



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**EDLÂNY PINHO ROMÃO MILANEZ**

**ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE  
CERATITES POR *Fusarium* spp. NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL**

**FORTALEZA-CE**

**2023**

**EDLÂNY PINHO ROMÃO MILANEZ**

**ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE  
CERATITES POR *Fusarium* spp. NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro

**FORTALEZA-CE**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M583a Milanez, Edlâny Pinho Romão.  
Aspectos clínico-laboratoriais e epidemiologia molecular de ceratites por *Fusarium* spp. no Estado do Ceará, Brasil / Edlâny Pinho Romão Milanez. – 2023.  
86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. Ceratite fúngica. 2. Sensibilidade antifúngica. 3. Sequenciamento. I. Título.

CDD 616.9

---

**EDLÂNY PINHO ROMÃO MILANEZ**

**ASPECTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE  
CERATITES POR *Fusarium* spp. NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Jailton Vieira Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto  
Universidade Federal do Pernambuco (UFPE)

“Que a tua vida não seja uma vida estéril.

— Sê útil. — Deixa rasto.”

São Josemaria Escrivá

## AGRADECIMENTOS

A Microbiologia trouxe pessoas incríveis para minha vida. Espero demonstrar minha gratidão nas próximas palavras:

Agradeço à minha orientadora, Profa Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pela oportunidade, confiança e disponibilidade, muitas vezes cedendo seu tempo para tirar minhas dúvidas. É admirável sua elegância em palestrar e a facilidade em dissipar o conhecimento, sempre abordando a Ciência em diferentes contextos.

À professora Dra Germana Costa Paixão, por quem tenho um enorme carinho, por ter me encantado com a Microbiologia durante a minha graduação e ser responsável por esse laço até hoje em minha vida. Minha eterna gratidão.

À Dra Cibele Barreto Mano de Carvalho, por não medir esforços para me impulsionar, me motivar e me ensinar, sendo diretamente responsável pelo meu crescimento profissional e acadêmico. Muito obrigada pela confiança e amizade.

À Dra Delia Jessica Astete Medrano, que por muitos anos dividiu não só a bancada, mas as manhãs comigo, garantindo muitas risadas e aprendizado.

À Dra Silviane Praciano Bandeira, que com doçura e simplicidade sempre foi atenciosa em todos os ambientes que convivemos juntas. Eu não poderia expressar a honra de tê-la na minha banca de qualificação, colaborando com o engrandecimento desse trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), por contribuir com a formação dos alunos. Em especial ao Professor Júlio Sidrim, que por muitos anos ouvi falar e tive a experiência de fazer a disciplina de estágio. Tal fato mudou meu olhar sobre os microrganismos e de forma direta e indiretamente afetou minha vida profissional.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa dessa dissertação, contribuindo significativamente com suas sugestões para melhoria desse trabalho, meu muito obrigada.

Aos meus companheiros de laboratório, que mesmo em meio à pandemia, sempre estiveram disponíveis para me ajudar: Raquel Colares, Fernando Monteiro, Laína Silva, Brendda Miranda, Paulo Henrique Soares, Mariana Pergentino e Bruno Nascimento.

Ao Pedro Manzi, meu amigo e companheiro de experimentos, obrigada por me socorrer e me ajudar tantas vezes. Existe muito de você nesse trabalho e espero retribuir de alguma forma um dia.

Ao Ruan Monteiro, que me recepcionou tão bem em São Paulo e além de dividir sua casa (UNIFESP) muito dividiu seu vasto conhecimento sobre *Fusarium* e Biologia Molecular. Obrigada pela ajuda, ensinamentos e paciência. Espero que nossa parceria perdure por muito tempo.

Ao programa (PPGMM) pela ajuda no meu breve estágio realizado em São Paulo.

Aos Hospitais parceiros que pude obter os dados desta pesquisa.

Ao Grupo Emílio Ribas, por ter me acolhido desde antes da minha graduação e por fazer parte ativamente desse trabalho. Aos meus queridos companheiros do Setor de Microbiologia: De Assis Viana e Rafaela Tabosa por me ajudarem e me apoiarem nessa jornada. À Raielly Furtado por dividir comigo uma amizade e amor pelo que fazemos.

Eu não poderia deixar de fazer aqui uma breve homenagem ao meu amigo José Picanço que por muitos anos trouxe alegria e descontração dentro do Setor de Microbiologia. Vou sempre me lembrar de você, garoto! †

De forma invertida, gostaria de agradecer à Microbiologia por ter me trazido uma amizade tão importante e enriquecedora com a Lívia Maria Galdino. Que sobrepondo barreiras microbiológicas, faz parte da minha vida e tenho certeza que por muito tempo estaremos juntas apoiando uma à outra.

Para a realização deste trabalho uma rede de apoio foi construída com muito amor e dedicação:

Obrigada à minha mãe Claudenia Pinho e minha sogra Célia Ferreira pelo incentivo e horas dedicadas à minha filha com tanto empenho e carinho. Eu amo vocês.

Agradeço ao meu pai, José Ednardo Romão Neto por sempre brilhar os olhos com admiração quando olha pra mim, é muito maravilhoso ver o orgulho que posso ocasionar. Obrigada aos meus irmãos Ednardo Pinho Romão e Isabel Aline Pinho Romão por estarem sempre disponíveis quando preciso.

Ao meu amado esposo, Fernando Milanez que, de forma tão ímpar, sempre acreditou em mim mesmo quando eu não acreditei. Por ser meu maior motivador e meu porto-seguro. Muito obrigada.

À minha filhinha Pietra Romão Milanez, que mesmo sem idade para entender minhas ausências, é peça fundamental para qualquer conquista que ocorra na minha vida.

Gratidão!

## RESUMO

A ceratite fúngica é uma infecção da córnea de caráter oportunista de aspecto supurativo e frequentemente ulcerativo que pode evoluir até a cegueira total ou mesmo à perda do globo ocular. Devido aos sinais inespecíficos e sintomas e rápida progressão, a ceratite fúngica é de difícil diagnóstico. A distribuição epidemiológica está fortemente associada com locais de ocorrência da doença e variam amplamente em todo o mundo, até mesmo entre diferentes regiões do mesmo país e em diferentes grupos de indivíduos. Neste contexto, investigamos características clínicas e epidemiológicas dos casos de ceratite por *Fusarium* ocorridos entre outubro de 2019 a março de 2022 em pacientes oriundos do estado do Ceará – região de clima tropical semiárido, caracterizada por elevadas temperaturas e grande número de trabalhadores rurais expostos aos ecossistemas onde os agentes etiológicos estão presentes. A etiologia dos casos foi investigada com microscopia confocal *in vivo*, raspagem da córnea para microscopia e cultura, além do sequenciamento dos genes *rpb2* e *tefla* para a identificação molecular. Adicionalmente, foi realizado teste de sensibilidade à anfotericina B (AMB), natamicina (NAT) e voriconazol (VOR) - os principais agentes antifúngicos utilizados na prática clínica em Oftalmologia. A etiologia fúngica foi identificada em 22,12% (50/226) dos casos de ceratite durante o período. O gênero *Fusarium* spp. foi responsável por 84,0% (42/50) dos casos das culturas positivas. Dentre os dados obtidos dos pacientes, verificou-se que a média de idade foi de 44,7 anos e o maior número pertencia à faixa etária entre 41 e 60 anos com 74,0% (37/50) pertencentes ao sexo masculino. Do total de pacientes analisados, 26,0% afirmaram possuir alguma doença de base como hipertensão arterial (12,0%) e diabetes (10,0%). Em relação ao tratamento, Anfotericina B e cetoconazol foram os antifúngicos mais utilizados em 78,0% e 46,0% dos casos, respectivamente. A ceratoplastia ocorreu em 48,0% dos casos (24/50). Resultados do sequenciamento em 27 cepas detectaram predomínio de espécies do complexo *F. solani* (FSSC) (14/27) além do complexo *F. fujikuroi* (FFSC) e *F. dimerum* (FDSC). AMB e VOR foram os antifúngicos que apresentaram melhor atividade *in vitro* contra os 28 isolados de *Fusarium* testados, com valores de mic variando entre 0,06 - 8 µg/ml e 0,06 - 4 µg/ml, respectivamente. Valores de Concentração Inibitória Mínima para NAT variaram de 0,125 - >128 µg/ml. Os dados mostram a importância de *Fusarium* na etiologia de ceratites em pacientes oriundos do nordeste brasileiro. O presente estudo revela, pela primeira vez, o perfil de sensibilidade fúngica e caracterização molecular desses isolados. Os resultados obtidos podem contribuir para o entendimento da epidemiologia e tratamento da doença em nosso meio.

Palavras-chave: Ceratite fúngica. Sensibilidade antifúngica. Sequenciamento.

## ABSTRACT

The fungus keratitis is an opportunistic corneal infection with a suppurative and often ulcerative appearance that can progress to total blindness or even loss of the eyeball. Due to nonspecific signs and symptoms and quick progression, fungus keratitis is difficult to diagnose. If inadequately treated, it can lead to significant visual decrease and, in severe cases, to total blindness or even loss of the eyeball. The epidemiological distribution is strongly associated with the places where the disease occurs and varies widely throughout the world, even between different regions of the same country and in different groups of individuals. In this context, we investigated clinical and epidemiological characteristics of cases of *Fusarium* keratitis that occurred between October 2019 and March 2022 in patients from the state of Ceará – a region with a semi-arid tropical climate, characterized by high temperatures and a large number of rural workers exposed at ecosystems where the etiological agents are present. The etiology of the cases was investigated with in vivo confocal microscopy, corneal scraping for microscopy and culture, in addition to sequencing of the *RPB2* and *TEF1 $\alpha$*  genes for molecular identification. Additionally, a sensitivity test was performed for amphotericin B (AMB), natamycin (NAT) and voriconazole (VOR). Fungal etiology was identified in 22.12% (50/226) of keratitis cases during the period. Exceptionally, *Fusarium* spp. was responsible for 84.0% (42/50) of cases with positive cultures. Among the data obtained from the patients, it was found that the average age was 44.7 years and the largest number belonged to the age group between 41 and 60 years, with 74.0% (37/50) belonging to the male sex. Of the total number of patients analyzed, 26.0% claimed to have some underlying disease, such as arterial hypertension (12.0%) and diabetes (10.0%). Regarding treatment, Amphotericin B and ketoconazole were the most used antifungals in 78.0% and 46.0% of cases, respectively. Keratoplasty occurred in 48.0% of the cases (24/50). Sequencing results in 27 strains detected a predominance of species from the *F. solani* complex (FSSC) (14/27) in addition to the *F. fujikuroi* complex (FFSC) and *F. dimerum* (FDSC). AMB and VOR were the antifungals that showed the best in vitro activity against the isolated 28 *Fusarium* tested, with mic values ranging from 0.06 - 8  $\mu$ g/ml and 0.06 - 4  $\mu$ g/ml, respectively. Minimum Inhibitory Concentration values for NAT ranged from 0.125 - >128  $\mu$ g/ml. The data show the importance of *Fusarium* in the etiology of keratitis in patients from northeastern Brazil. The present study reveals, for the first time, the profile of fungal sensitivity and molecular characterization of these isolated. The results obtained may contribute to the understanding of the epidemiology and treatment of the disease in our environment.

Keywords: Fungal keratitis. Antifungal sensitivity. Sequencing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Corte transversal esquemático do olho e córnea demonstrando suas principais características anatômicas.....	3
Figura 2 – Ceratite fúngica em paciente internado no Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio no Ceará, Brasil. Conjuntiva está hiperêmica, há um infiltrado corneano e presença de hipópio. .5	
Figura 3 - Linhagem filogenética de 36 espécies de <i>Fusarium</i> , organizadas em 9 complexos..9	
Figura 4 - Características micromorfológicas básicas dos fungos fusarióides. A. Diferentes formatos dos macroconídios. B. Modelos de fiálides aéreas e organização microconidial. C. Conidióforo esporodoquial e células conidiogênicas. D. Conidióforo aéreo com mesoconídio. E. Mesoconídio. F. Formas microconidiais.....	10
Figura 5 - Estimativa de ceratite fúngica por continente.....	11
Figura 6 – Principais características clínicas: A. Úlcera/margem infiltrada. B. Margem definida. C. Perfil elevado. D. Perfil plano. ....	13
Figura 7 – Visualização de hifas fúngicas em lâminas de raspado corneano. a) técnica de coloração de Gram; b) clarificação com KOH. ....	15
Figura 8 - Características do cultivo de <i>Fusarium</i> . ....	34
Figura 9 - Características do cultivo de <i>Scedosporium</i> sp. e <i>Neoscytalidium</i> sp.....	34
.....	34
Figura 10 - Evolução clínica de paciente atendido no Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio do primeiro atendimento até o pós-transplante de córnea. ....	35
Figura 11 - Reconstrução filogenética e rede de haplótipos baseados nos genes <i>rpb2</i> e <i>tefla</i> dos <i>Fusarium</i> do estudo. ....	42
Figura 12 - Clusterização baseado em AFLP dos isolados de <i>Fusarium</i> . ....	44
Figura 13 – Rede de extensão mínima baseado em AFLP dos isolados de <i>Fusarium</i> . ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação, principais agentes antifúngicos usados no tratamento da ceratite fúngica. ....	17
Tabela 2- Agentes antifúngicos, procedência, variações das concentrações e referências usada no teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> .....	29
Tabela 3 - Caracterização demográficas dos pacientes de ceratite fúngica.....	31
Tabela 4 - Número e porcentagem de pacientes segundo variáveis clínicas.....	32
Tabela 5 - Número e porcentagem de pacientes segundo sintomas, medicação prévia e tempo de evolução até assistência médica.....	33
Tabela 6 - Número e porcentagem dos agentes etiológicos isolados das culturas para fungos. ....	33
Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes segundo tratamento após exame clínico e isolamento fúngico na cultura.....	35
Tabela 8 - Características clínicas-epidemiológicas dos casos de CF do presente estudo. ....	37
Tabela 9 – Composição amostral da rede de haplótipos gerada a partir da análise das sequências parciais concatenadas dos genes <i>rpb2</i> e <i>tef1<math>\alpha</math></i> dos isolados de <i>Fusarium</i> .....	43
Tabela 10 - Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) dos antifúngicos testados frente a isolados clínicos de <i>Fusarium</i> e Complexos de Espécies (n=28).....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AMB	Anfotericina B
AMI	Amicacina
AMOX	Amoxicilina
BAV	Baixa acuidade visual
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA	Câmara anterior
CAEE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CE	Estado do Ceará
CEFT	Ceftazidima
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CF	Ceratite Fúngica
CI	Ceratite infecciosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial)
CTZ	Cetoconazol
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EF-1 $\alpha$	<i>Elongation factor 1-<math>\alpha</math></i> (fator de elongação 1-alfa)
ERMD	Emilio Ribas Medicina Diagnóstica
EUA	Estados Unidos da América
F	Feminino
FCZ	Fluconazol
FDSC	Complexo de espécies do <i>Fusarium dimerum</i>
FIESC	Complexo de espécies do <i>Fusarium incarnatum equiseti</i>
FLU	Fluconazol
FOSC	Complexo de espécies do <i>Fusarium oxysporum</i>
FSSC	Complexo de espécies do <i>Fusarium solani</i>

HAS	Hipertensão arterial sistêmica
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaçador interno transcrito)
KOH	Hidróxido de Potássio
M	Masculino
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
MOX	Moxifloxacino
MP	Máxima Parcimônia
NAT	Natamicina
ng/μL	Nanograma/microlitro
NI	Não informado
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPGMM	Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica
Re-TX	Re-transplante
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RPB2</i>	Subunidade II da RNA polimerase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TOB	Tobramicina
TX	Transplante
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
VCZ	Voriconazol
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i> (método aritmético médio do grupo de pares não ponderado)

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1.	<b>Ceratite</b> .....	3
2.2.	<b>Ceratite fúngica</b> .....	4
	2.2.1. <i>Etiologia</i> .....	6
	2.2.2. <i>Fatores de risco</i> .....	6
2.3.	<b>O gênero <i>Fusarium</i> e taxonomia</b> .....	7
2.4.	<b>Epidemiologia</b> .....	11
2.5.	<b>Características clínicas</b> .....	13
2.6.	<b>Diagnóstico laboratorial</b> .....	14
	2.6.1. <i>Identificação molecular</i> .....	15
2.7.	<b>Tratamento</b> .....	16
3.	<b>HIPÓTESES</b> .....	20
4.	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
4.1.	<b>Objetivo Geral</b> .....	21
4.2.	<b>Objetivos Específicos</b> .....	21
5.	<b>METODOLOGIA</b> .....	22
5.1	<b>Concepção, Cenário do Estudo e aprovação ética</b> .....	22
5.2	<b>População do estudo</b> .....	22
5.3	<b>Locais do estudo</b> .....	22
5.4	<b>Coleta de dados</b> .....	23
5.5	<b>Coleta de material</b> .....	24
5.6	<b>Processamento de amostras</b> .....	24
	5.6.1 <i>Exame direto</i> .....	24
	5.6.2 <i>Isolamento dos fungos</i> .....	24
5.7	<b>Identificação molecular</b> .....	25

5.7.1	<i>Extração de DNA</i> .....	26
5.7.2	<i>Sequenciamento genético</i> .....	26
5.7.3	<i>Análise filogenética e identificação molecular</i> .....	26
5.7.4	<i>Rede de haplótipos</i> .....	27
5.7.5	<i>Análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado -AFLP</i> ....	27
5.7.6	<i>Análise de clusterização e dimensional dos perfis AFLP</i> .....	28
5.8	<b>Teste de sensibilidade aos antifúngicos</b> .....	28
5.8.1	<i>Agentes antifúngicos</i> .....	28
5.8.2	<i>Preparo do inóculo e realização do teste de sensibilidade</i> .....	29
5.8.3	<i>Leitura do teste</i> .....	29
6.1	<b>Fatores associados à ocorrência de ceratite fúngica</b> .....	31
6.2	<b>Sintomas e medicação prévia dos pacientes</b> .....	32
6.3	<b>Diagnóstico laboratorial</b> .....	33
6.4	<b>Procedimento terapêutico pós-coleta e evolução clínica</b> .....	35
6.5	<b>Identificação molecular e análise genotípica</b> .....	41
6.6	<b>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b> .....	45
7.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
8.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

A ceratite fúngica, também conhecida como ceratite micótica, ceratomicose ou oculomicose, é uma doença grave de evolução lenta que ameaça a visão. Diferentemente de outras micoses, não é uma patologia de risco de vida, porém é de extremo comprometimento visual e dificuldade terapêutica (BURTON et al., 2011; THOMAS, 2013; CHIH-AN CHEN et al., 2020). Esse tipo de infecção causa ulceração da córnea, opacidade corneana e uma inflamação intensa da conjuntiva, que pode resultar em grande deficiência visual ou até mesmo na perda do globo ocular (THOMAS, 2013).

