no mesmo dia em uma Unidade de Saúde Pública, Recife, Brasil. Três dias após a cirurgia, as pacientes se queixaram de desconforto ocular, fotofobia, dor e diminuição da acuidade visual no olho esquerdo. A biomicroscopia do olho esquerdo revelou hiperemia conjuntival, um ligeiro efeito de Tyndall e células em reação de câmara anterior 4⁺ sem hypopyon, inflamação vítrea com

celularidade intensa e detritos esbranquiçados. Estes resultados foram sugestivos de endoftalmite. As pacientes estavam usando vigadex de hora em hora e predfort de 6/6 horas por via tópica, além de e prednisona 60mg desde a cirurgia.

Amostras vítreas das quatro pacientes foram coletadas e enviadas para o laboratório de micologia, Universidade Federal de Pernambuco. A microscopia direta do aspirado vítreo/aquoso foi realizada, e as amostras foram semeadas em duas placas de ágar Sabouraud dextrose adicionada de cloranfenicol e incubadas a 25°C e 37°C. As pacientes foram inicialmente tratadas empiricamente com vancomicina intravítrea/ceftazidima e dexametasona 0,1 mL/dia.

Ao exame direto da amostra vítrea foi observada hifas septadas com dicotomia (Fig.1). Após 7 dias de incubação, colônia velutíneas plana com micélio e reverso amarelo foi observada (Fig. 2). A montagem de lactofenol azul de algodão mostrou cabeças de aspergilar em colunas compactas (Fig. 3). O microrganismo foi identificado morfológicamente como *A. terreus*. Após estes resultados, o tratamento foi alterado para 450 mg de fluconazol duas vezes ao dia, anfotericina B (2/2hs) e injeção intravítrea voriconazol .

Testes de sensibilidade antifúngica mostraram que os isolados clínicos de *A. terreus* foram resistentes a anfotericina B, fluconazol e voriconazol apresentando Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 16, 64 e 256 g/mL, respectivamente, no entanto, mostraram-se sensíveis à caspofungina com MIC de 0,032 g /mL. Além disso, a similaridade entre os quatro isolados clínicos obtidos das quatro pacientes foi confirmada por análise molecular, entre seqüência inter simples repetidas (ISSR) usando primers UBC 809, UBC 810 e UBC 834, confirmando a infecção nosocomial (Fig. 4).

As pacientes apresentaram piora do estado clínico sendo observado por ultra-som, pseudofacial, ecos pontiformes e formação de membrana ao redor da lente intra-ocular (LIO), além de quantidade cavitações compatíveis com processos inflamatórios. A remoção da lente intra-ocular foi indicada e vitrectomia foi realizada devido a perda de visão gradual e inflamação local. Após repetidas injeções intravítreas de antifúngicos, além de uso de antifúngico tópico, a inflamação no olho foi finalmente controlada. Contudo, não houve nenhuma recuperação de visão em nenhuma das quatro pacientes.

1.2 DISCUSSÃO

Endoftalmite fúngica é rara no pós-operatória, porém uma complicação devastadora da cirurgia intra-ocular, a qual apresenta prognóstico desfavorável e resulta em perda da visão em muitos casos. Remoção da catarata, seguida da colocação de uma lente protética e

transplante de córnea são os procedimentos cirúrgicos mais frequentemente associados com endoftalmite fúngica exógena pós-operatório [8,9]. Os sintomas mais comumente encontrados em infecções intra-ocular são visão embassada, dor e fotofobia [10].

A incidência de endoftalmite no pós-operatório depende do tipo de cirurgia. Temos visto que pacientes submetidos a implante de LIO secundário teve uma maior incidência de endoftalmite que os pacientes submetidos a outros tipos de cirurgia. Este achado está de acordo com observações de Lin et al. [1].

Nos casos relatados, as pacientes desenvolveram reação inflamatória exacerbada apenas no olho operado. A aparente ausência de comprometimento sistêmico ou outros fatores de risco como diabetes mellitus, doença hepática, insuficiência renal, câncer, cirurgia sistêmica, transplante de órgãos, HIV/AIDS, uso de drogas intravenosas, terapia imunossupressora e associação com cirurgia intra-ocular, leva a hipótese de contaminação ocular exógena.

Apesar de cuidados de assepsia e anti-sepsia utilizados rotineiramente durante as cirurgias, a possibilidade de contaminação através de via materiais cirúrgicos ou drogas contaminadas, embora improvável, deve ser considerada como uma possível causa de infecção [11]. A causa mais provável do surto endoftalmite por *A. terreus* foi a contaminação do campo cirúrgico pela malha usada. Acredita-se que, deve seguir o protocolo de esterilização correta, para que não ocorram mais casos nos processos subsequentes.

Seguindo as orientações do Grupo de Estudos Vitrectomy Endophthalmitis [12] pacientes com suspeita de endoftalmite recebem inicialmente tratamento empírico com antibióticos intravítrea adicionado de dexametasona e amostras vítreas foram recolhidas para investigação microbiológica. Devido à dificuldade de diagnóstico e raridade desta doença em centros de referência, o oftalmologista não suspeita de endoftalmite por *Aspergillus* como causa da queixa do paciente no primeiro exame oftalmológico [3,13]. O diagnóstico de endoftalmite fúngica depende essencialmente da utilização de métodos laboratoriais para o isolamento do patógeno [14]. No presente estudo, o diagnóstico clínico de endoftalmite por *Aspergillus* foi realizado pelo exame direto e cultura positiva da amostra vítrea. Concordamos que o diagnóstico e identificação de agente fúngico, além de teste de sensibilidade antifúngica são essenciais para a terapia adequada e específica para o paciente, uma vez que as estratégias de tratamentos variam de acordo com a espécie fungica.