Várias são as possíveis causas para esta inflamação como: pequenas abrasões corneanas por corpos estranhos, traumas com vegetais (folhas, galhos de árvore e grãos), uso indevido de lentes de contato, olho seco severo, reação alérgica e outras causas que levam a quebra da barreira epitelial favorecendo a contaminação exógena por microrganismos (AUSTIN et al., 2017).

Segundo Marujo e colaboradores (2013) em uma pesquisa realizada na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sobre distribuição das ceratites infecciosas no Brasil, o trauma ocular é responsável por 48 a 65% dos casos de úlcera de córnea em países em desenvolvimento, enquanto nos Estados Unidos (EUA), um dos principais fatores de risco é uso de lentes de contato, com 52%, sendo trauma ocular responsável por 27% dos casos. Fatores como localização geográfica, clima, umidade são relatados como influenciadores no desenvolvimento do processo infeccioso (LAWSON et al, 2018).

As infecções fúngicas da córnea são causadas por mais de 100 espécies diferentes, embora mais de 95% sejam causadas pelos fungos filamentosos *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. e leveduras *Candida* spp. Os fungos filamentosos são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em regiões tropicais e climas subtropicais, sendo a levedura mais frequente em climas temperados. Infecções da córnea causadas por fungos filamentosos tendem a ter um prognóstico pior do que aquelas causadas por espécies de leveduras (THOMAS et al., 2005).

O diagnóstico, tanto clínico quanto laboratorial, pode ser demorado e inconclusivo na maioria das vezes, atrasando o início do tratamento específico e comprometendo ainda mais o prognóstico (KEAY, EDWARDS et al., 2006), que é conhecidamente como desfavorável, quando em comparação com outras formas de ceratite infecciosa devido a várias razões, como atraso na identificação microbiológica, eficácia subótima de penetração de agentes antifúngicos, pleomorfismo morfológico em culturas e uma variação na sensibilidade a drogas

com os medicamentos existentes. Ceratite fúngica é um grave problema de saúde pública e, portanto, requer atenção especial (SHARMA et al., 2022).

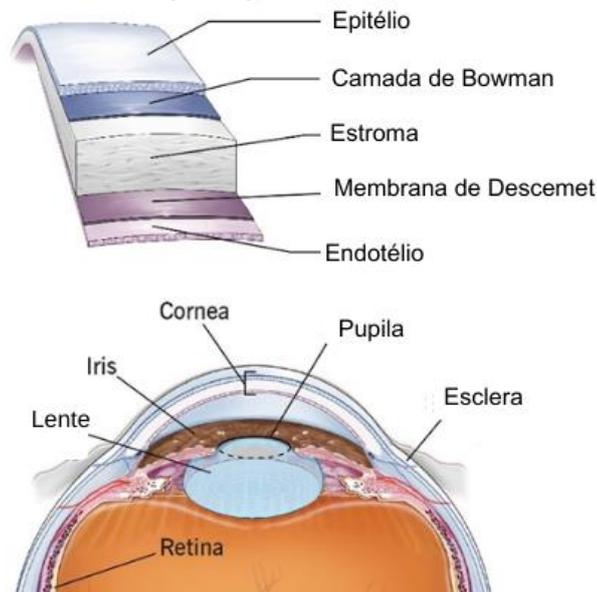
A despeito da relevância clínica, dados epidemiológicos sobre a ceratite por *Fusarium* são fragmentados e escassos. No Brasil, a quase totalidade dos estudos foram realizados em zonas temperadas ou subtropicais, localizadas no Sul e Sudeste do país, respectivamente (FURLANETTO et al., 2010; PASSOS et al., 2010; IBRAHIM et al., 2011; OESCHLER et al., 2014; ROSA et al., 2018; AGI et al., 2019; PEREIRA et al., 2019; ROSA et al., 2019; HERKERT et al., 2019). Desconhecem-se as características da ceratite por *Fusarium* em áreas tropicais do país, onde elevadas temperaturas e grande número de trabalhadores rurais expostos aos ecossistemas onde os agentes etiológicos de ceratite fúngica estão presentes. Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo descrever as principais características clínicas e epidemiológicas dos casos de ceratite fúngica ocorridos em clima tropical semi-árido. Adicionalmente, são apresentados os principais agentes etiológicos e o seu perfil de sensibilidade a antifúngicos comumente utilizados na prática clínica local.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ceratite

A estrutura única do olho humano (Figura 1), quando intacta, impede a entrada da maioria dos microrganismos (FLEISZIG et al., 2019). Anatomicamente, a córnea, em um adulto, possui de 11,5 a 12,0 mm de diâmetro horizontal e, juntamente com a esclera, constituem a cobertura externa ou revestimento do globo ocular (RUFER et al., 2005). A córnea é formada por um tecido avascular transparente e altamente especializado, responsável por quase três quartos das funções ópticas do olho, incluindo a clareza óptica e a proteção contra invasão de microrganismos (NICOLAU; MYSORE, 2021). É constituída por cinco camadas anatômicas (Figura 1) que lhe conferem resistência mecânica e proteção (do exterior para o interior): epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (KANSKI & BOWLING, 2012; NICOLAU; MYSORE, 2021).

Figura 1 - Corte transversal esquemático do olho e córnea demonstrando suas principais características anatômicas.



Fonte: Adaptado de Cleveland Clinic, 2018.

Logo, devido a sua localização e estrutura anatômica, a córnea é constantemente exposta ao ambiente externo e sua barreira epitelial insultada por fatores externos do ambiente, incluindo traumas oculares e microrganismos (FLEISZIG et al., 2019). A possível ocorrência dessas lesões à barreira epitelial prejudica os mecanismos de defesa da córnea e, assim, levar a danos, causando inflamação ou ceratite (ANSARI et al. 2013). Esta, descreve um grupo de doenças inflamatórias agudas ou crônicas que ocorre na córnea após fatores que interrompem

o mecanismo de proteção da camada externa do olho (ACHARYA et al., 2017; AHMADIKIA et al., 2021).

A ceratite infecciosa (CI), também conhecida como opacidade corneana, pode ser classificada como ceratite microbiana (bactérias, fungos ou parasitas) ou ceratite viral (herpes vírus) (UNG et al., 2019). Representa um dos principais fatores de cegueira da córnea, constituindo mais de 5% dos casos globais (STAPLETON, 2021). Estudos recentes estimam que a CI seja a causa de até dois milhões de casos de cegueira monocular a cada ano no mundo (UNG et al., 2019; RAJ et al., 2021; TING et al., 2022). É uma doença comum, mas potencialmente ameaçadora à visão, assim sendo uma emergência oftalmológica, caracterizada por ulceração, defeito epitelial e/ou infiltrado estromal. (UNG et al., 2019). Infecções da córnea foram declaradas como uma epidemia silenciosa, ainda que o tamanho dessa epidemia nunca tenha sido devidamente estimado (BROWN et al., 2020). Atualmente, a CI foi incluída entre doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Ung et al., 2019).

Entre os agentes etiológicos que causam CI, os fungos são considerados microrganismos evasivos, desafiadores desde o diagnóstico até o tratamento (CABRERAS-AGUAS et al., 2022). Estudos demonstram que a ceratite fúngica (CF) pode ser mais virulenta e prejudicial, quando em comparação com a CI de origem bacteriana. A CF, em estudos retrospectivos, mostrou ser mais suscetível a perfurar a córnea do que a ceratite bacteriana, levando a lesões irreversíveis (ANSARI et al., 2013; SHARMA et al., 2012; WONG et al., 1997).

## **2.2. Ceratite fúngica**

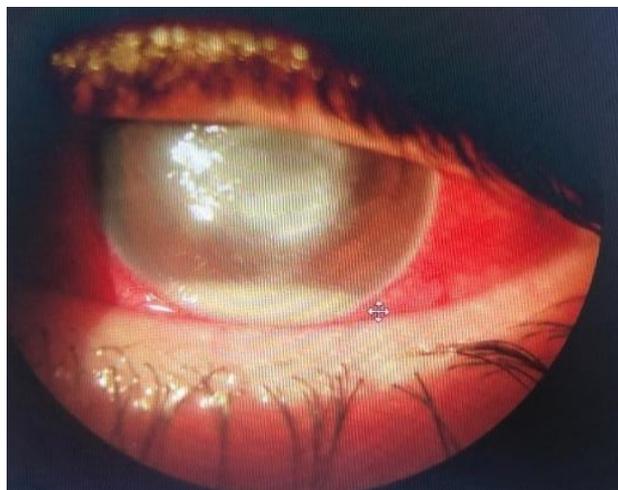
A ceratite fúngica é uma infecção grave da córnea que pode levar à cegueira, e é considerada uma emergência oftalmológica (THOMAS et al., 2005; BURTON et al., 2011; HOFFMAN, et al., 2021). Esse processo inflamatório pode acarretar em mudanças na estrutura e diminuição da transparência da córnea, variando desde lesões superficiais a profundas, neovascularização ou cicatrização (KARSTEN; WATSON; FOSTER, 2012; ONG; CORBETT, 2015; AL-AQABA et al., 2019). Essa infecção representa um desafio para o tratamento devido à sua tendência de imitar outros tipos de inflamações estromais, além de ter manejo restrito devido a não disponibilidade de agentes antifúngicos eficazes que penetrem o tecido da córnea de forma efetiva. Desta forma, salienta-se que as infecções fúngicas da córnea necessitam ser rapidamente reconhecidas e diagnosticadas para facilitar uma recuperação completa e plena (THOMAS, 2003).

Brown e colaboradores (2020), em um estudo epidemiológico, compararam o aumento anual no diagnóstico de casos de CF com o número de casos já descritos em análises epidemiológicas anteriores (SRINIVASAN et al., 1997; WHITCHER et al., 2001). Baseados nos estudos, a carga de CF é maior em regiões tropicais e países subtropicais, respondendo por entre 20 e 60% dos casos de CI apresentados em regiões tropicais, provavelmente resultado do clima (temperaturas e umidade relativa mais altas) e frequentes traumas oculares relacionados à agricultura (HOFFMAN, et al., 2021).

A CF é causada por fungos em formas de leveduras e filamentosos. O padrão de infecção será definido e deve variar a partir do agente causador, localização geográfica, fatores de risco e exposição ocupacional (THOMAS; KALIAMURTHY, 2013). Em CFs causadas por leveduras são, na grande maioria dos casos, causadas por *Candida* ou *Cryptococcus* (BOUCYER et al., 2017). Estudos apontam para uma condição ocular pré-existente que dispõe a infecção, como, por exemplo, secreção lacrimal insuficiente, fechamento deficiente das pálpebras, ou condições sistêmicas, como diabetes mellitus e imunossupressão. Este tipo de ceratite também pode ocorrer a partir de defeito epitelial pré-existente ou micro-abrasões causadas por lentes de contato contaminadas (THOMAS, 2003).

As características clínicas da CF filamentosa incluem úlceras da córnea com lesões satélites - infiltrados estromais multifocais granulares, branco-acinzentados -, presença de placa endotelial e hipópio (Figura 2) (RAJ et al., 2021). Contudo, é importante ressaltar que cada caso de ceratite fúngica, embora apresente essas características básicas, pode diferir de outros, dependendo do agente etiológico (THOMAS, 2003).

Figura 2 – Ceratite fúngica em paciente internado no Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio no Ceará, Brasil. Conjuntiva está hiperêmica, há um infiltrado corneano e presença de hipópio.



Fonte: Própria autora.

### 2.2.1. Etiologia

Pelo menos 166 gêneros e 144 espécies de fungos foram relatadas como causadoras de CF humana, incluindo mais de 100 gêneros de fungos filamentosos, 18 gêneros de leveduras e 6 gêneros de fungos dimórficos (GHOSH et al., 2020; MILLS et al., 2021; TAWDE et al., 2022). Porém, o gênero *Fusarium*, seguido por *Aspergillus* spp. são os fungos filamentosos mais isolados, representando até 70 % dos casos (AHMADIKIA et al., 2021), já os relatados com menos frequência incluem: *Sarocladium* spp, *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp. e *Purepureocillum lilacinum* (HOFFMAN, et al., 2021). Equanto que o gênero *Candida* predomina entre as leveduras isoladas de CF (BROWN et al., 2020). Dentre os fungos produtores de melanina, *Curvularia* spp. é o mais comumente relatados globalmente, porém, muitos outros gêneros também foram relatados como causadores de ceratite, como *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Ulocladium* spp., e *Colletotrichum* spp. e *Scedosporium* sp., também estão surgindo como agentes causadores da CF (HOFFMAN, et al., 2021; TAWDE et al., 2022). No entanto, fungos dimórficos, embora raramente, também foram relatados como agentes causadores de CF em olhos saudáveis e olhos de pacientes imunocomprometidos (MORRISON et al., 2013; AHMADIKIA et al., 2021).

### 2.2.2. Fatores de risco

Existem diversos fatores de risco para o desenvolvimento de ceratite fúngica. Alguns atribuíveis ao indivíduo, como idade, gênero ou doença oftálmica ou sistêmica pré-existente; e outros, extrínsecos, como renda do paciente, ocupação, cirurgia ocular prévia e região geográfica (HOFFMAN et al., 2021). Dentre os fatores intrínsecos, os pacientes idosos são mais propensos a ter comorbidades sistêmicas e oculares predisponentes, como diabetes mellitus e doença da superfície ocular (VAN DER MEULEN et al., 2008; HOFFMAN et al., 2021). Porém, vários estudos afirmam que pacientes entre 20 e 40 anos compõem maioria dos casos (GOPINATHAN et al., 2002; BHARATHI et al., 2003; DEORUKHKARET et al. 2012; ONG et al., 2016; HOFFMAN et al., 2021).

Os principais fatores predisponentes para CF incluem trauma, imunodeficiência, distúrbios da superfície ocular, cirurgia ocular, tratamento com esteróides tópicos e uso prolongado de lentes de contato gelatinosas (CHEIKHROUHOU et al., 2014). De acordo com Mahmoudi e colaboradores (2018), o trauma da córnea, principalmente matéria vegetativa, é a causa predominante de CF em 40-60% dos casos. Hoffman e colaboradores (2021) destacaram

que o trauma ocular é um fator de risco predisponente chave para o desenvolvimento de ceratite fúngica, independentemente da região geográfica. Lesões no olho podem ocasionar uma ruptura no epitélio da córnea, permitindo que patógenos fúngicos se infiltrem. Além disso, lesões com matéria vegetal podem levar a danos com inoculação direta de conídios fúngicos (HOFFMAN et al., 2021).

Doenças da superfície ocular pré-existentes, como doença do olho seco, blefarite, defeitos epiteliais ou condições inflamatórias da superfície ocular comprometem o epitélio da córnea e, portanto, permitem que patógenos fúngicos invadam a córnea. Além disso, essas condições são frequentemente tratadas com corticosteroides tópicos ou lentes de contato curativas, aumentando o risco de desenvolver ceratite fúngica (ONG et al., 2016). Histórico de cirurgias ocular prévias, como catarata, cirurgia refrativa a laser ou transplante de córnea, foram associadas ao desenvolvimento de ceratite fúngica em países desenvolvidos e de renda média-baixa (LABIRIRS et al., 2012; BUCHTA, et al., 2014).

Estudos demonstram que em países industrializados, o uso de lentes de contato constitui o principal fator predisponente para o desenvolvimento de ceratite fúngica (GOWER et al., 2010; KEAY et al., 2011; ONG et al., 2016). No entanto, é importante ressaltar que o fator de risco principal decorre do uso e manuseio impróprios e do material de fabricação da lente de contato (HOFFMAN et al., 2021). A exemplo deste achado, Bullock e colaboradores (2016) expuseram um surto global de ceratite por *Fusarium* spp. nos anos entre 2005 e 2006 decorrido do uso de um lote defeituoso de uma solução de limpeza.

### **2.3. O gênero *Fusarium* e taxonomia**

O gênero *Fusarium* foi descrito pela primeira vez no início do século XIX. Em 1935, Wollenweber e Reinking usaram diferenças morfológicas para organizar o gênero em 16 seções com 65 espécies, 55 variedades e 22 formas (CROUS et al., 2021). Porém, Booth (1971) simplificou isso para apenas 14 espécies. Quando Leslie e Summerell (2006) usaram informações morfológicas e filogenéticas, eles terminaram com 70 espécies, a maioria das quais formadas por macroconídios falcados e multisseptados com célula basal pedicelada. Atualmente, com o surgimento do sequenciamento genético, mais de 200 espécies são reconhecidas em pelo menos 22 complexos de espécies, diferindo pela morfologia, associação de hospedeiros e parâmetros moleculares (LAURENCE et al., 2015), sendo sua taxonomia atual, dominada por estudos filogenéticos (CROUS et al., 2021). Al-Hatmi e colaboradores (2016), afirmaram que um total de 74 espécies taxonômicas foram sugeridas como causadoras

de infecções humanas e que esse número tende a aumentar. Até o momento, cerca de 36 dos supostos oportunistas humanos foram nomeados, enquanto 38 ainda não possuem nome e só podem ser identificados por análise de sequenciamento *multilocus* (MLSA). Até agora, 21 espécies foram descritas com relatos de casos comprovados (DE HOOG et al., 2011) foram publicados na literatura. A posição taxonômica é definida atualmente como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae, Gênero *Fusarium* (LORTHOLARY et al., 2010).

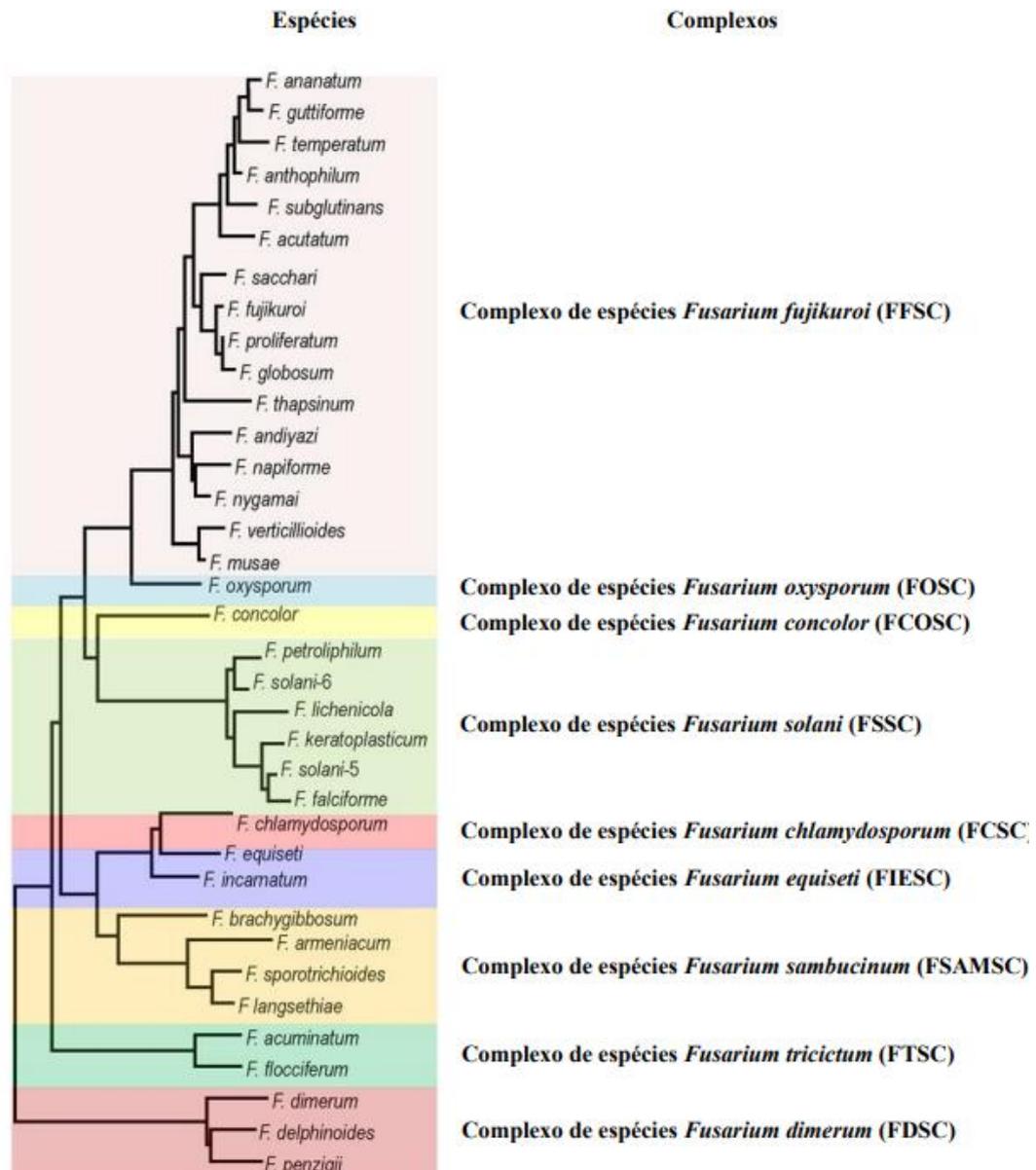
Espécies de *Fusarium* são amplamente distribuídas no solo, bem como nas partes subterrâneas e aéreas das plantas, restos de plantas e substratos naturais (NELSON et al., 1994). Além disso, é encontrado no ar e no ambiente aquático, incluindo água do mar (SÁENZ et al., 2020). É considerado o quinto patógeno de plantas na lista dos “dez principais fitopatógenos” (DEAN et al., 2020), apresentando grande importância econômica, por ocasionarem devastadoras perdas na agricultura, como por exemplo, a podridão e ferrugem em vegetais (SÁENZ et al., 2020).

O fungo do gênero *Fusarium* são agentes de um amplo espectro de infecções, denominadas fusarioses, acometendo pacientes imunossuprimidos principalmente com neoplasias hematológicas, e imunocompetentes globalmente (JOSSI et al., 2010). Em pacientes imunocompetentes, causa principalmente infecções localizadas como onicomicose e ceratite (ROSA et al., 2017). É importante ressaltar que atualmente o *Fusarium* foi incluso em grupo definido “Grupo de alta prioridade” pela OMS para desenvolvimento de estratégias para controle, devido a emergência como patógeno fúngico (WHO, 2022).

Segundo Emmons e colaboradores (1977), a patogenicidade de um fungo pode ser expressa pela capacidade do microrganismo de tolerar temperaturas de 35-37°C. *Fusarium* spp. se desenvolve a temperatura ambiente 25-30°C, porém, nem todos os isolados são termotolerantes e, portanto, capazes de causarem infecções invasivas. De forma geral, as fusarioses são difíceis de tratar em função do alto grau de resistência das diferentes espécies de *Fusarium* aos antifúngicos (AL-HATMI et al., 2016), tornando primordial o ensaio de sensibilidade para escolha terapêutica mais adequada (ROSA et al., 2016).

Em 2016, Al-Hatmi, Meis e De Hoog classificaram em nove os complexos de espécies filogenéticas causadoras de infecções em humanos e em animais (Figura 3):

Figura 3 - Linhagem filogenética de 36 espécies de *Fusarium*, organizadas em 9 complexos.



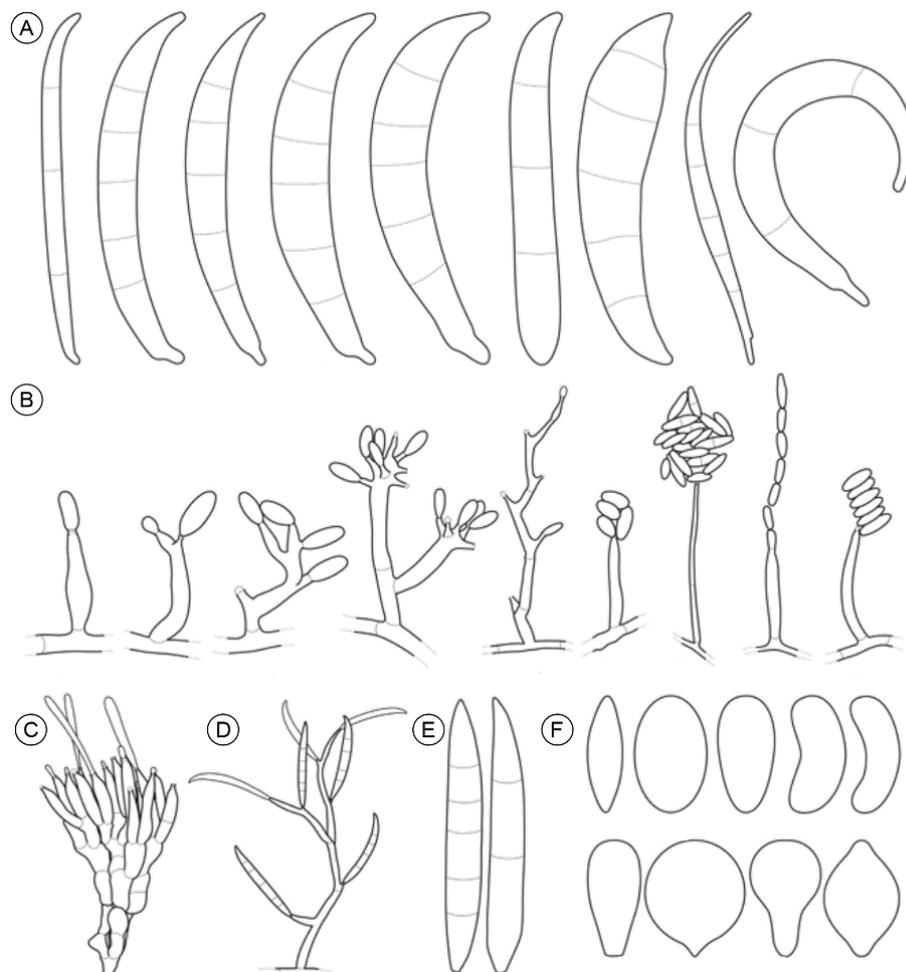
Fonte: Adaptado de Portela, 2019.

A taxonomia do gênero *Fusarium* ao longo dos anos sofreu várias mudanças. Antigamente sua classificação em nível de espécie era baseada apenas nos critérios morfológicos e fisiológicos do fungo. Com utilização de técnicas moleculares, aliado a novos *softwares* e plataformas taxonômicas, uma nova compreensão da evolução filogenética vem sendo estabelecida e em consequência a sua taxonomia (AL HATMI et al., 2012).

A diferenciação na identificação dentro do gênero *Fusarium* é bastante complexa e é baseada na morfologia dos macro e microconídios, fiálides, conidióforos, clamidósporos e na disposição dos conídios no conidióforo (Figura 5), além das características macroscópicas de crescimento do seu micélio algodinoso-cotonoso e das suas diferentes tonalidades, como

produção de pigmento, temperatura de crescimento, taxa de crescimento e entre outras características. Os microconídios podem ser unicelulares, com uma grande variedade de forma, apresentando formato elipsoidal a esférico, e podem ser encontrados agrupados ou de maneira isolada (LESLIE; SUMMERELL, 2007). A identificação da cultura é importante devido às semelhanças histopatológicas entre *Fusarium* e outros hialo-hifomicetos. Embora o gênero *Fusarium* possa ser identificado por cultura pela produção de macroconídios multicelulares hialinos, em forma crescente ou de banana, a identificação das espécies é difícil e pode exigir métodos moleculares (TORTORANO et al., 2014), tendo em vista que os macroconídios podem ser confundidos com outras espécies, como *Acremonium*, *Cylindrocarpon* ou *Verticillium* (ARAUJO et al., 2003).

Figura 4 - Características micromorfológicas básicas dos fungos fusarióides. A. Diferentes formatos dos macroconídios. B. Modelos de fiálides aéreas e organização microconidial. C. Conidióforo esporoquial e células conidiogênicas. D. Conidióforo aéreo com mesoconídio. E. Mesoconídio. F. Formas microconidiais.

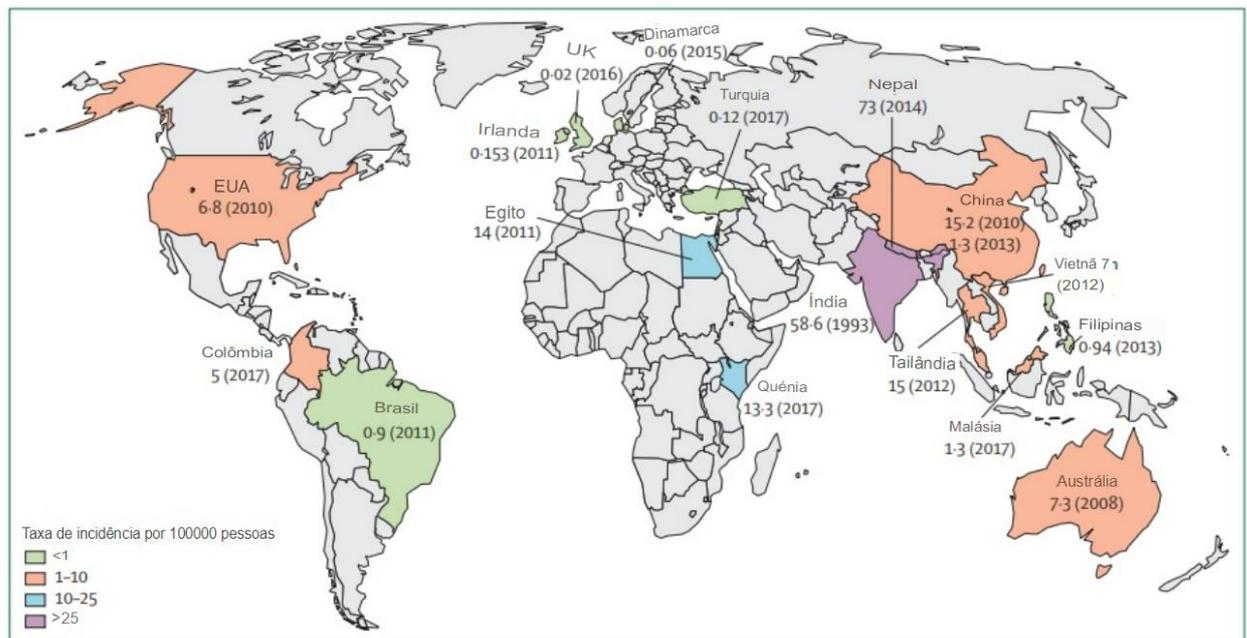


Fonte: Adaptado de Crous e colaboradores, 2021.

## 2.4. Epidemiologia

Até recentemente, a incidência global anual de ceratite fúngica nunca havia sido estimada. Brown e colaboradores (2020) estimaram a incidência de ceratite fúngica em 1.051.787 casos por ano, dentro de uma faixa entre 736.251 e 1.367.323 casos por ano. A incidência pode, de fato, ser maior em 1.480.916 casos por ano (intervalo de 1.036.641–1.925.191) se for assumido que todos os casos de cultura negativa não confirmados de ceratite microbiana foram na verdade de etiologia fúngica. A morbidade associada à CF também é importante observar: aproximadamente 10-25% dos olhos com CF irão perfurar ou necessitar de remoção cirúrgica, enquanto em menos 60% dos pacientes, mesmo se tratados, ficam monocularmente cegos, o que equivale a aproximadamente 800.000 pessoas por ano (HOFFMAN et al., 2021; PRAJNA et al., 2016; PRAJNA et al., 2013; BURTON et al., 2011) (Figura 5).