Aspergillus é o fungo filamentosos mais comum causador de infecções oculares e a maioria dos casos de endoftalmite são causadas por espécies de *Fusarium* e de espécies de *Aspergillus*. Entre as espécies de *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, ou *A. niger* são

comuns, no entanto, *A. terreus* é muito raro [3,4,11,15,16]. Apesar do desenvolvimento de novos antifúngicos e os avanços na cirurgia de vitrectomia, o tratamento da endoftalmite fúngica ainda é um desafio para oftalmologia. A anfotericina B é o agente anti-fúngico mais comumente usado na infecção fúngica intra-ocular e é administrado com pelo menos, dois agentes antifúngicos diferentes, na maioria dos casos [15,18]. Nos nossos achados, optou-se por injeção intravítrea de voriconazol, anfotericina B tópica e fluconazol oral, no entanto, os pacientes não responderam satisfatoriamente ao tratamento e a vitrectomia foi realizada.

A vitrectomia é indicada em casos de resultados desfavoráveis, remoção de material inflamatório e complicações de tratamento. De fato, a terapia bem sucedida de endoftalmite fúngica associada com fluconazol sistêmica e anfotericina B combinada a vitrectomia tem sido descrita na literatura.



Figura 1. Septate hyphae with acute-angle branching (Lactophenol - 40X) (A), *A. terreus*, macroscopia (B) e microscopia (C)

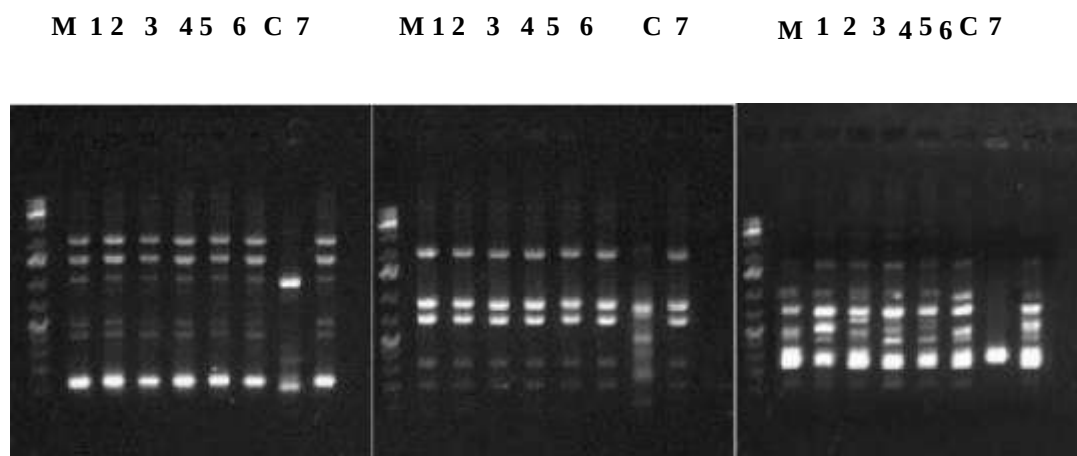


Figure 2. Padrão de PCR para os primers UBC809, UBC 810 e UBC834. Linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são perfil de DNA de *Aspergillus terreus* isolados de pacientes com endoftalmite. 421(contact lens), 421(vitreous humor), 422 (crystalline), 422 (vitreous humor), 432 (crystalline), 423 (contact lens), 458 (vitreous humor), respectively. Linha M, ladder; linha C perfil de DNA para o controle externo *Aspergillus fumigatus*.

**APÊNDICE C- PERFIL DA CERATITE FÚNGICA EM SERVIÇO OFTALMOLÓGICO
DE REFERENCIA EM PERNAMBUCO-BRASIL**

Artigo a ser submetido para a revista

JORNAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

**PERFIL DA CERATITE FÚNGICA EM SERVIÇO OFTALMOLÓGICO DE
REFERENCIA EM PERNAMBUCO-BRASIL**

Elvislene C. Soares Leite; Alan Slony Siqueira; Rejane Pereira Neves *.

Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

***Correspondência para:** Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária,
Recife-PE, CEP: 50670-420. Fone: 812126.8481,
Fax: 81.2126.8480 e-mail:rejadel@yahoo.com

INTRODUÇÃO:

Micoses oculares, incluindo as ceratites, manifestam-se clinicamente em situações de caráter oportunista e multifatorial. **OBJETIVO:** Identificar os agentes etiológicos e avaliar aspectos epidemiológicos da ceratite fúngica em pacientes atendidos na emergência em serviço oftalmológico, Recife-PE, no período de Fevereiro 2011 a Maio de 2012. **MÉTODOS:** Foram coletados 73 raspados de córnea de pacientes com ceratite infecciosa e encaminhados para o Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco. Eles foram fixados e corados pelos métodos de Gram e Giemsa, realizado exame direto e semeados em meios de culturas ágar sangue, ágar Sabouraud e BHI (Brain- Heart-Infusion). **RESULTADOS:** Dos 73 pacientes com ceratite infecciosa, 15(20,5%) eram fúngicas. Destes, 09(60%) foram *Fusarium solani*, 04(26,6%) *F. oxysporum*, 01 (6,67%) *Aspergillus fumigatus*, e 01 (6,67%) *A. parasiticus*. Dos casos positivos para ceratite fungica, 08 (53%) eram do sexo masculino e 07 (47%) do sexo feminino. Com relação às atividades laborais, 06 eram agricultores 05 eram donas de casa, 01 cozinheiro, 01 vendedor, 01 mestre de obras e 01 auxiliar de serviços gerais, trauma com matéria vegetal foram relatados por 04 pacientes (16%). O tempo médio de inicio dos sintomas e chegada ao serviço foi de 07 dias, variando de 01 a 30 dias. A ceratoplastia penetrante foi realizada em 08 (53,0%) dos casos e Recobrimento conjuntival foi realizado em 07 (47,0%) pacientes, sendo dois casos submetidos a evisceração. **CONCLUSÃO:** O agente etiológico mais frequente foi o *Fusarium solani*, sendo correlacionada a traumatismo ocular com matéria vegetal em uma parcela da população. Homens de meia idade são os mais acometidos. A Anfotericina B tópica se mostrou eficaz, porém metade dos pacientes necessitou de ceratoplastia penetrante, sendo dois casos submetidos à evisceração.