Figura 5 - Estimativa de ceratite fúngica por continente



Fonte: Adaptado de BROWN et al., 2020.

O padrão epidemiológico e os agentes causadores das úlceras corneanas supurativas variam significativamente entre diferentes países e mesmo entre regiões de um mesmo país (THOMAS et al., 2002). Como agente etiológico, a maior incidência é a de fungos filamentosos, em algumas partes do mundo o *Fusarium* foi relatado como o mais comum (CARVALHO, BORDIGNON et al., 2001; LECK, THOMAS et al., 2002; HOFLING-LIMA,

FORSETO et al., 2005; MAIDANA, GONZÁLEZ et al., 2005; XIE, ZHONG et al., 2006; BHARATHI, RAMAKRISHNAN et al., 2007), já em outras partes predominaram espécies de *Aspergillus* (UPADHYAY, KARMACHARYA et al., 1991; DUNLOP, WRIGHT et al., 1994; SAHA E DAS, 2006). De maneira diferente, nos EUA, existe uma prevalência predominante de leveduras destacando-se *Candida* spp. como agente etiológico mais comum (ROSA, MILLER et al., 1994; TANURE, COHEN et al., 2000).

O Brasil é um país tropical em desenvolvimento com extensas dimensões e diversas características ambientais, climáticas e socioeconômicas ao longo de sua extensão (DRUMOND et al., 2010). De acordo com o sistema de Köppen, o Brasil abriga cinco subtipos climáticos principais: equatorial, tropical, semiárido, tropical de altitude e temperado. Os biomas variam de florestas equatoriais no Norte e semiáridas no Nordeste, até florestas temperadas de coníferas no sul e savanas tropicais no Brasil central, mas a maior parte do país é tropical. (SABINO, et al., 2020).

No Brasil, as informações mais relevantes nesse sentido são as de Ibrahim e colaboradores (2012) que buscaram descrever a epidemiologia da infecção da ceratite fúngica no Brasil, monitorando a distribuição de vendas de antifúngicos colírios no Brasil. Um modelo de regressão linear exibiu uma associação significativa entre umidade relativa reduzida e vendas de medicamentos antifúngicos. Tal estudo demonstrou uma distribuição sazonal da ceratite micótica, com maior incidência durante o terceiro trimestre do ano (quando o clima é mais seco e quando a atividade agrícola é mais intensa no Brasil).

Ainda no contexto da epidemiologia da CF no Brasil, Hofling-Lima et al. em 2005 realizaram uma análise retrospectiva de 14.391 solicitações de exames laboratoriais de doenças infecciosas oculares, no período compreendido entre 1975 e maio de 2003, onde observaram 296/14.391 (2,05%) comprovações por cultura de infecção ocular micótica, sendo 265/295 (89,5%) identificadas como agente etiológico de ceratites, 27/295 (9,1%) de infecções intraoculares. Fungos filamentosos foram identificados em 233/295(78,7%) casos.

Existe ainda outro levantamento feito no Paraná por Carvalho et al., em 2001 que foi feito um estudo retrospectivo de dados de 298 pacientes com quadro de CM, no período de agosto de 1983 a janeiro de 1997. Houve uma prevalência de 49 (16,4%) casos de CF. Os fungos mais incidentes foram: *Fusarium* spp. (32%), *Aspergillus* spp. (16,5%), *Penicillium* spp. (10%) e *Candida* spp. (4,0%).

## 2.5. Características clínicas

Os pacientes geralmente apresentam um olho vermelho e dolorido, juntamente com visão reduzida. Ao exame clínico é demonstrado hiperemia conjuntival, fazendo com que o olho pareça vermelho, em conjunto com um infiltrado da córnea - uma área de opacidade da córnea, muitas vezes branca ou creme. Geralmente também há perda do epitélio da córnea sobrejacente ao infiltrado, que cora com colírio de fluoresceína tópica e fluoresce verde sob luz azul. Esses sinais clínicos podem ser observados sem lâmpada de fenda, simples lanterna com ou sem lupas será suficiente, auxiliado por um filtro azul e tiras de teste de fluoresceína (HOFFMAN et al., 2021). Um exame mais detalhado usando um biomicroscópio de lâmpada de fenda produz sinais mais sutis que pode ajudar a distinguir os diferentes agentes causadores de CF até certo ponto (THOMAS et al., 2005). Leck (2015) listou os seguintes sinais que sugerem ceratite fúngica (Figura 6):

- epitélio corneano acinzentado com uma camada ulcerada ou superfície infiltrada;
- infiltrado estromal com bordas irregulares, mostrando pouco ou nenhuma inflamação, que em grande aumento pode algumas vezes exibir hifas fúngicas filamentosas, explicando a aparência “fofa” das bordas do infiltrado;
- infiltrado amontoado;
- microinfiltrados "lesões satélites" disseminados através da córnea;
- anel imunológico de Wessely;
- placas endoteliais, hipópio.

Figura 6 – Principais características clínicas: A. Úlcera/margem infiltrada. B. Margem definida. C. Perfil elevado. D. Perfil plano.



Fonte: Adaptado de Leck e Burton (2015).

A progressão da ceratite fúngica geralmente ocorre mais lentamente do que a ceratite bacteriana, de modo que os sinais e sintomas podem aparecer vários dias após o trauma ou uso

de lentes de contato infectadas. No entanto, infecções ocasionadas por espécies de *Fusarium* podem evoluir rapidamente para perfuração da córnea e endoftalmia (BOURCIER et al., 2017). A endoftalmia é considerada uma forma rara e grave de inflamação ocular, podendo apresentar lesão irreversível e perda significativa da visão. Esta apresentação clínica é classificada em dois tipos: endoftalmia exógena e endoftalmia endógena. A endoftalmia exógena, ocorre por inoculação direta, como por exemplo traumas ou cirurgias intraoculares, diferente da endoftalmia endógena, ocasionada por infecções sistêmicas (SHEU, 2017).

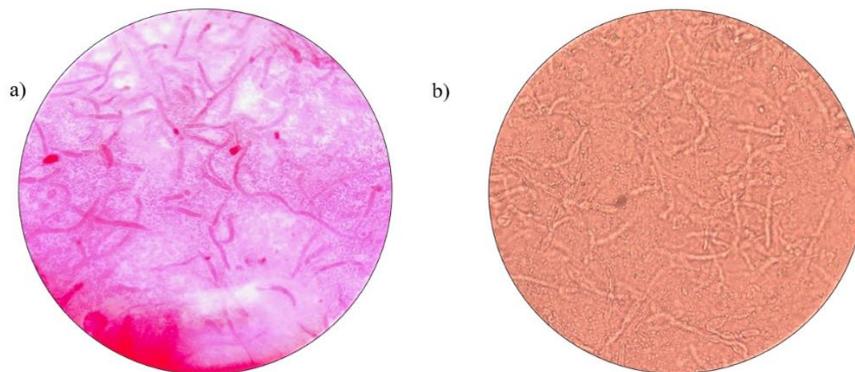
## 2.6. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da ceratite fúngica é baseado no exame clínico e exames laboratoriais. Ao exame clínico, o oftalmologista pode suspeitar da natureza da ceratite, porém o diagnóstico se estabelece perante a visualização de estruturas fúngicas, em raspado de córnea e cultura para fungos (DALMON et al., 2012; IBRAHIM et al., 2011; PUNIA et al., 2014).

A investigação laboratorial de uma lesão ocular inicia com a coleta apropriada da amostra, que possibilita realização de microscopia direta, cultura, histologia e outros testes (THOMAS, 2003). A amostra de material corneano é obtida através do debridamento do material da úlcera com ao auxílio de instrumento estéril como lâmina de bisturi, espátula de Kimura ou Swab (THOMAS, KURIAKOSE et al., 1991; Jacob, GOPINATHAN et al., 1995).

A microscopia possui papel fundamental no diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas e muitas vezes é a única ferramenta de diagnóstico disponível em locais onde a incidência de CF é mais alta. A presença de hifas fúngicas em preparações de raspagem da córnea é sempre significativa e são claramente visíveis usando coloração de Gram, KOH (Figura 7), calcofluor *White* ou lactofenol azul de algodão (HOFFMAN et al., 2021; MAHMOUDI et al., 2018; THOMAS, KALIAMURTHY, 2013). Deve-se ainda levar em consideração que muitos pacientes dão entrada com uso de medicação prévia, levando à ausência de crescimento do agente etiológico na cultura, e a microscopia torna-se de grande importância. O exame do material permite, em muitos casos, o estabelecimento de um diagnóstico (THOMAS, 2003). A baixa positividade da cultura é também atribuível ao tamanho muito pequeno da amostra, uso de qualidade da raspagem da córnea e inoculação incorreta de meios, além de fatores laboratoriais (NGO et al., 2020).

Figura 7 – Visualização de hifas fúngicas em lâminas de raspado corneano. a) técnica de coloração de Gram; b) clarificação com KOH.



Fonte: Própria autora.

### 2.6.1. Identificação molecular

A identificação de fungos filamentosos a nível de espécies é difícil por diversos fatores. Em particular pela sua taxonomia que, por vezes, pode ser complexa. Além disso, os aspectos macro e microscópicos desses fungos são altamente subjetivos, e com frequência levam a identificações erradas ou inconclusivas (MARINACH-PATRICE et al., 2009). A identificação torna-se ainda mais complicada se o fungo apresenta uma morfologia atípica, não esporular, ou se o organismo necessitar de mais tempo de incubação em meios especiais não disponíveis em laboratório e os resultados fenotípicos forem inespecíficos ou controversos (BALAJE et al., 2007).

O gênero *Fusarium* é um excelente exemplo dessas dificuldades, pois possui uma ampla distribuição e a taxonomia é conhecidamente como uma das mais complexas, pois apresenta uma alta variabilidade fenotípica (MARINACH-PATRICE et al., 2009). Uma das principais vantagens dos métodos moleculares são a sensibilidade e especificidade, sendo altamente discriminativos, mesmo com espécies intimamente relacionadas (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008)

Vários lócus gênicos foram testados para avaliar a relação filogenética de *Fusarium* spp., incluindo o DNA ribossômico (18S, 28S, ITS e IGS), DNA mitocondrial (mtSSU e mtLSU) (NELSON, 1994) e os genes codificadores de proteínas e de enzimas, como RNA polimerase (*RPB2*),  $\beta$ -tubulina (*BT2*) e fator de alongamento 1-alfa (*EF1- $\alpha$* ) (O' DONNEL et al., 2012). O gene *EF1- $\alpha$*  foi eleito o “código de barras” dentro do gênero *Fusarium*, pois tem alta utilidade filogenética pelas seguintes razões: (i) é altamente informativo a nível da espécie;

(ii) possui cópias não-ortólogas do gene; e (iii) é alinhável em todo o gênero *Fusarium*. Outro forte candidato ao código de barras do gênero é o gene codificador de proteína, tanto o *RPB1* quanto o *RPB2* (ROSA, 2018).

A identificação das espécies é otimizada quando realizada a combinação de genes informativos de ancestralidade, os quais apresentam variedade dentre as espécies (regiões polimórficas), como o *EF1- $\alpha$* , o *RPB2* e/ou o gene parcial da *BT2*. Os espaçadores transcritos internos (ITS) do RNAr também têm sido utilizados, no entanto, o ITS não tem poder de discriminar entre várias espécies estreitamente relacionadas e, ainda possui cópias não-ortólogas (AL-HATMI et al., 2016).

Métodos baseados em sequências de DNA são usados para identificação de espécies de um organismo (HOMA et al., 2013), tendo em vista que o sequenciamento de genes amplificados ainda é o padrão-ouro de identificação fúngica (MAHMOUD et al., 2018). Assim, a genotipagem pode ajudar a explicar a apresentação variável e resposta ao tratamento do mesmo gênero entre diferentes pacientes. Desta forma, esta técnica pode produzir importantes informações prognósticas e terapêuticas que possam melhorar o tratamento de infecções fúngicas oculares (MAHARAN et al., 2016).

## 2.7. Tratamento

O tratamento das CFs pode ser clínico ou cirúrgico. A terapia medicamentosa geralmente é escolhida empiricamente. O tratamento pode ser administrado topicamente (primeira linha, com dosagem intensiva de hora em hora durante pelo menos as primeiras 48 h), por via oral ou por via intravenosa, subconjuntival, córnea estromal ou injeção intracameral (GALARRETA, et al., 2007; ONG, et al., 2016).

A terapia cirúrgica, geralmente com terapêutica da ceratoplastia (transplante de córnea -substituindo a córnea doente por tecido de córnea doado), é geralmente reservada para casos de perfuração da córnea ou infecções progressivas refratárias à terapia médica. O transplante de córnea também pode ser realizado para reabilitação visual depois que a infecção aguda foi resolvida (HOFFMAN et al., 2021). A hospitalização se faz necessária quando há um progresso rápido da lesão com envolvimento do estroma ou em casos de não adesão ao tratamento (OU, ACHARYA, 2007). Bourcier (2017) relata um exemplo de protocolo adotado para o tratamento da CF o qual consiste na administração inicial de uma gota a cada hora por 7 dias, depois 1 gota a cada 2 horas por 3 semanas. A dose e a escolha do antifúngico são adaptadas de acordo com

a identificação do agente etiológico, sua sensibilidade e o curso clínico da infecção (BOURCIER et al., 2017).

Devido à escassez de colírios e medicamentos para uso oftálmico, é uma prática comum em ambientes hospitalares a reconstituição e gotejamento na região ocular, a partir de soluções antifúngicas ou pós para uso sistêmico. Contudo, não há consenso internacional sobre o agente ou combinação de agentes a serem utilizados. A Tabela 1 mostra os principais agentes antifúngicos com exemplos de protocolos adotados no tratamento da ceratite fúngica relatados na literatura (ORTEGA-ROSALES et al., 2019; SAHAY et al., 2017; BOURCIER et al., 2017).

Tabela 1 - Classificação, principais agentes antifúngicos usados no tratamento da ceratite fúngica.

Exemplo de protocolo para o tratamento da ceratite fúngica				
Estágio	Ação	Agente etiológico	Classe	Fármaco
Epitelial	Local	Leveduras	Polienos + Triazóis	Anfotericina B 0,25% + Voriconazol 1%
		Filamentosos	Polienos + Triazóis	Natamicina 5% + Voriconazol 1%
Estroma	Sistêmico	Levedura	Triazóis + Triazóis	Triflucan® (Fluconazol) pó (50 a 100 mg / dia) ou Sporanox® (Itraconazol) pó (200 a 400 mg / dia).
		Filamentosos	Triazóis	Vfend® (Voriconazol) pó (200 mg × 2 / dia) ± injeções intraestromais de Voriconazol (50g / 0,1 mL).

Fonte: Adaptado de Bourcier e colaboradores, 2017.

A natamicina tópica, também conhecida como pimaricina, é geralmente escolhida como terapia para ceratomicoses superficiais, independentemente de hifas septadas ou células de levedura são vistas por microscopia direta (THOMAS, KALIAMURTHY, 2013; SAHAY et al., 2019;). A natamicina (NAT) é produzida pela bactéria *Streptomyces natalensis*. Está disponível comercialmente para uso oftálmico na concentração de 5% (50 mg/mL). É um antifúngico poliênico que atua interagindo com o ergosterol presente na membrana da célula fúngica. Em contraste com outros antibióticos poliênicos que formam poros na membrana, NAT inibe o crescimento de fungos por inibição de aminoácidos e transporte de glicose através da membrana plasmática. NAT é conhecida por ter uma baixa penetração ocular por causa de seu alto peso molecular (SAHAY et al., 2019).

efeitos adversos. O uso prolongado de MNT pode estar associado a irritação leve, vermelhidão, sensação de corpo estranho, ardor, sensação de queimação e lacrimejamento. Reações de hipersensibilidade, embora raro, pode ocorrer com qualquer um dos antifúngicos tópicos drogas. Um dos problemas comuns com o uso de NTM é a aderência das partículas suspensas à área de ulceração epitelial, bem como nos fórnices e margens palpebrais.

Voriconazol (VCZ) é um antifúngico pertencente ao grupo químico da família dos azóis. O VCZ (peso molecular 349,3 g/mol) é um derivado lipofílico do fluconazol, diferenciando-se pela adição de um grupo metil em o esqueleto do propranolol e pela substituição de um triazol porção por um anel de fluoropirimidina. A ação de VCZ resulta na diminuição do nível de ergosterol, que é um componente essencial da formação da parede celular fúngica (PURKINS et al., 2002). VCZ está disponível em formulações orais e parenterais. O uso oftálmico na formulação tópica é *off-label* e requer a reconstituição da formulação parenteral disponível em uma forma de solução em uma concentração utilizável de 1% (10 mg/ml) (SHARMA et al., 2022). VCZ tem um amplo espectro de ação em comparação com outros azóis, possui ação dependente da dose. É fungistático em baixas concentrações e fungicida em altas concentrações (PURKINS et al., 2002).

A anfotericina B (AMB) foi o primeiro agente antifúngico utilizado clinicamente para ceratite fúngica. Foi precedido pela anfotericina A, que possui toxicidade muito elevada para uso clínico. (SAHAY et al., 2019). AMB é um macrólido polieno produzido por actinomicetos *Streptomyces nodosus* que interage com o ergosterol da membrana celular, interrompendo o função da membrana e causando a formação de poros. Isso resulta na morte do organismo por extrusão do conteúdo citoplasmático vital (SAHAY et al., 2019). AMB é um agente de amplo espectro e é ativo contra a maioria dos os fungos. Porém, o uso de AMB sistêmico é limitado por sua alta toxicidade, podendo causar efeitos adversos como insuficiência renal e hepatotoxicidade (PURKINS et al., 2002).

Para Thomas (2013), para tratar a ceratite micótica de forma eficaz, um medicamento deve ser não irritante e não tóxico ao olho; deve penetrar no tecido ocular e ter um alto nível de atividade antifúngica contra pelo menos um patógeno ocular significativo. Além disso, a toxicidade local dos antifúngicos é frequente e deve ser considerada (THOMAS et al., 2013). A duração mínima recomendada para o tratamento de CF que envolve lesão do tecido epitelial é de 6 semanas, quando há um comprometimento mais grave da córnea, envolvendo o estroma, esse tratamento varia e pode durar meses (BOURCIER et al., 2017).

Como a maioria dos agentes antifúngicos disponíveis apenas inibem o crescimento do fungo, e os mecanismos de defesa do hospedeiro devem erradicar o organismo, o tratamento é

geralmente prolongado. O tratamento pode ser iniciado baseado apenas em achados de microscopia direta se estes forem inequívocos e compatíveis com a avaliação clínica; de outra forma, a terapia deve ser suspensa enquanto se aguarda os resultados da cultura (THOMAS, KALIAMURTHY, 2013), tendo em vista que testes de sensibilidade a antifúngicos ao contrário da ceratite bacteriana, não são frequentemente usados em ceratite fúngica (LALITHA et al., 2007).

Diante do exposto é possível afirmar que poucos estudos abordam, de maneira sistemática a ceratite fúngica no Brasil, em especial, no Nordeste, necessitando-se mais pesquisas para elucidar essa micose oportunista, e de crescente incidência, constatada em levantamentos das últimas quatro décadas. A compreensão epidemiológica local e identificação dos fatores de risco, agregados ao diagnóstico micológico precoce e eficaz, justificam este estudo, pois são fundamentais para uma correta conduta terapêutica da CF, e para um prognóstico visual favorável ao paciente.

### 3. HIPÓTESES

1. A ceratite fúngica acomete predominantemente a população com faixa etária de 21 a 50 anos do sexo masculino.
2. Os principais agentes etiológicos das CF no estado do Ceará são *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp.
3. Trauma, uso de lente de contato e doenças imunossupressoras são os principais fatores predisponentes para ocorrência de CF nos pacientes do estudo.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral:**

Caracterizar o perfil clínico, epidemiológico, laboratorial e molecular dos isolados fúngicos de pacientes com ceratite fúngica no estado do Ceará.

### **4.2. Objetivos Específicos:**

1. Determinar as frequências dos principais marcadores clínicos e epidemiológicos dos pacientes com ceratite fúngica no período estudado;
2. Isolar fungos de amostras clínicas obtidas de ceratites de pacientes atendidos em unidades hospitalares de oftalmologia em Fortaleza;
3. Analisar fenotipicamente, pela macro e micromorfologia, os isolados fúngicos;
4. Comparar o genótipo das amostras selecionadas para análise filogenética;
5. Traçar o perfil de sensibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, natamicina e voriconazol.

## 5. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo epidemiológico, observacional, descritivo e experimental com um eixo retrospectivo e outro prospectivo dos casos de ceratite infecciosa de outubro de 2019 a março de 2022.

### 5.1 Concepção, Cenário do Estudo e aprovação ética

Rastreamos retrospectivamente pacientes de duas unidades hospitalares (Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio e Hospital de Olhos Leiria de Andrade, situados em Fortaleza, Ceará, Brasil), que encaminharam amostras de ceratites para o laboratório de análises clínicas Emílio Ribas Medicina Diagnóstica até aprovação do comitê de ética. Mediante aprovação obtida em 06 de abril de 2021 (CAAE 40737720.5.0000.5054 (Anexo II)), foi iniciado a parte prospectiva do estudo nos mesmos locais, com o acréscimo do laboratório de Bioagentes Infecciosos da Universidade Federal do Ceará, o qual também recebeu amostras para análises.

### 5.2 População do estudo

Foram incluídos no estudo retrospectivo pacientes adultos com suspeita de ceratite infecciosa que foram atendidos nas duas unidades hospitalares supracitadas e obtiveram cultura positiva.

No estudo prospectivo, pacientes adultos com suspeita de ceratite infecciosa que foram atendidos nas duas unidades hospitalares e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III) entraram no estudo.

Foram excluídos os casos de ceratite provável ou suspeita, sem confirmação diagnóstica ou cujos dados clínicos-epidemiológicos não estão inteiramente disponibilizados no prontuário.

### 5.3 Locais do estudo

Duas unidades hospitalares e três unidades laboratoriais localizadas no município de Fortaleza-CE foram os locais onde foi concentrado o estudo:

**5.4.1 Emílio Ribas Medicina Diagnóstica (ERMD)**- é um laboratório de análises clínicas que em sua rotina recebe com frequência materiais de úlcera de córnea para exames

microbiológicos. Foi realizada consulta ao banco de dados (Sistema Shift) dos pacientes que realizaram exames microbiológicos de úlceras de córnea no período compreendido entre outubro de 2019 a julho de 2020 que foram atendidos no Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio e Hospital de Olhos Leiria de Andrade. Os isolados fúngicos que são armazenados na coleção de fungos do setor de Microbiologia foram disponibilizados para a realização deste estudo.

**5.4.2 Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio** - é uma unidade hospitalar de referência em oftalmologia que atende todo o estado do Ceará e envia com frequência amostras de úlcera de córnea para exames microbiológicos ao ERMD. Mensalmente, a instituição possui uma média de 700 atendimentos entre consultas e exames, além de cerca de 40 cirurgias de diferentes complexidades.

**5.4.3 Hospital de Olhos Leiria de Andrade** - compreende um centro especializado em Oftalmologia de referência em oftalmologia, com tradição de mais de 50 anos de atendimento de pacientes de todo o estado do Ceará. São realizadas cerca de 9500 consultas dentre eletivas e de urgência, mais de 3000 exames e em torno de 800 cirurgias mensalmente no referido hospital.

**5.4.4 Laboratório de Bioagentes Infecciosos** - é um laboratório do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), que desenvolve estudos com enfoque em Micologia. No local, foram processadas amostras coletadas durante o estudo prospectivo das unidades hospitalares, como também foi realizado os testes de sensibilidade.

**5.4.5 Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes** - localizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), o laboratório desenvolve estudos em epidemiologia, diagnóstico e interação patógeno-hospedeiro dentro da Micologia Médica. Uma parte das cepas do estudo foram enviadas para análise molecular.

## **5.4 Coleta de dados**

Dados clínico-epidemiológicos e demográficos foram coletados dos prontuários por meio de questionário estruturado (Anexo I) com perguntas fechadas como: sexo, idade na admissão, cidade de origem, fatores de risco (lentes de contato, trauma, cirurgias prévias, imunossupressão), comorbidades (diabetes, hipertensão), sinais e sintomas (dor nos olhos, vermelhidão, visão turva, dor de cabeça, fotofobia, excesso de lágrimas ou outra descarga), tempo entre o início dos sintomas e cuidados médicos, tratamento e resultado.

## 5.5 Coleta de material

As amostras clínicas dos pacientes com suspeita de ceratite infecciosa encaminhadas para a realização do diagnóstico laboratorial foram colhidas por um oftalmologista, de material proveniente diretamente da córnea. Os raspados corneanos foram colhidos, depois de instilado colírio anestésico, com auxílio da lâmpada de fenda utilizando-se a espátula de Kimura ou bisturi nº15. As amostras clínicas foram colhidas preferencialmente das bordas da lesão, duas zaragatoas de algodão foram friccionadas na amostra contida na espátula de Kimura ou bisturi nº15 e imediatamente inoculadas em dois tubos contendo meio de cultura ágar Sabouraud Cloranfenicol (Biomérieux, France) e ágar Sabouraud Cloranfenicol Gentamicina (Biomérieux, France) para obtenção de cultura. Paralelamente, o raspado de córnea foi fixado em duas lâminas de vidro para posterior observação ao microscópio.

## 5.6 Processamento de amostras

### 5.6.1 *Exame direto:*

A preparação para o exame microscópico direto foi realizada pela técnica de coloração de Gram e através da clarificação do material clínico com Hidróxido de Potássio (KOH) a 20%. A leitura das duas lâminas foi realizada com aumento de 1000x e 400x, respectivamente.

### 5.6.2 *Isolamento dos fungos:*

Os meios inoculados com amostra clínica foram incubados a temperatura ambiente e examinados visualmente em dias alternados por até 30 dias. Os cultivos positivos foram separados em leveduras e fungos filamentosos para identificação etiológica através de técnicas manuais padronizadas (DE HOOG et al.,2000; KONEMAN et al., 2008; SIDRIM & ROCHA, 2004). Não houve isolamento de fungos dimórficos.

A identificação de gênero obedeceu ao padrão abaixo:

- Leveduras – micro e macromorfologia; isolamento em CHROMagar Candida (Biomérieux, France); automação (Vitek 2 Compact, BioMérieux);
- Fungos filamentosos – micro e macromorfologia; microcultivo;

A partir do crescimento fúngico, procedeu-se a caracterização macroscópica das colônias. As características macromorfológicas observadas foram em relação ao tipo de crescimento (aéreo rasteiro), aspecto da colônia (seca ou úmida), cores observadas tanto no

anverso quanto no reverso, produção ou não de pigmento; presença ou ausência de sulcos, estrias e protuberância central; tipo da superfície da colônia (lisa, rugosa, mucoide, cremosa, pastosa, cerebriforme, algodonosa, pulverulenta, aveludada, opaca ou brilhante); e as bordas da colônia (ondulada, franjada, arredondada, lisa) (KONEMAN et al., 2008).

Após essas observações foi realizada a técnica de microcultivo segundo Riddell (1950). Transcorrido o crescimento dos fungos, em torno de 7 a 10 dias, foi adicionado aproximadamente 2 mL de formaldeído PA (Labsynth, Brasil) na placa de Petri contendo a lâmina de microcultivo. Vinte e quatro horas depois, as lâminas foram preparadas para a leitura utilizando o corante lactofenol azul de algodão (SEIFERT et al., 2014). Foram avaliadas as estruturas microscópicas como características das hifas (septada ou cenocítica, hialina ou demáceas); características do corpo de frutificação e dos esporos tendo como base critérios estabelecidos por Alcântara, Cunha e Almeida (2001).

Para as leveduras, os isolados foram inoculados em meio de CHROMagar Candida (Biomérieux, France) para identificação presuntiva da espécie. A identificação final foi confirmada pelo método de automação (Vitek 2 Compact, BioMérieux).

Os isolados fúngicos foram estocados seguindo as recomendações de Crous et al. (2021) com algumas alterações. Foi feita uma suspensão do micélio aéreo das colônias em solução salina e acrescentado uma gota de glicerol 10% em criotubos. Em seguida as cepas foram estocadas em duplicatas a -20°C.

Para reativação das cepas, os criotubos foram descongelados, dispensados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e estocados em temperatura ambiente por 5 dias. Após esse período, o conteúdo dos caldos foi inoculado em tubos contendo ágar batata por um período de 5 a 10 dias em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, para posterior realização de experimentos.

## **5.7 Identificação molecular**

Um total de 38 cepas isoladas identificadas como *Fusarium* spp. foram enviadas para o Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes (LAPEM) na Universidade Federal de São Paulo para realização de sequenciamento genético e genotipagem.

### 5.7.1 *Extração de DNA*

Os isolados fúngicos foram cultivados em ágar Sabouraud por 7 dias a temperatura ambiente e foram preparadas para extração de DNA utilizando o kit comercial FastDNA (MP Biomedicals, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram transferidas para tubos contendo microesferas de vidro e cerâmica e 1,0 mL de CLS-Y foi adicionado. As amostras foram lisadas em homogeneizador de tecidos Precellys (Uniscience Corporation, EUA) e centrifugadas a 20.000g. O sobrenadante foi homogeneizado a 650 µL de Binding Matrix e centrifugado novamente. O pellet foi purificado utilizando 500,0 µL de SEWS-M e seco em concentrador a vácuo Speedvac (Eppendorf, EUA). Cerca de 100,0 µL de solução DES foram adicionados ao pellet para eluição do DNA total ligado à matriz. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Cerca de 100,0 ng/µL foram adquiridos no processo de extração de DNA, inferidos em Nanodrop 2000 (Thermofisher, EUA).

### 5.7.2 *Sequenciamento genético*

As amostras de *Fusarium* foram sequenciadas para os genes *RPB2* e *TEF1α* para a identificação molecular. Os iniciadores de cada alvo molecular foram: *RPB2-5f2* e *RPB2-7cr* (*RPB2*) (O'DONNEL et al., 2007), EF1 e EF2 (*TEF1α*) (O'DONNEL et al., 1988). Os alvos foram amplificados utilizando o kit PCR Master Mix (Promega Corporation, Reino Unido), contendo 50,0 U/mL de Taq DNA polimerase em seu tampão de reação buffer (pH 8.5) com 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 400,0 µM de cada dNTP, cerca de 5,0 µM dos iniciadores *forward* e *reverse* de cada alvo foram incorporados a reação junto com 50,0 ng de amostra de DNA-alvo. A positividade das reações foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1,2%. Cerca de 25,0 ng dos amplicons foram adicionados para reação de hibridização utilizando o kit BygDye v3.0 (Thermofisher, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Os amplicons foram sequenciados em eletroforese capilar no sequenciador automático SeqStudio (Thermofisher, EUA). Cada alvo molecular teve ambas as fitas de DNA sequenciadas.

### 5.7.3 *Análise filogenética e identificação molecular*

As sequências obtidas foram analisadas e curadas para montagem de uma *contig* usando as sequências diretas e inversas de cada alvo. Um *dataset* com amostras de referência foi

montado para análise filogenética. Os *dataset* foram alinhados utilizando o MAFFT (KATOH et al., 2008), e um *dataset* concatenado foi gerado para a identificação molecular. Para a reconstrução filogenética foi utilizado o método máxima verossimilhança (ML) aplicando o modelo de substituição Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) com distribuição G (como indicado no jModel Test (2008), e 1,000 réplicas de *bootstrap* (bt) no *software* MEGA 7 (KUMAR et al., 2016). A reconstrução obtida por ML também foi comparada a reconstrução pelos métodos máxima parcimônia (MP) e Neighbor-joining (NJ). A identificação molecular foi considerada para clados com valor de *bt*>98%, de acordo com o grupamento com uma cepa de referência (cepa-tipo).

#### 5.7.4 *Rede de haplótipos*

Haplótipos referem-se a combinações de alelos marcadores que estão localizados próximos no mesmo cromossomo e que tendem a ser herdados juntos. Com a disponibilidade de marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de alta densidade, os haplótipos desempenham um papel importante em estudos de associação (LIU et al., 2008). Desta forma, para evidenciar a associação de cepas clonais do referido estudo, as sequências obtidas foram submetidas ao DnaSP (ROZAS et al., 2017) para análise haplotípica dos isolados deste estudo. Uma rede de haplótipos foi construída no *software* Network (Fluxus Technology, EUA) utilizando o método de *median joining*.