Palavras-chaves: Ceratite infecciosa. Ceratite fúngica. Micose ocular

ABSTRACT

INTRODUCTION: Ocular mycosis, including infectious keratitis, are clinically apparent in opportunists and multifactorial situations. To identify the etiologic agents and evaluate epidemiological aspects of fungal keratitis in patients treated in emergency ophthalmological services, Recife-PE, in the period February 2011 to May 2012. **METHODS:** We collected 73 corneal scrapings of patients with infectious keratitis and referred to the Medical Mycology Laboratory, Federal University of Pernambuco. They were fixed and colored by Gram and Giemsa methods, have been done the direct exam and sowed in means of cultures ágar blood, ágar Sabouraud and BHI (Brain-Heart-Infusion). **RESULTS:** Of the 73 patients with infectious keratitis, 15 (20.5%) were fungal. Of these, 09 (60%) were *Fusarium solani*, 04(26.6%) *F. oxysporum*, 01 (6.67%), *Aspergillus fumigatus*, and 01 (6.67%) *A. parasiticus*. Of the cases positive for CF, 08 (53%) were male and 07 (47%) were female. With respect to labor activities, 06 were farmers, 05 were housewives, and 04 patients (16%) reported 01 cook, 01 salesman, 01 master works and 01 general service aid, trauma with vegetable matter. The average time of onset of symptoms and arrival at the service was 07 days, ranging from 01 to 30 days. A penetrating keratoplasty was performed in 08 (53.0%) cases, and conjunctival Coating was performed in 07 (47.0%) patients, two patients who underwent evisceration. **CONCLUSION:** The most frequent etiologic agent in our region was the *Fusarium solani*, being correlated with ocular trauma with vegetable matter in a portion of the population. Amphotericin B topical is effective, but half of the patients required penetrating keratoplasty and two were submitted to evisceration.

KEYWORDS: Infectious keratitis. Fungal keratitis. Ocular Mycosis

1 INTRODUÇÃO

Fungos são microrganismos que podem provocar diversos quadros clínicos no organismo humano. A gravidade da infecção varia desde as formas cutâneas leves até quadros fatais que levam à septicemia (Hofling-Lima et al. 2005, Nath et al. 2011). Aproximadamente 100 mil espécies de fungos são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em seres humanos (Hofling-Lima et al. 2005, Singh et al. 2006).

Alterações orgânicas gerais e locais, traumatismos, processos alérgicos oculares e outros fatores auxiliam a associação bactério-micótico facilitando a adaptação dos fungos à vida parasitária, aumentando-lhe, igualmente o poder patogênico. Ceratite, úlceras de córneas, hipópio, uveíte, endoftalmite e cório-renite constituem manifestações frequentes no decurso das micoses oculares (Lacaz et al. 2002).

As micoses oculares incluindo as ceratites manifestam-se clinicamente em situações de caráter oportunista e multifatorial (Hofling-Lima, et al 2005, Nath et al. 2011). Ocorrendo na presença de fatores que propiciam a modificação da microbiota conjuntival (por medicações tópicas ou condições climáticas favoráveis), a destruição das defesas locais (trauma, cirurgias ou doenças oculares prévias), ou diminuição da resistência do hospedeiro (doenças sistêmicas ou drogas imunossupressoras) (Hofling-Lima et al. 2005; Bahadir et al. 2012).

A ceratite fúngica pode apresentar-se com sinais e sintomas que não permitem distingui-la de uma ceratite bacteriana, parasitária ou viral, sendo necessária 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 (Oliveira et al. 2001).

Os agentes etiológicos de ceratite fúngica mais comumente registrados na prática médica são *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, *C. albicans*; *Fusarium solani*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*; *Actinomyces israeli*, *Acremonium spp.*, *Paecilomyces lilacinus* (*P. lilacinum*), *P. variotii*, *Rhinosporidium seeberi*, *Paracoccidioides brasiliensis* e outros fungos dimórficos (Klotz et al 2000).

Infecções por espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* são mais comuns em áreas rurais estando associada a trauma ocular envolvendo matéria orgânica, já espécies de *deandida* (leveduras) está associada a doenças oculares crônicas e em pacientes imunodeprimidos (Andrade et al. 2000; Sengupta et al. 2012).

As ceratites infecciosas e dentre elas, as ceratites fúngicas têm assumido papel importante na oftalmologia por sua crescente incidência (Carvalho et al. 2001, Singh et al. 2006). Atualmente cerca de 30.000 novos casos por ano são reportados nos Estados Unidos da América (Mcleod et al. 1992; Carvalho et al. 2002). Este fato pode ser atribuído ao desenvolvimento e ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro e de corticoides, uso de lentes de contato, aumento do número de cirurgias corneanas (Salera et al. 2001, Garcia-Delpech et al. 2010, Cariello et al. 2011).

Assim, esta pesquisa objetivou identificar os agentes etiológicos e aspectos epidemiológicos da ceratite fúngica em pacientes atendidos em serviço de emergência oftalmológica pública na cidade do Recife-PE.

1.1 PACIENTES E MÉTODOS

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 Fevereiro de 2011 a Maio de 2013 foram atendidos 308 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 gênero, 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).

1.2 RESULTADOS

No período avaliado foram diagnosticados 15 casos (15 olhos) de ceratite fúngica. As principais manifestações clínicas apresentadas foram hiperemia de conjuntival, úlcera de córnea e hipópio (Figura1). Todos confirmados através do diagnóstico laboratorial micológico. Ao Exame direto foram visualizados vários filamentos micelianos hialinos e septados (figura 2).