#### 5.7.5 *Análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado -AFLP*

Os isolados foram submetidos à análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) utilizando a conjunto de marcadores denominados como C2 e C6 desenvolvidos para tipagem molecular de *Fusarium* de interesse (MONTEIRO, 2022). Resumidamente, a análise de AFLP foi realizado segundo De Carvalho et al. 2020 (CARVALHO et al., 2020), 200,0 ng de DNA foram submetidas a restrição utilizando as enzimas *EcoRI* e *MseI* (New England Biolabs, Reino Unido) acoplada a ligação com T4 DNA Ligase (Promega Corporation, Reino Unido) de adaptadores para cada região de corte das enzimas.

Cinco microlitros do produto de reação da ligação/restrrição foram usados como *input* para amplificação pré-seletiva. Na reação seletiva com iniciadores fluorescentes, foi realizada utilizando os conjuntos de marcadores C2 (bases seletivas AT/TA) e C6 (bases seletivas

GA/TT). Os fragmentos amplificados foram submetidos à análise de fragmentos no SeqStudio (ThermoFisher, EUA). Os eletroferogramas obtidos foram exportados para o *software* Bionumerics (Applied Maths, EUA) para análise computacional.

#### 5.7.6 *Análise de clusterização e dimensional dos perfis AFLP*

Os perfis AFLP obtidos no estudo de *Fusarium* foram analisados quanto a sua clusterização com cepas conhecidas (MONTEIRO, 2022). A similaridade entre os isolados foi calculada utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard (1912) e o dendrograma foi construído com base no método distância definido método aritmético médio do grupo de pares não ponderados (UPGMA). Uma rede de extensão mínima (MST) também foi calculada com base na matriz de similaridade entre as amostras. Para análise dimensional, o método de análise de componentes principal foi utilizado para definir a contribuição dos alelos descritos na clusterização dos isolados estudados.

### 5.8 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

A suscetibilidade *in vitro* para os fungos isolados foi realizada utilizando a metodologia de microdiluição em caldo seguindo o documento M38-A (2008) proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com algumas alterações.

#### 5.8.1 *Agentes antifúngicos*

Anfotericina B, natamicina e voriconazol foram utilizados para verificar a suscetibilidade *in vitro* dos fungos. Estes antifúngicos foram obtidos na forma de pó dos seus respectivos fabricantes, dissolvidos em DMSO (Dimetilssulfóxido) e diluídos em RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 mol/L de tampão MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico) para pH 7,0 e esterilizado por filtração (Tabela 2).

Tabela 2- Agentes antifúngicos, procedência, variações das concentrações e referências usada no teste de suscetibilidade in vitro.

<b>Antifúngico</b>	<b>Procedência</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>Fonte da diluição</b>
Anfotericina B	Sigma-Aldrich, EUA	de 0,15µg/ml - 8 µg/ml	M38-A (2008)
Natamicina,	Sigma-Aldrich, EUA	0,25 µg/ml – 128 µg/ml	MANIKANAN et al., 2019
Voriconazol	Pfizer, USA	de 0,15µg/ml - 8 µg/ml	M38-A (2008)

### 5.8.2 *Preparo do inóculo e realização do teste de sensibilidade*

Para formação dos inóculos, os isolados foram repicados em placas de ágar chocolate Polyvitex (Biomérieux, France) a 28°C e em microaerofilia por 48h. Os conídios foram coletados com swab estéril e suspensos em tampão fosfato-salino (PBS) com pH neutro com 0,005% Tween20. A concentração foi padronizada entre 0,4 e 5 x 10<sup>4</sup> conídios/mL por meio de leitura em câmara Neubauer. Em seguida, foi realizada diluição 1:50 em meio RPMI1640 e depositado 100 µl do inóculo em placa de 96 cavidades de fundo redondo contendo 100 µl RPMI1640 suplementado com drogas (CLSI, 2008) e incubadas a 35°C por 48 horas. Para formação dos inóculos, os isolados foram repicados em placas de ágar chocolate Polyvitex (Biomérieux) a 28°C e em microaerofilia por 48h. Os conídios foram coletados com swab estéril e suspensos em tampão fosfato-salino (PBS) com pH neutro com 0,005% Tween20. A concentração foi padronizada entre 0,4 e 5 x 10<sup>4</sup> conídios/mL por meio de leitura em câmara Neubauer. Em seguida, foi realizada diluição 1:50 em meio RPMI1640 e depositado 100 µl do inóculo em placa de 96 cavidades de fundo redondo contendo 100 µl RPMI1640 suplementado com drogas (CLSI, 2008) e incubadas a 35°C por 48 horas.

### 5.8.3 *Leitura do teste*

A leitura foi realizada após 48 horas de incubação a temperatura de 35°C. A concentração inibitória mínima (CIM) de anfotericina B e natamicina foi definida como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir o crescimento total do microrganismo enquanto para voriconazol a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir pelo

menos 50% do crescimento do microrganismo, comparado ao controle (livre do agente antifúngico).

Controle dos agentes antifúngicos, do inóculo e do meio de cultura (RPMI 1640) e uma cepa de *Aspergillus flavus* ATCC 204304 foi utilizada em cada rodada teste. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

## 6. RESULTADOS

Das 226 amostras, compreendendo 222 raspados de córnea e 4 botões corneanos, de pacientes atendidos em ambas unidades hospitalares durante o período de coleta, um total de 50 amostras entraram no estudo.

### 6.1 Fatores associados à ocorrência de ceratite fúngica

As variáveis demográficas são mostradas na Tabela 3. A média de idade dos pacientes analisados foi de 44,7 anos e variou de 26 a 76 anos. O grupo de maior número pertencia à faixa etária entre 41 a 60 anos. Entre os pacientes, 74% eram do sexo masculino e 26% do sexo feminino. Um total de 60 % dos pacientes possuía a residência em Fortaleza, capital do Ceará, enquanto que 40% eram oriundos da área metropolitana ou municípios no interior do estado.

Tabela 3 - Caracterização demográficas dos pacientes de ceratite fúngica.

Variáveis	Ceratite fúngica (n=50)	
	Nº	%
Sexo		
Masculino	37	74,0
Feminino	13	26,0
Faixa etária		
De 18 a 20 anos	0	0
De 21 a 40 anos	20	40,0
De 41 a 60 anos	25	50,0
De 61 a 85 anos	5	10,0
Residência		
Capital	30	60,0
Região metropolitana e municípios	20	40,0

O levantamento dos prontuários médicos, quanto à distribuição de doenças de base, demonstrou que doenças que afetam o sistema cardiorrespiratório foi o relato frequente, com ênfase a hipertensão arterial sistêmica (HAS), citado em 6 prontuários equivalente a 12,0% das citações (Tabela 4). Dentre as patologias, observa-se que *diabetes mellitus* foi a segunda doença mais citada pelos pacientes, 5 (10,0%), e doenças degenerativas com 2 casos (4,0%).

Com relação às condições predisponentes e/ou associadas, constatou-se que o traumatismo ocular ocorreu em 18/50 (36,0%) dos casos. Um total de 18 pacientes não informou qualquer condição.

O transplante de córnea prévio, devido a outras complicações anteriores ao resultado micológico, representou 10,0% (5/50) das condições predisponentes e/ou associadas. Um

paciente relatou já ter sido acometido por ceratite herpética. Apenas 1 paciente (2,0%) relatou fazer o uso de lentes de contato e 8 negaram (16,0%); 41(82,0%) não foi informado no prontuário se faz uso de lentes.

Tabela 4 - Número e porcentagem de pacientes segundo variáveis clínicas.

Variáveis	Ceratite fúngica (n=50)	
	Nº	%
Tipo de comorbidade <sup>1</sup>		
Diabetes	5	10,0
Hipertensão arterial	6	12,0
Doença degenerativa	2	4,0
Sem informação	18	36,0
Uso de lentes de contato		
Sim	1	2,0
Não	8	16,0
Sem informação	41	82,0
Aspectos clínicos concomitantes		
Glaucoma	1	2,0
Processo infeccioso pós-cirúrgico	6	12,0
Pós-transplantado	5	10,0
Trauma	18	36,0

<sup>1</sup>cada paciente poderia apresentar 1 ou mais tipos de comorbidades, lesão ou aspectos clínicos concomitantes

## 6.2 Sintomas e medicação prévia dos pacientes

Os principais sintomas apresentados pelos pacientes com afecções oculares no momento do exame físico estão descritos na Tabela 5. Nos 50 pacientes com diagnóstico de ceratite, as principais queixas foram: dor (40/50; 80,0%), diminuição da acuidade visual (22/50, 44,0%) e vermelhidão (17/50; 34,0%). Segundo dados da tabela todos os pacientes utilizaram algum medicamento antes da coleta de material para exame microbiológico. Houve maior utilização de fluoroquinolona (32/50; 64,0%) e anfotericina B (21/50; 42,0%). A informação sobre o espaço de tempo entre o aparecimento dos sintomas e a consulta inicial foi respondida por 35 pacientes (70,0%) e variou de 3 a 60 dias.

Tabela 5 - Número e porcentagem de pacientes segundo sintomas, medicação prévia e tempo de evolução até assistência médica.

Variáveis	Ceratite fúngica (n=50)	
	Nº	%
<b>Sintomas e sinais<sup>1</sup></b>		
Dor	40	80,0
Baixa acuidade visual	22	44,0
Vermelhidão	17	34,0
Fotofobia	7	14,0
Secreção	6	12,0
Desconforto	4	8,0
Lacrimejamento	4	8,0
Irritação	3	6,0
Edema palpebral	1	2,0
<b>Medicamentos antes da coleta<sup>1</sup></b>		
Fluoroquinolonas	32	64,0
Anfotericina B	21	42,0
Aminiglicosídeos	24	48,0
Glicopeptídeos	19	38,0
Corticoide	7	14,0
Natamicina	5	10,0
Quinolona	3	6,0
Cefalosporina	1	2,0

<sup>1</sup>cada paciente poderia apresentar um ou mais sintomas e fazer o uso de um ou mais medicamentos.

### 6.3 Diagnóstico laboratorial

Considerando-se os critérios laboratoriais para identificação dos agentes etiológicos das ceratites fúngicas, realizados nos laboratórios Emílio Ribas Medicina Diagnóstica e Laboratório de Bioagentes Infecciosos, os resultados dos exames de cultura fúngica realizados para diagnóstico estão apresentados na Tabela 6.

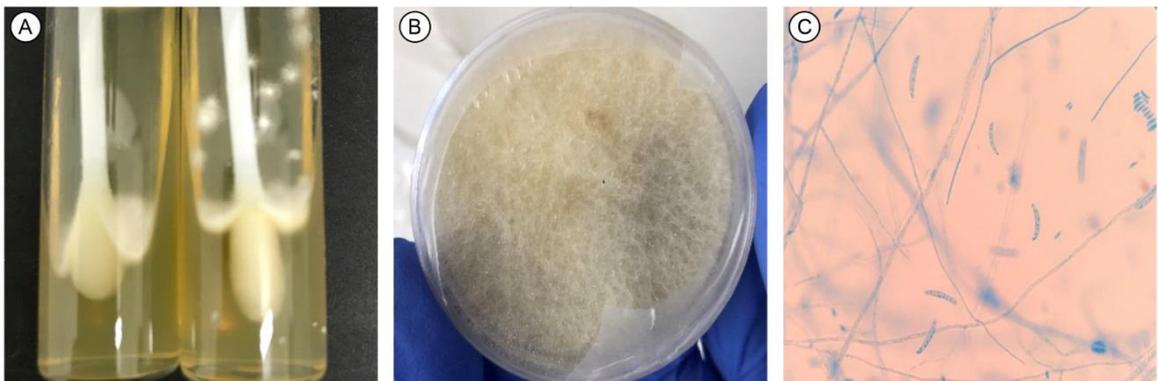
Tabela 6 - Número e porcentagem dos agentes etiológicos isolados das culturas para fungos.

Agente etiológico	Casos (n=50)	
	Nº	%
<i>Fusarium</i> spp.	42	84,0
<i>Aspergillus</i> spp.	4	8,0
<i>Curvularia</i> spp.	1	2,0
<i>Scedosporium</i> spp.	1	2,0
<i>Neoscytalidium</i> spp.	1	2,0
<i>Candida parapsilosis</i>	1	2,0

Quanto aos exames microscópicos, a pesquisa de fungos revelou estruturas fúngicas em 66% dos casos (33/50). Foi informado o resultado negativo para 30% (15/50) das solicitações de pesquisa direta e dois pacientes não tiveram exames microscópicos solicitados.

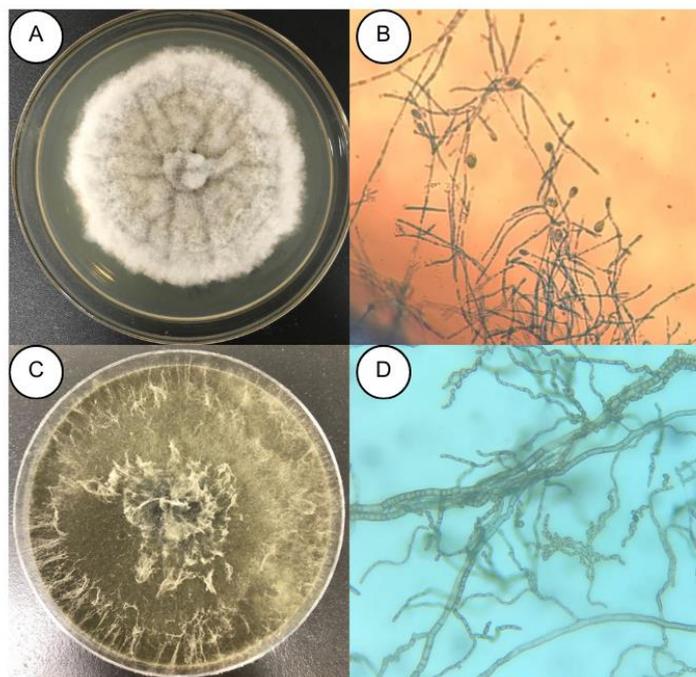
Foi constatado o predomínio do gênero *Fusarium* spp. em 84,0% (42/50) dos achados (Figura 8). O agente etiológico *Aspergillus* spp. foi isolado em 8,0% (4/50) dos casos.

Figura 8 - Características do cultivo de *Fusarium*.



a) cultivo de raspado corneano positivo; b) isolamento em ágar Sabouraud dextrose (7 dias de incubação a 27°C); c) características micromorfológicas. Fonte: Própria autora.

Figura 9 - Características do cultivo de *Scedosporium* sp. e *Neoscytalidium* sp.



a) e c) isolamento de *Scedosporium* sp. e *Neoscytalidium* sp. em ágar Sabouraud dextrose (7 dias de incubação a 27°C), respectivamente; b) e d) características micromorfológicas de *Scedosporium* sp. e *Neoscytalidium* sp., respectivamente. Fonte: Própria autora.

#### 6.4 Procedimento terapêutico pós-coleta e evolução clínica

Na tabela 7 estão elencados os medicamentos administrados aos pacientes com ceratite fúngica após a evidência dos resultados microbiológicos. Anfotericina B e cetoconazol foram os antifúngicos mais utilizados. Fluoroquinolonas (23; 46,0%) e aminoglicosídeos (5;10,0%) foram os antibióticos com maior número. O uso de corticoide foi relatado em 28,0% (14/50) dos casos. A ceratoplastia (transplante de córnea) ocorreu em 48,0% dos casos (24/50). Um paciente realizou o procedimento três vezes, por motivo de falência. Outro paciente realizou o transplante de córnea duas vezes e em seguida a evisceração do globo ocular.

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes segundo tratamento após exame clínico e isolamento fúngico na cultura.

Tratamento	Ceratite fúngica (n=50)	
	Nº	%
Medicamentos após coleta <sup>1</sup>		
Anfotericina B	39	78,0
Fluoroquinolonas	23	46,0
Cetoconazol	15	30,0
Corticoide	14	28,0
Aminoglicosídeos	5	10,0
Natamicina	5	10,0
Quinolonas	3	6,0
Fluconazol	3	6,0
Cefalosporinas	2	4,0
Tetraciclina	2	4,0
Transplante de córnea <sup>2</sup>	24	48,0
Evisceração	1	2,0

<sup>1</sup>cada paciente poderia fazer o uso de um ou mais medicamentos. <sup>2</sup>cada paciente poderia ter realizado mais de um transplante

Figura 10 - Evolução clínica de paciente atendido no Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio. A. Úlcera de córnea grave, infiltrando toda córnea, com fundo brancacento. B. Hiperemia conjuntival, úlcera corneano com fundos brancacentos com afinamento central. C. Hiperemia conjuntival, com úlcera de córnea grave, com descemetocel. D. Pós transplante de córnea, conjuntiva discretamente hiperemiada, com córnea com boa transparência com suturas patentes.



Na Tabela 8 encontram-se detalhadas as características clínicas-epidemiológicas dos 50 casos de ceratite fúngica durante o período do estudo.