Dos casos positivos para ceratite fúngica, 08 (53%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 07 (47%) sexo feminino. A média de idade foi de 50 anos, variando de 31 a 78 anos. Com relação às atividades laborais, seis (40%) pacientes eram agricultores, cinco (33,3%) era donas de casa, um (6,6%) cozinheiro, um (6,6%) vendedor, um (6,6%) mestre de obras e um (6,6%) auxiliar de serviços gerais. Os fatores associados por trauma ocular foram referidos por seis (40%) pacientes, destes, quatro (16%) dos pacientes com material vegetal. A tabela 1 representa um quadro resumo dos aspectos etiológicos, epidemiológicos e perfil de tratamento dos casos de ceratite fúngica apresentados neste estudo.

O tempo médio de início dos sintomas e chegada ao serviço foi de sete dias, variando de 01 a 30 dias. Oito pacientes foram provenientes de Recife/região

metropolitana e sete do interior do estado de Pernambuco. Os pacientes da capital e região metropolitana apresentaram uma média de cinco dias para entrada no serviço oftalmológico e os pacientes do interior uma média de nove dias.

Quanto aos agentes causadores de ceratite fúngica, foi identificado *F. solani* com nove (60%) casos, *F. oxysporum*, quatro (26,6%), *A. fumigatus* e *A. parasiticus* com um (6,67%) caso cada (Figura 3). Anfotericina B tópica foi iniciada em 13(86,6%) pacientes sendo substituída por natamicina tópica em dois (13,3%) casos. Cetoconazol sistêmico foi utilizado em seis (40%) pacientes. Todos os pacientes utilizaram antibiótico tópico.

O procedimento de ceratoplastia penetrante foi realizado em oito (53,0%) dos casos, sendo a lavagem de câmara anterior com anfotericina B, realizada previamente em oito (53,0%) desses pacientes. O recobrimento conjuntival foi realizado em sete (47,0%) pacientes, sendo que destes, dois casos submetidos à evisceração.

Dos sete pacientes que não foram submetidos à ceratoplastia penetrante, cinco foram submetidos ao recobrimento conjuntival associado à lavagem de câmara anterior com anfotericina B, resultando na melhora do quadro infeccioso.

Tabela 1. Resumo geral da etiologia, epidemiologia e tratamento de casos de ceratite fúngica em pacientes atendidos em clínica de serviços oftalmológicos de referência no estado de Pernambuco.

Nº	Idade	Sexo	Trauma	Profissão	Agente	Antifúngico Tópico	Antifúngico Sistêmico	Ceratoplastia Penetrante	Recidiva no Enxerto
1	78	F	-	Dona de casa	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Anfotericina B	-	Sim	-
2	31	F	-	Dona de casa	<i>Fusarium solani</i>	Anfotericina B /Natamicina	-	-	-
3	47	M	Palha de arroz	Agricultor	<i>A. parasiticus</i>	Anfotericina B	-	Sim	Sim
4	50	F	-	Dona de casa	<i>F. solani</i>	Anfotericina B	Cetoconazol	-	-
5	45	M	-	Mestre de obras	<i>F. oxysporum</i>	Anfotericina B	Cetoconazol	-	-
6	52	M	-	Agricultor	<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-
7	46	M	Pedra	Vendedor	<i>F. solani</i>	Anfotericina B	-	Sim	-
8	56	F	-	Dona de casa	<i>F. solani</i>	Anfotericina B	-	-	-
9	59	F	-	Cozinheira	<i>F. oxysporum</i>	Anfotericina B	Cetoconazol	Sim	-
10	34	F	-	Agricultor	<i>F. solani</i>	Natamicina	Cetoconazol	-	-
11	64	M	Palha de coco	Agricultor	<i>F. solani</i>	Anfotericina B	-	Sim	-
12	52	M	-	Serviços gerais	<i>F. solani</i>	Anfotericina B	-	Sim	-
13	57	F	-	Dona de casa	<i>F. oxysporum</i>	Anfotericina B	Cetoconazol	Sim	-
14	48	M	Pedra	Agricultor	<i>F. solani</i>	Anfotericina B	-	Sim	-
15	40	M	-	Agricultor	<i>F. solani</i>	Anfotericina B	Cetoconazol	-	-

1.3 DISCUSSÃO

Ceratite fúngica é uma infecção que afeta principalmente o epitélio da córnea, estroma com envolvimento do endotélio e da câmara anterior do olho em casos graves (Taneja et al., 2013). Mais de 50 gêneros de fungos já foram descritos como agente etiológico dessa infecção, sendo, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Curvularia*, e *Candida* os mais comuns em todo mundo (autor).

Esta infecção ocorre com maior frequência na população rural, sendo os homens mais acometidos. No presente estudo observou-se maior número de pacientes do gênero masculino acometidos por ceratite fúngica sugerindo maior exposição desse grupo de pacientes aos agentes predisponentes (Yildiz et al., 2008; Jastaneiah et al., 2011).

Relato de trauma ocular com matéria vegetal foi referida nesse estudo em 16% dos pacientes. Este resultado está de acordo com dados obtidos por Ibrahim et al. (2011). Os referidos autores associam trauma vegetal como relato agravante para originar as ceratites fúngicas. Outros autores também afirmam que trauma com lesão de córnea, em especial com material de origem vegetal, é considerado como o principal fator de risco para o desenvolvimento de ceratite fúngica. O uso de lentes de contatos também é bastante relatado, porém não encontrado nesta pesquisa (Hofling-Lima et al. 2005, Yildiz et al. 2010, Knappe et al. 2011).

Dos pacientes estudados, 43,5% eram procedentes de zona rural, sendo todos os demais, da capital e região metropolitana do Recife. No presente estudo as atividades agrícolas constituíram a maioria dos casos, sendo um total 40,0% das atividades laborais relatadas. Uma correlação entre atividades agrícolas e um aumento no número de casos no período de safra foi sugerida por outros autores (Ibrahim et al. 2008).

A cultura foi positiva em 15 amostras, procedidas de 15 pacientes que totalizou 20,54% do total de casos suspeitos de ceratite fúngica. Na literatura encontramos um índice de culturas negativas que varia de 40 a 70% dos casos, caracterizando a dificuldade de isolamento de fungos por cultura (Yilmaz et al. 2007). A variação destes níveis pode ser atribuída a uma série de fatores que incluem coleta inadequada do material, tratamento prévio com antibióticos e uso de anestésico tópico na obtenção da amostra (Badenoch et al. 2005). Embora um exame minucioso possa ajudar na formulação de um diagnóstico clínico, as ceratites fúngicas continuam sendo motivo de dúvida entre as causas de ceratites infecciosas. Os sinais mais sugestivos de ceratite fúngica são margens hifadas, bordas elevadas, presença de fibrina na superfície da lesão e lesão com outra cor que não amarela (Thomas et al. 2005).

O agente etiológico mais citado em nossa pesquisa foi *F. solani* (nove casos), que constituiu 60% das amostras com cultura positiva. O outro agente isolado foi o *A. fumigatus* (dois casos). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores realizados na América do Sul, onde os principais fungos isolados foram *Fusarium* sp e *Aspergillus* sp, que de fato são os patógenos mais frequentemente isolados em regiões tropicais nas últimas décadas. (Hofling-Lima et al. 2005, Ibrahim et al. 2008, Wang et al. 2009, Gopinathan et al. 2010). Acreditamos que este fato possa ser explicado por diferenças no clima e no meio ambiente, sendo a *Candida* sp o agente mais prevalente em países desenvolvidos e de clima temperado (Yildiz et al. 2010, Bahadir et al. 2012).

O tempo médio de procura dos pacientes ao serviço oftalmológico foi de aproximadamente sete dias, variando de 01 a 30 dias, período semelhante relatado em estudo realizado por Ibrahim et al. (2008), em estudo na região Sudeste do Brasil. Ainda em nossa pesquisa, uma média de cinco a nove dias foi o tempo determinado para os pacientes darem entrada no serviço especializado. Essa diferença pode ser explicada pela dificuldade de acesso a serviços de saúde pela população do interior do estado que necessitam de informação para qual serviço se direcionar e dependem de transporte para o local de assistência.

O tratamento mais utilizado foi a anfotericina B e natamicina. A anfotericina B age principalmente contra leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, mas pode também agir contra espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, sendo necessária a remoção do epitélio e do estroma anterior para uma maior penetração do antifúngico. A Natamicina age principalmente contra fungos filamentosos, especialmente *Fusarium* sp e *Aspergillus* sp, sendo também necessário o procedimento de debridação da lesão (Oliveira et al. 2001). O uso de anfotericina B prescrito para a maioria dos pacientes neste estudo foi justificado pelo fato de o serviço fornecer a medicação gratuitamente. Sendo também prescrito a natamicina, porém a maioria dos pacientes não adquire a medicação pelo custo elevado e pela dificuldade de seguir corretamente as orientações médicas. Assim, o uso concomitante da natamicina também é importante para um prognóstico melhor da infecção.

O tratamento sistêmico foi realizado em 53,3% dos pacientes (oito casos) com cetoconazol sistêmico que é eficaz contra espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Curvularia* (Oliveira et al. 2001). O tratamento clínico foi eficaz em 52,2% dos pacientes (11 casos) sendo que desses, três pacientes foram submetidos a recobrimento conjuntival e evoluíram com boa resposta terapêutica. A ceratoplastia penetrante foi realizada em 53,3% (oito casos) devido ao quadro de perfuração ocular ou não resposta ao tratamento instituído. Em trabalho realizado na região Sudeste observou-se que 70% dos pacientes evoluíram para

ceratoplastia penetrante, com recidiva do quadro em 41,9% dos transplantes, sendo a natamicina, o antifúngico tópico utilizado em 70% dos casos (Salera et al. 2002).

O transplante de córnea é indicado com o objetivo de remover o tecido envolvido e preservar a integridade do globo ocular, ainda assim os fungos podem permanecer na borda do tecido da córnea ou na câmara anterior levando à recidivas da infecção fúngica (Salera et al. 2002).

1.4 CONCLUSÃO

Casos de ceratite fúngica foram apresentados ao serviço oftalmológico de referência do Recife e o diagnóstico laboratorial fúngico apontou como agente etiológico mais frequente o *F. solani*, sendo correlacionado ao traumatismo ocular com material vegetal em uma parcela da população, porém, sem uma predominância como relatado em outros estudos. A anfotericina B tópica se mostrou eficaz, porém metade dos pacientes necessitou de ceratoplastia penetrante, sendo dois casos submetidos à evisceração.

1.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) da instituição, à Fundação Altino Ventura (FAV) à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Agência Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).



Figura 1. Lesões de córnea com hiperemia de conjuntiva, hipópio e úlcera de córnea.

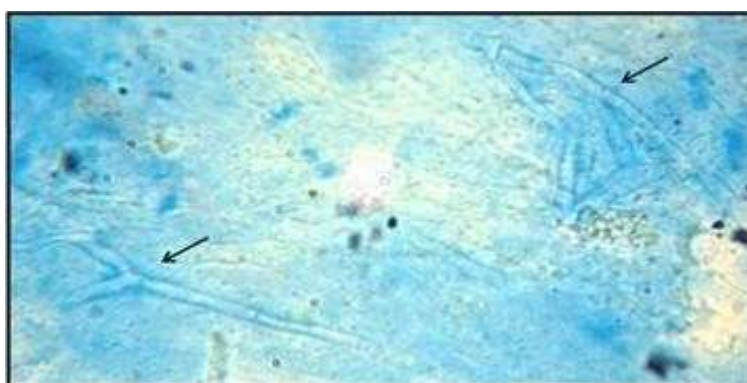


Figura 2. Filamentos micelianos septados e hialinos ao exame direto (Lactofenol - 40X).