Tabela 8 - Características clínicas-epidemiológicas dos casos de CF do presente estudo.

Caso/ Identificação	Idade/Sexo Origem	Condições predisponentes e/ou associadas	Tempo	Sintomas	Características clínicas	Tratamento		
						Cultura	Pré-diagnóstico	Pós-diagnóstico
1	26/M Fortaleza	NI	30 dias	Dor	Olho calmo, lesão hifada intracorneana	<i>Neoscytalidium</i> sp.	NAT, GAT, CTZ	NAT, GAT, CTZ <b>TX</b>
2/ 4557-2	40/M/ Sobral	NI	NI	Dor, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada	<i>F. dimerum</i> senso lato	NI	NI
3	36/M Fortaleza	Trauma	18 dias	Dor,BAV, vermelhidão, fotofobia	Conjuntiva hiperemiada, IC, lesão fluor positiva	<i>Fusarium</i> sp.	MOX, TOB	AMB
4/ 4558-4	34/F/ Fortaleza	Trauma	15 dias	Dor, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, lesão central com bordas indefinidas	<i>F. dimerum</i> senso lato	VAN, GEN, AMB	AMB
5	31/M Acarauá	Trauma	20 dias	Dor e vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada fluor positiva	<i>Fusarium</i> sp.	MOX, AMB, corticóide	MOX, AMB, corticóide <b>TX</b>
6	40/M Solonópole	NI	10 dias	Dor,BAV, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, lesão elevada fluor positiva	<i>Aspergillus</i> sp.	VAN	AMB,VAN,CTZ
7/ 4560-9	33/M Caucaia	Trauma vegetal	22 dias	Dor, secreção lacrimajando	Conjuntiva hiperemiada, córnea opaca, fluor positiva	<i>F. dimerum</i> senso lato	VAN, GEN	MOX, AMB, corticóide <b>TX</b>
8	42/M Maracanaú	Trauma	5 dias	Desconforto	Conjuntiva hiperemiada, edema palpebral e córnea com lesão	<i>Scedosporium</i> sp.	MOX, GEN, VAN	AMB, VAN, CEFT <b>TX</b>
9/ 4562-13	70/F Fortaleza	Cirurgia ocular prévia HAS	NI	Dor, BAV	Conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada fluor positiva	<i>F. suttonianum</i>	GEN, VAN, AMB	MOX, AMB, corticóide <b>TX</b>
10	53/F Cruz	NI	6 dias	Dor, BAV vermelhidão e lacrimajando	Conjuntiva hiperemiada, injeção ciliar, lesão fluor positiva em eixo visual, hipópio	<i>Fusarium</i> sp.	TOB, MOX, AMB	VAN, GEN, AMB, CTZ, CIPRO <b>TX</b>
11	41/M Solonópole	Trauma, facectomia	NI	BAV, vermelhidão	Conjuntiva calma e clara, CA limpa	<i>Aspergillus</i> sp.	NI	NI
12	55/M Jucás	NI	NI	Dor, BAV	Conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada fluor positiva	<i>Fusarium</i> sp.	NI	NI
13/ 4563-17	37/M Fortaleza	Trauma	7 dias	Dor, secreção	Conjuntiva hiperemiada, lesão central, hipópio	<i>F. falciforme</i>	MOX, GEN, VAN, AMB	AMB
14/ 4564/18	69/F Ocara	Histórico de ceratite herpética, HAS, DM, Glaucoma	3 dias	Dor, BAV, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, úlcera geográfica, hipópio	<i>F. fujikuroi</i> senso lato	MOX, corticoide	MOX, AMB, corticoide <b>TX, Re-TX, Evisceração</b>
15	42/M Fortaleza	Trauma	NI	Dor, fotofobia e secreção	Conjuntiva hiperemiada, lesão fluor positiva, hipópio, pupila não reagente	<i>Fusarium</i> sp.	MOX, TOB	AMB

16/ 4565-20	45/F Fortaleza	Trauma	NI	Dor, ardor, fotofobia, BAV	Pálpebra edemaciada, conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada	<i>F. dimerum</i> senso lato	AMB, MOX, corticoide	AMB, MOX, corticoide
17	41/M Solonópole	NI	7 dias	Irritação, secreção	Conjuntiva hiperemiada, edema palpebral, córnea transparente flúor negativa	<i>Fusarium</i> spp.	MOX, CTZ, CIP	AMB, corticoide <b>TX</b>
18	41/M Fortaleza	Trauma	10 dias	Fotofobia, dor, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, injeção ciliar, córnea com lesão flúor positiva paracentral, melting, CAF, hipópio	<i>Fusarium</i> sp.	CIP, MOXI, VAN, AMI, AMB	DOX, AMB, CTZ, corticoide <b>TX</b> <b>RE-TX</b>
19/ 4566-24	45/M Fortaleza	Pós- cirúrgico <b>2º TX</b> córnea	NI	Cefaleia, vermelhidão	Defeito epitelial, pupila não reagente	<i>F. fujikuroi</i> senso lato	Corticóide,AMB	AMB, MOX, VAN, AMI <b>3ºTX</b>
20	76/F Fortaleza	HAS, DM, meibomite prévia	3 dias	Dor	Conjuntiva hiperemiada, lesão flúor positiva	<i>C. parapsilosis</i>	MOX	MOX, DOX
21/ 4578-27	36/M Fortaleza	NI	30 dias	Dor	Conjuntiva hiperemiada, córnea com úlcera extensa, hipópio	<i>F. dimerum</i> senso lato	MOX, CTZ	MOX, CTZ, <b>TX</b>
22/ 4567-28	38/F Russas	NI	NI	Irritação	Conjuntiva hiperemiada, úlcera paracentral com bordas hifadas, lesões satélites, hipópio	<i>F. falciforme</i>	GAT, CTZ oral, lavagem CA AMB, NAT	CTZ, AMB, MOXI, corticoide <b>TX, Re-TX</b>
23/ 4287-18	28/M Fortaleza	NI	3 dias	Dor, BAV, fotofobia, lacrimajamento	Conjuntiva hiperemiada, lesão central	<i>F. fujikuroi</i> senso lato	GENTA, VAN	AMB
24	62/M Fortaleza	DM	3 dias	BAV	Conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada flúor positiva	<i>Curvularia</i> sp.	MOX	MOX, AMB
25	31/M Fortaleza	NI	3 dias	Dor, BAV	Conjuntiva hiperemiada, lesão flúor positiva, hipópio	<i>Aspergillus</i> sp.	MOX	MOX, AMB, CTZ
26	49/F Fortaleza	NI	NI	Dor, BAV, irritação	Conjuntiva hiperemiada, lesão flúor positiva	<i>Aspergillus</i> sp.	MOX	MOX, AMB
27/ 4581-33	44/M Fortaleza	Pós- cirúrgico de Re-TX córnea Tx córnea	NI	Dor, BAV	Conjuntiva hiperemiada, córnea opaca	<i>F. falciforme</i>	AMB	AMB
28	27/M Fortaleza	de contato, 2 tx de córnea prévio	NI	Olho seco	Córnea opacificada difusamente	<i>Fusarium</i> sp.	Lubrificante	CTZ, AMB, MOXI, corticoide
29	53/M Fortaleza	Trauma	7 dias	Dor, desconforto, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, injeção ciliar, córnea com opacidade paracentral flúor positiva	<i>Fusarium</i> sp.	MOX	AMB, GENTA, CTZ CIP, corticóide <b>TX, Re-TX</b>
30/ 4580-31	39/M Fortaleza	Trauma	3 dias	Dor, BAV vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, injeção ciliar, lesão flúor positiva	<i>F. keratoplasticum</i>	MOX, TOB	AMB, CIPRO, CTZ
31	55/M Fortaleza	NI	7 dias	Dor, secreção e ardor	Conjuntiva hiperemiada, córnea com lesão flúor positiva	<i>Fusarium</i> sp.	MOX, VAN, AMI, corticoide	AMB, MOX, FLU, CTZ, corticoide <b>TX, Re-TX</b>

32/ 4582-41	59/F Fortaleza	Enfisema Pulmonar e HAS	3 dias	Dor, fotofobia, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, córnea com úlcera flúor positiva	<i>F. keratoplasticum</i>	GEN, VAN	AMB <b>TX</b>
33/ 4569-42	51/M Pentecoste	Trauma	4 dias	Desconforto	Conjuntiva hiperemiada, córnea opaca com lesão infiltrada	<i>F. fujikuroi</i> senso lato	AMI, VAN	AMB, NAT
34	55/M Fortaleza	Trauma	NI	Dor e hiperemia	Hipópio, edema de córnea	<i>Fusarium</i> sp.	TOB, MOX, AMB, AMI, VAN	AMB, CTZ <b>TX</b>
35	44/M Maracanaú	TX de córnea prévio	NI	Dor	Conjuntiva hiperemiada, córnea com lesão extensa, hipópio	<i>Fusarium</i> sp.	AMB	AMB, NAT, FLU
36/ 4570-46	44/F Fortaleza	Cirurgia ocular prévia, asma	NI	BAV	Reação de câmara anterior	<i>F. solani</i> senso lato	AMB, corticoide	NI
37/ 4572-54	42/M Fortaleza	NI	7 dias	Dor, BAV, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, córnea com edema difuso, lesão central flúor positiva	<i>F. falciforme</i> .	MOX, VAN, AMI, AMB, TOB <b>TX</b>	MOX, AMB, corticoide <b>Re-TX</b>
38	28/F Fortaleza	NI	60 dias	Dor, inchaço	Edema palpebral, lesão paracentraol flúor positiva córnea opaca com lesões com melting	<i>Fusarium</i> sp.	CTZ, NAT, CEFT, AMOX, VANCO, corticóide	AMB
39/ 4573-55	30/F Fortaleza	Pós- cirúrgico de TX córnea	3 dias	Hiperemia, desconforto ocular	conjuntiva calma, caf, lesão flúor positiva	<i>F. fujikuroi</i> senso lato	MOX	AMB, MOX, FLU, CTZ, corticoide
40/ 4575-57	28/M Fortaleza	Trauma	20 dias	Dor, BAV, lacrimejamento	Conjuntiva hiperemiada, injeção ciliar, lesão flúor positiva paracentral	<i>F. dimerum</i> senso lato	AMB	AMB
41/ 4571-53	73/M Pereiro	NI	NI	Dor, BAV, hiperemia e secreção	Conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada, hipópio	<i>F. suttonianum</i>	MOX, AMB, CTZ	MOX, AMB, CTZ <b>TX</b>
42	52/M Aquiraz	NI	6 dias	Dor	Conjuntiva hiperemiada, córnea opaca com lesão infiltrada central e lesões satélites, hipópio	<i>Fusarium</i> sp.	TOB, MOX, AMB	TOB, MOX, AMB CIP, CTZ, GENTA <b>TX</b>
43/ 4574-56	48/F Fortaleza	Trauma, HAS, DM, Artrose	7 dias	Dor	Conjuntiva hiperemiada, lesão infiltrada,	<i>Fusarium</i> sp.	AMI, VAN, AMB, MOX	AMB, MOX, GENTA, VAN
44/ 4585-100	38/F Fortaleza	NI	5 dias	Dor, BAV, fotofobia	Conjuntiva hiperemiada, córnea com lesão flúor-positiva paracentral	<i>Fusarium</i> sp.	VAN, GEN, CTZ	AMB
45/ 4559-61	49/M Fortaleza	DM	3 dias	Dor, BAV	Conjuntiva hiperemiada difusa, córnea com lesão acometendo eixo visual, flúor-positiva, hipópio	<i>Fusarium</i> sp.	TOB, MOX	NI
46/ 4571-61	55/M Baturité	HAS	30 dias	Dor, secreção	Conjuntiva hiperemiada, córnea com lesão flúor-positiva	<i>Fusarium</i> sp.	TOB, MOX, AMB, VAN	AMB
47	35/M Aquiraz	Trauma com vegetal	60 dias	Dor, BAV, vermelhidão	Conjuntiva hiperemiada, úlcera paracentral e central, infiltrado estromal	<i>Fusarium</i> sp.	MOXI, CTZ, NAT	MOXI, CTZ, NAT

48/ 4584-64	54/M Pentecoste	Exérese calásio	30 dias	Dor	Conjuntiva hiperemiada, córnea com úlcera extensa, hipópio	<i>F. falciforme</i>	CIP, CTZ, NAT	MOX, NAT, corticoide <b>TX</b>
49	53/M Mombaça	Trauma	20 dias	Dor, BAV	Conjuntiva hiperemiada, córnea opaca com lesões com melting	<i>Fusarium</i> sp.	MOX, AMB	AMB, CEFT, VAN
50	37/M Maracanaú	Trauma	30 dias	Dor	Conjuntiva hiperemiada, córnea com lesão central, infiltrada	<i>Fusarium</i> sp.	AMB, GEN, VAN	AMB

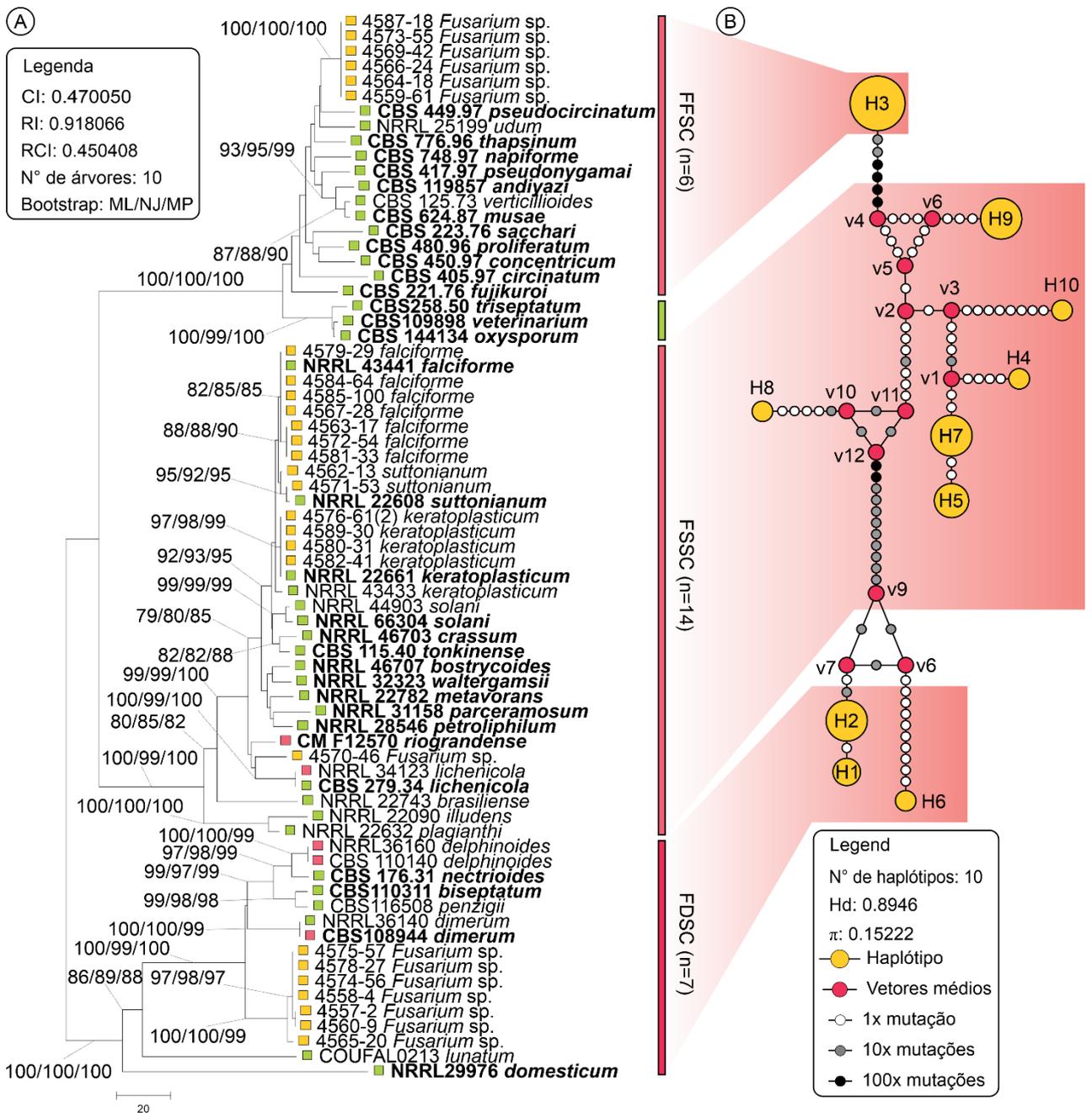
Legenda: **AMB** – Anfotericina B; **AMI** – Amicacina; **AMOX** – Amoxicilina; **BAV** – Baixa acuidade visual; **CA** – Câmera anterior; **CAF** – Câmera anterior formada; **CEFT** – Ceftazidima; **CIP** – Ciprofloxacino; **CTZ** – Cetoconazol; **DM** – Diabetes mellitus; **DOX** – Doxiciclina; **F** – Feminino; **FLU** – Fluconazol; **GAT** – Gatifloxacino; **GEN** – Gentamicina; **HAS** – Hipertensão arterial; **IC** – Infiltrado corneano; **M** – Masculino; **MOX** – Moxifloxacino; **NAT** – Natamicina; **NI** – Não informado; **ReTX** – Retransplante; **TOB** – Tobramicina; **TX** – Transplante; **VAN** – Vancomicina.