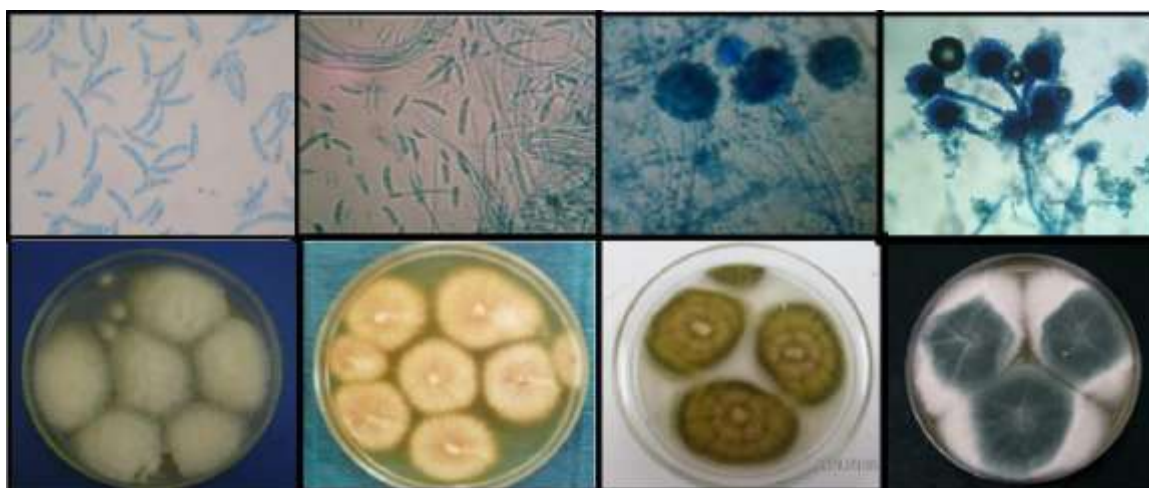


Figura 3. *Fusarium solani*, microscopia (A) e macroscopia (B); *F. oxysporum*, microscopia (C) e macroscopia (D); *Aspergillus parasiticus*, microscopia (E) e macroscopia (F); *A. fumigatus* microscopia (G) e macroscopia (H).

APÊNDICE D - EFEITO DE SOLUÇÕES DESINFETANTE SOBRE BIOFILMES ASSOCIADOS A LENTES DE CONTATO GELATINOSAS

Artigo a ser submetido para a revista Journal of Medical Microbiology

EFEITO DE SOLUÇÕES DESINFETANTE SOBRE BIOFILMES ASSOCIADOS A LENTES DE CONTATO GELATINOSAS

ELVISLENE C. SOARES LEITE; LARRISSA ROLIM; REJANE PEREIRA NEVES *.

Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

*Correspondência para: Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-420. Fone: 81 2126.8481, Fax: 81.2126.8480
e-mail: rejadel@yahoo.c

1 INTRODUÇÃO

A ceratite fúngica constitui uma das mais importantes causas de morbidade ocular e perda visual nos países em desenvolvimento. Ocorre com maior frequência na população rural, onde os trabalhadores desenvolvem atividade agrícola extensiva, estando mais expostos a trauma de córnea com material vegetal (Saha et al.2009).

Os fungos mais comuns e frequentemente relatados como causa de ceratite micótica em várias partes do mundo são as espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* *Penicillium*, *Candida* (Badiie, 2013).

Alguns fatores de risco são importantes no desenvolvimento da ceratite micótica, incluindo, diabetes mellitus, vírus da imunodeficiência humana, doenças oculares crônicas, cirurgias de córnea, uso indiscriminado de antibiótico e corticóides (Sengupta et al., 2012). No entanto, outro fator de risco para ceratite fúngica é o uso lentes de contato, (Mukherjee et al., 2012; Badiie et al., 2013).

As lentes de contato são consideradas como um grande avanço da oftalmologia, capazes de corrigir praticamente todos os tipos de erros refrativos, porém a incidência de complicações e danos visuais aos usuários de lentes tem aumentado nas ultimas décadas. As complicações mais frequentemente relatadas são olho seco, erosões de córnea, infiltrados estéreis e infecciosos e a ceratite infecciosa (Souza et al.,2008).

Entre as ceratite infecciosas a ceratite fúngica é a complicação mais temida aos usuários de lentes de contato e pode levar à perda irreversível da visão em muitos casos, visto que há uma correlação da infecção fúngica da córnea com o uso de lentes, e soluções para lentes de contato contaminadas (Robertson et al.,2013).

Os fungos filamentosos são capazes de aderirem à superfície das lentes de contato, e as hifas podem penetrar na superfície da maioria dos tipos de lentes, a capacidade de aderir e formar biofilmes, são consideradas as características mais importantes no desenvolvimento das ceratites fúngicas (Willcox,2013; Zhang, et al 2012).

Biofilme é uma comunidade de micro-organismos associados e firmemente aderidos a uma superfície por meio de uma matriz extracelular de polissacarídeos. A associação dos micro- organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes desfavorável, como também uma maior resistência aos agentes antimicrobianos (Villena et al.2010).

O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade na formação de biofilme *in vitro* sobre lentes de contato gelatinosas por espécies de *A. fumigatus*, *A. terreus*, *F. Solani*, isolados de pacientes com ceratite, e avaliar o efeito de uma nova formulação antisséptica e assim como soluções convencionais na desinfecção sobre lentes colonizadas.

1.1 MATERIAL E MÉTODOS

CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS

Culturas de *F. Solani*, *A. fumigatus* e *A. terreus* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 72 h. Os conídios foram coletados por lavagem da superfície das culturas utilizando 5ml de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 contendo Tween 20 na concentração de 0,025% (v/v), subsequentemente foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer e o inóculo ajustado para a concentração de 1×10^5 células em RPMI 1640 (Sigma) tamponado para pH 7.0 com MOPS 0,165M (Mowat et al., 2007).

FORMAÇÃO DE BIOFILME

Para a produção do biofilme sobre as lentes de contato, estas foram colocadas em placas de microtitulação contendo 24 poços (TPP, Switzerland), sobre estas foram dispensados 200µl da suspensão fúngica padronizada em tampão MOPS-RPMI 1640 em cada orifício de forma a ficarem totalmente submersas no conteúdo e incubadas a 37°C por 24 horas. Cessando este tempo, o meio de cultura foi removido dos orifícios e as lentes lavadas três vezes com PBS pH 7,2 para total remoção de células não aderentes (Mowat et al., 2007).

DESINFECÇÃO DAS LENTES DE CONTATO

As lentes de contato foram submersas em quatro tipos de soluções desinfetantes (Solução A, B e C) disponíveis comercialmente e (D) solução teste. Para controle foi utilizado a solução fisiológica.

Para verificação “*in vitro*” do poder fungicida do produto D(solução teste) utilizado na desinfecção das lentes, foram testadas as lentes de contato colonizadas por fungos, as quais separadamente ficaram imersas em poços contendo os produtos padrões e teste, bem

como solução fisiológica (controle). Após 24 horas foram analisado o efeito das soluções desinfetantes sobre a viabilidade e remoção dos fungos no biofilme sobre lentes de contato através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), retrocultivo e confirmação taxonômica.

MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA

A topografia da superfície destes biofilmes foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi desenvolvido um modelo in vitro de formação de biofilme em lentes de contato entre os principais agentes etiológicos de ceratite fúngica, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *F. solani*. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que as três espécies estudadas formaram biofilmes na superfície de lentes de contato. Sendo observado biofilme maduro após 72 horas de incubação para todas as cepas.

A análise topográfica da MEV mostrou que a produção do biofilme por *A. fumigatus* e *F. solani* foi mais robustos e uniformemente distribuídos, que o biofilme formado por *A. terreus*.(figura 01). Estes resultados são consistentes com os relatado por (Imamura et al.2008) o qual afirmam que a formação de biofilme por espécies de *Fusarium* e *Candida albicans* ocorre em qualquer tipo de lentes de contato e Mowat et al. (2007) têm demonstrado que o *A. fumigatus* possui a capacidade para formar biofilme os quais são resistentes aos efeitos de antifúngicos.

A formação de biofilme por fungos filamentosos também foi descrito em *A. niger* cultivado em malha de poliéster e caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV); por *A. fumigatus* e caracterizados por microscopia confocal laser scanning (LSCM) e por *F. solani* e *F. oxysporum* analisados por LSCM e antibiograma (Mowat et al.,2008; Gamarra et al.,2010).

De acordo com Kucharíkova et al.(2011) a formação de biofilme fúngica é fortemente influenciada pela capacidade de aderência dos fungos ao substrato e pelas propriedades da superfície de adesão, as lentes têm uma superfície hidrófila uniforme que é diretamente correlacionada com a capacidade absorção de água e capacidade de aderência de biomoléculas, que podem ajudar na formação de biofilme fúngico.

O risco de contaminação da superfície da lente de contato é considerado um dos principais problemas associados com o uso da lente. Durante os cuidados de manutenção, a lente de contato pode ser colonizada por micro-organismo de superfícies (estojo da lente) ou pela solução de conservação/manutenção contaminada (Souza et al.2008)

A solução desinfetante proposta foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de biofilme em lentes de contato comparada com as soluções padrões, disponível comercialmente (Figura 02). Retuerto et al.,(2012) avaliaram a eficácia de soluções para desinfecção de lentes de contato sobre biofilme formados por *F. solani* e *F. oxysporum* as espécies testadas foram resistentes a maioria das soluções testadas.

Bullock et al.(2008) investigaram o efeito da temperatura de armazenamento de soluções para lentes de contato na capacidade de inibir o crescimento de espécies de *Fusarium*. Eles afirmam que quando exposto a temperatura elevada por um período prolongada, ReNu ML perde a atividade fungistática in vitro contribuído para o aumento da ceratite por espécies de *Fusarium*.

Em estudo realizado por Jurkunas et al.(2009), infecções fúngicas da córnea relacionada ao uso de lentes de contato gelatinosas foi responsável por 41% das ceratite em 2004-2007, em comparação com apenas 17% em 1999-2002. Os autores afirmam que os pacientes devem ser aconselhados a manter os mais altos padrões de cuidado da lente de contato, esfregando a superfície da lente, pois isso foi demonstrado que melhora a eficácia da desinfecção das lentes.

Podemos dizer que biofilme se trata de uma comunidade de micro-organismos associados e firmemente aderidos a uma superfície por meio de uma matriz extracelular de polímeros, Uma das vantagens dos biofilmes é maior resistência a estresses biológicos, químicos e físicos. Consequentemente há maior resistência aos antibióticos e antimicrobianos quando os micro- organismos infecciosos estão sob a forma de biofilme (autor). No entanto, as investigações de biofilmes fúngicos associados às lentes de contato são praticamente inexistentes, e a falta de um modelo in vitro adequado resulta em poucas informações sobre a patogênese da ceratite fúngicas.

1.3 REFERÊNCIAS

- Mowat, E., Butcher, J., Lang, S., Williams, C., Ramage, G. 2007. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*. 56, 1205–1212.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiology* 28, 449–461.
- Willcox, M.D. 2013. Microbial adhesion to silicone hydrogel lenses: a review. *Eye Contact Lens*. 39(1):61-6.
- Zhang, X., Sun, X., Wang, Z., Zhang, Y., Hou, W. 2012. Keratitis-associated fungi form biofilms with reduced antifungal drug susceptibility. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 53(12):7774-8.
- Retuerto, M. A., Szczotka-Flynn, L., Ho, D., Mukherjee, P., Ghannoum, M. A. 2012. Efficacy of care solutions against contact lens-associated *Fusarium* biofilms. *Optometry and Vision Science* 89(4): 382-391
- Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, van Dijck P, Bujda'kova' H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol*. 2011;60:1261–9.
- Saha S, Banerjee D, Khetan A, Sengupta J. Epidemiological profile of fungal keratitis in urban population of West Bengal, India. *Oman J Ophthalmol*. 2009;2:114–8.
- Mowat, E. et al. (2008) The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? *Med. Mycol.* 47 (Suppl 1), S1–S7
- Beauvais, A. et al. (2007) An extracellular matrix glues together the aerial grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* 9, 1588–1600
- Mowat, E. et al. (2008) Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1281–1284

- Imamura, Y., Chandra J, Mukherjee PK, Lattif AA, Szczotka-Flynn LB, Pearlman E, et al. Fusarium and Candida albicans biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:171–82.
- Bullock, J.,D., Warwar, R. E., B. Elder, L., Northern, W. I. 2008. Temperature Instability of ReNu with MoistureLoc: A New Theory to Explain the Worldwide Fusarium Keratitis Epidemic of 2004–2006. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 106: 117–127
- Gamarra, N.N., Villena, G.K., Gutiérrez-Correa, M. 2010. Cellulase production by *Aspergillus niger* in vitro biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(2):545-51.

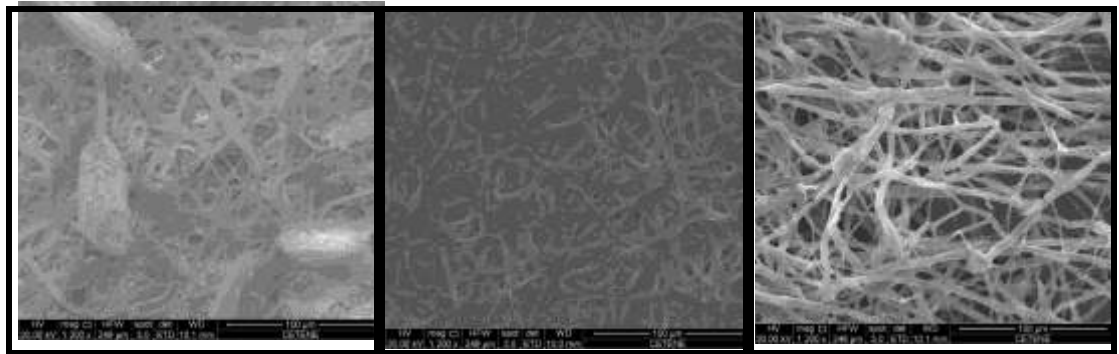


Figura 1. Microscopia Electronica de Varredura, imagens de biofilme formados em lentes de contato por *Aspergillus fumigatus* (A); *Fusarium solani* (B) e *Aspergillus terreus* (C)

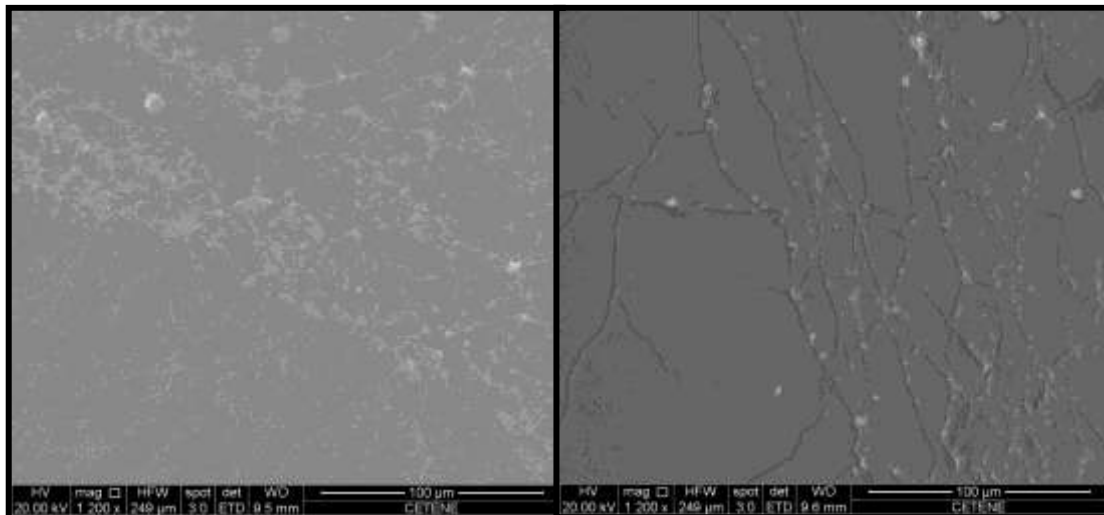


Figura 02. Microscopia Electronica de Varredura, imagens após a desinfecção das lentes de contatos colonizadas. Nova formulação desinfetante (A); Solução Padrão(B)

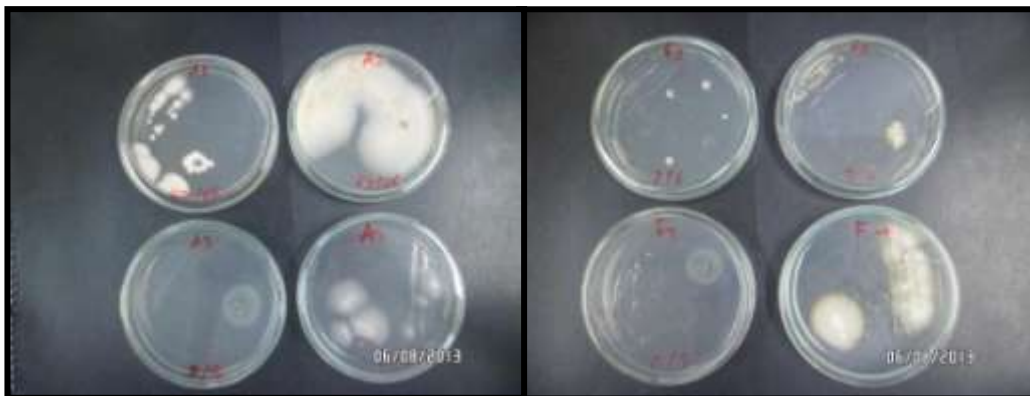


Figura 03. Retrocultivo do biofilme fúngico após a desinfecção das lentes de contatos colonizadas