## 6.5 Identificação molecular e análise genotípica

Dentre os isolados testados 27 foram identificados molecularmente através da análise filogenética (figura 10A). Quatorze isolados foram identificados como membros do FSSC, sendo as espécies *F. falciforme* (n=7), *F. suttonianum* (n=2), *F. keratoplasticum* (n=5), seis do FFSC, e 7 do FDSC. Alguns espécimes formaram clados independentes não relacionados às cepas-tipo, e foram tratadas como: *Fusarium fujikuroi* sensu lato (n=6), *Fusarium solani* sensu lato e *Fusarium dimerum* sensu lato (n=7).

A rede de haplótipos construída demonstrou 10 haplótipos diferentes, sendo 6 em FSSC, 3 em FDSC e 1 em FFSC. Estes dados demonstram que *F. dimerum s.l.* foram representados por pelo menos duas espécies filogenéticas diferentes, uma contendo a maior parte dos isolados nos haplótipos H1 e H2, e H6 formado pelo isolado 20 (Figura 10B).

Figura 11 - Reconstrução filogenética e rede de haplótipos baseados nos genes *rpb2* e *tefla* dos *Fusarium* do estudo.



Os isolados foram sequenciados para as seqüências parciais dos genes *rpb2* e *tefla*. A) As seqüências obtidas foram alinhadas e concatenadas para reconstrução filogenética incluindo cepas-tipo de cada complexo de espécie identificado. Cepas-tipo estão em negrito, enquanto as amostras deste estudo estão acompanhadas de um retângulo amarelo. Espécies de interesse clínico com retângulo vermelho, e espécies de interesse ambiental ou fitopatogênicos estão marcadas com retângulos verdes. Os valores de *bootstrap* representam valores obtidos para os métodos máxima verossimilhança, *Neighbor-joining* e máxima parcimônia, respectivamente. B) a rede de haplótipo revelou 10 haplótipos diferentes, sendo H1, H2 e H6 em FDSC, H4, H5, H7, H8, H9, H10 em FSSC e H3 em FFSC.

Todos os isolados de FFSC se mostraram clonais formando um único haplótipo H3, enquanto em FSSC, *F. falciforme* foi representado por H7 e H5, *F. keratoplasticum* por H9, *F. suttonianum* por H4 e H10, e *F. solani s.l.* pelo haplótipo H8. A tabela 10 traz detalhes da composição amostral da rede de haplótipos.

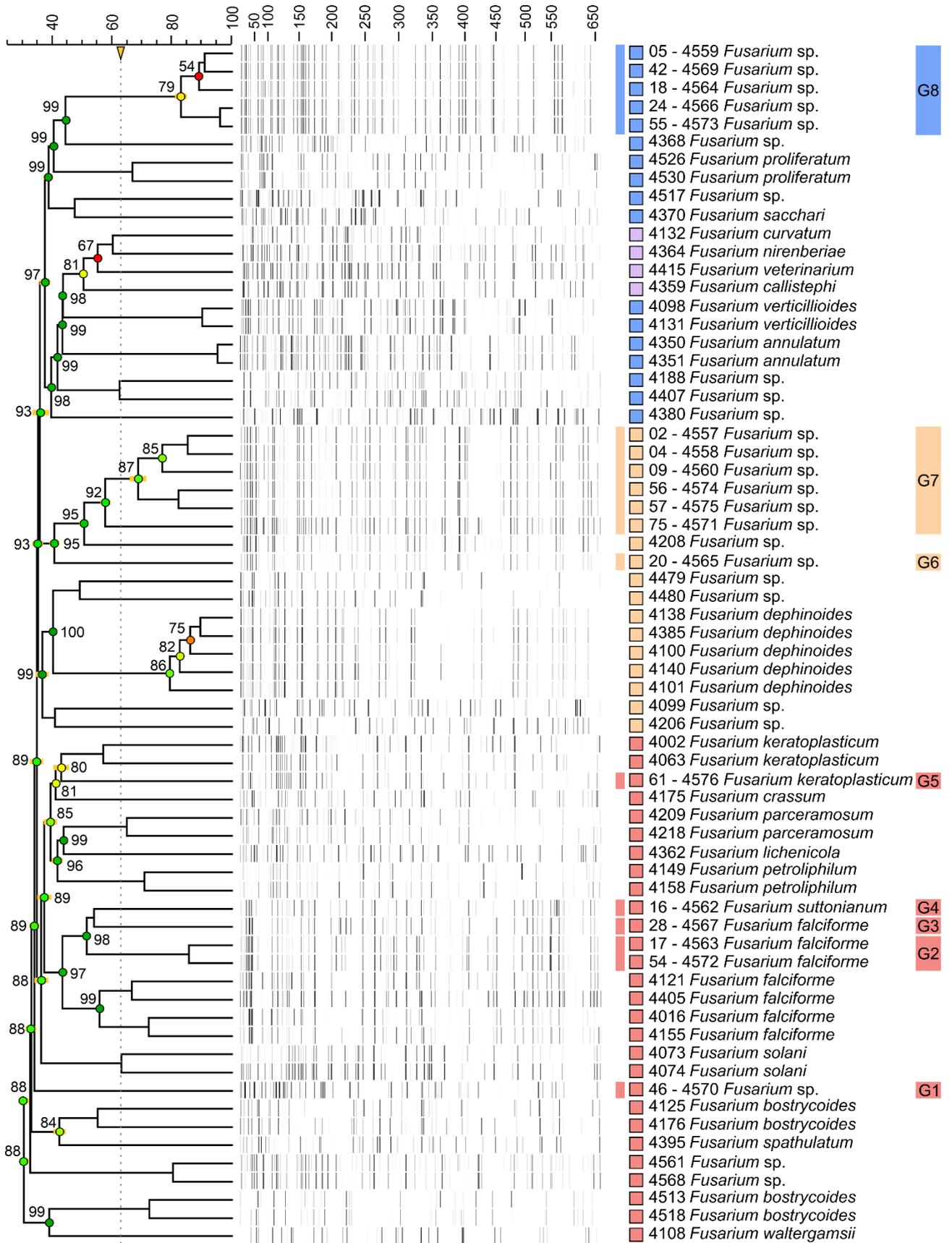
Tabela 9 – Composição amostral da rede de haplótipos gerada a partir da análise das sequências parciais concatenadas dos genes *rpb2* e *tef1a* dos isolados de *Fusarium*

Haplótipo	Complexo de espécie	Identificação molecular	Composição amostral	AFLP
H1	FDSC	<i>F. dimerum</i> senso lato	2, 9	G7
H2	FDSC	<i>F. dimerum</i> senso lato	57, 27, 56, 4	G7
H3	FFSC	<i>F. fujikuroi</i> senso lato	61, 18, 24, 42, 55, 18	G8
H4	FSSC	<i>F. suttonianum</i>	13	-
H5	FSSC	<i>F. falciforme</i>	17, 33, 54	G2
H6	FSSC	<i>F. dimerum</i> senso lato	20	G6
H7	FSSC	<i>F. falciforme</i>	28, 100, 64, 29	G3
H8	FSSC	<i>F. solani</i> senso lato	46	G1
H9	FSSC	<i>F. keratoplasticum</i>	61(2)*, 30, 31, 41	G5
H10	FSSC	<i>F. suttonianum</i>	53	-

Devido à identificação molecular e a rede de haplótipo ter sido gerada a partir de dois genes, como definido para identificação molecular de *Fusarium* (Leslie et al, 2003). Os complexos clonais foram testados pelo sistema de genotipagem baseado em AFLP, o qual é capaz de rastrear variações genéticas em termos genômicos (Figura 11).

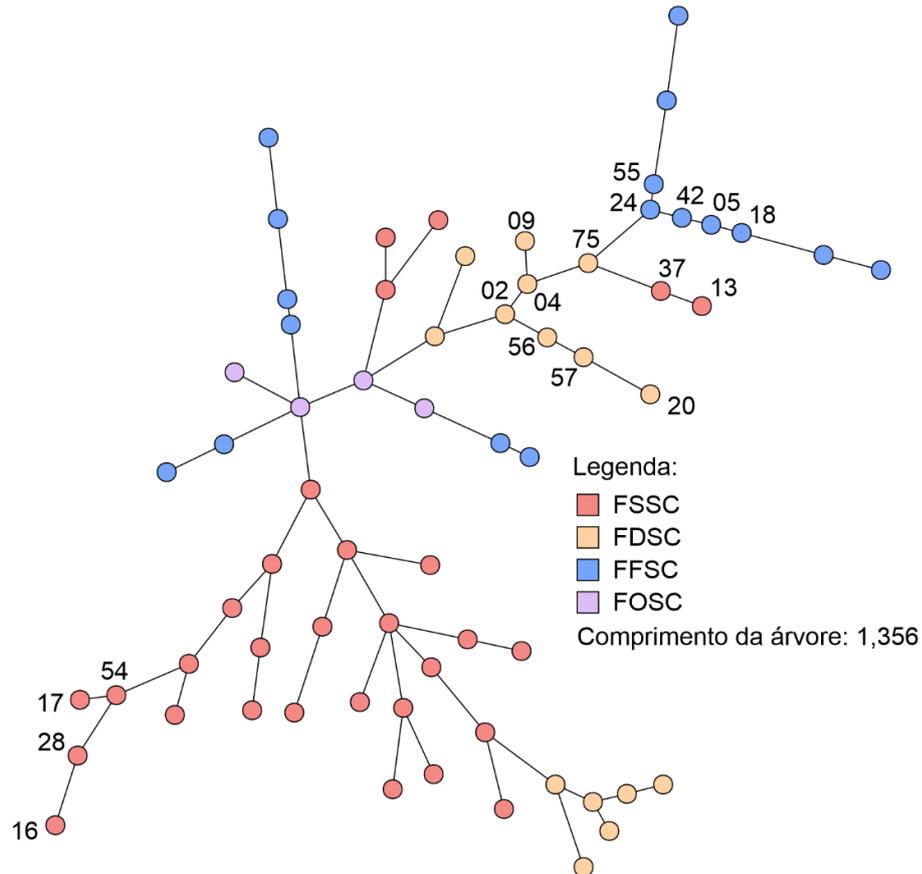
A análise por AFLP corroborou o perfil clonal de membros do FDSC e FFSC, assim como demonstrou os genótipos associados às espécies identificadas em FSSC. A rede de extensão mínima reconstitui uma rede com comprimento de 1.356, mantendo homogeneidade dos grupos clonais em FDSC e FFSC, bem como de FSSC (Figura 12).

Figura 12 - Clusterização baseado em AFLP dos isolados de *Fusarium*.



Dendrograma construído através do método UPGMA demonstrou alto valor cofenético (>54-100 – círculos). Seta amarela demonstra o cutoff para definição de genótipos. G1-G8 (barra da direita) define os genótipos de 1 a 8 identificados. Retângulo vermelho, FSSC. Retângulo laranja, FDSC. Retângulo azul, FFSC. Retângulo rosa, FOSC.

Figura 13 – Rede de extensão mínima baseado em AFLP dos isolados de *Fusarium*.



Estes resultados corroboram a hipótese da circulação de cepas clonais de *Fusarium* dos complexos de espécies *fujikuroi* e *dimerum*, enquanto que revela um perfil semelhante ao relatado por outros estudos para o complexo de espécies *F. solani*, com ampla variação de espécies.

## 6.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Neste estudo, um total de 28 isolados de *Fusarium* spp. foram selecionados para determinar a Concentração Inibitória Mínima de drogas antifúngicas utilizadas na prática clínica em casos de ceratite fúngica. Dentre estes, 12 cepas de *Fusarium* sp, 10 isolados

pertencentes do FSSC, 3 isolados do FFSC e 3 isolados do FDSC foram testados. Os valores de MICs são mostrados na Tabela 10.

Tabela 100 - Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) dos antifúngicos testados frente a isolados clínicos de *Fusarium* e Complexos de Espécies (n=28).

		MIC de 12 <i>Fusarium</i> sp.														
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Anfotericina B <sup>1</sup>					1	5	3	2			1					
Natamicina <sup>1</sup>							1	2		2	1	4	1			1
Voriconazol <sup>2</sup>					5	2	2	3								
		MIC de 10 isolados FSSC														
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Anfotericina B <sup>1</sup>				3	2	2	1	2								
Natamicina <sup>1</sup>									1	6		3				
Voriconazol <sup>2</sup>				1	3	4			2							
		MIC de 3 isolados FFSC														
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Anfotericina B <sup>1</sup>								3								
Natamicina <sup>1</sup>										2		1				
Voriconazol <sup>2</sup>					1	1			1							
		MIC de 3 isolados FDSC														
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
Anfotericina B <sup>1</sup>						3										
Natamicina <sup>1</sup>								2	1							
Voriconazol <sup>2</sup>						3										

<sup>1</sup> menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico completamente. <sup>2</sup> menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico em 50%, quando comparado com controle livre de droga.

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos realizados com os isolados de *Fusarium* spp. (n=12) mostrou valores baixos de MIC para AMB e VRZ. No entanto, NAT apresentou MICs mais elevados frente às cepas testadas, com a maioria dos isolados com MIC de 16  $\mu\text{g/ml}$ , além de uma cepa que apresentou MIC >128  $\mu\text{g/ml}$ . Para os isolados identificados como pertencentes do complexo de espécies *F. solani* (FSSC), também foi observado MIC mais baixo para anfotericina B e voriconazol. Dentre as 10 cepas de FSSC testadas o MIC de NAT foi de

16 µg/ml a 2 µg/ml. Todas as 3 cepas do do complexo de espécies *F. fujikuroi* (FFSC) apresentaram MIC de 1 µg/ml para AMB. Para NAT, duas cepas apresentaram MIC de 4 µg/ml e uma de 16 0µg/ml. Já para VRZ, os valores variaram de 0,125 µg/ml a 2 µg/ml. As 3 cepas do complexo de espécies *F. dimerum* (FDSC) mostraram os mesmos valores de MIC para AMB e VRZ de 0,25 µg/ml e para NAT os valores de 1 µg/ml e 2 µg/ml.

## 7. DISCUSSÃO

As publicações sobre ceratite fúngica descritas no Brasil, apresentam diferenças metodológicas e grande variação em relação a quantidade de amostras. Verificamos ainda que no Brasil, devido às suas dimensões continentais, torna-se importante a análise da frequência da CF influenciada por variações climáticas, geográficas e de população. O consenso geral é que FK é mais frequente em países em desenvolvimento de clima tropical e subtropical em comparação com países desenvolvidos com clima frio ou temperado (KREDICS et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2018). Existem grandes evidências de que a prevalência de CF é altamente favorecida em áreas com clima quente e úmido e em locais onde a economia agrícola é de destaque (BROWN et al., 2020). Desta forma, relatamos o primeiro estudo avaliando a etiologia, a incidência bem como o teste de sensibilidade e a genotipagem de CF numa região tropical semiárida localizada no Nordeste do Brasil.

Conseguimos obter uma amostragem de 222 raspados de córnea e 4 botões corneanos. Destes, 64 amostras apresentaram crescimento fúngico (28,32%), porém 50 pacientes se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo. Uma taxa relativamente alta quando comparada com um estudo retrospectivo realizado por Carrielo e colaboradores (2011) durante o período de 1975 a 2007 no Sudeste do Brasil, o qual de 3.309 culturas positivas, 364 (5.3%) apresentaram crescimento fúngico. Apesar disso, alguns fatores ainda podem ter influenciado nos resultados do método de cultura para fungos, como o tratamento empírico com antibióticos tópicos, uso de anestésicos tópicos com potenciais efeitos antimicrobianos, pouca quantidade de espécimes disponíveis para cultura e natureza refratária dos fungos (FONG et al., 2004; KREDICS et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2018; AHMADIKIA et al., 2021). Além disso, todas as amostras do estudo foram colhidas após algum tratamento, de forma que é de fator importante a colheita do espécime clínico antes de qualquer abordagem medicamentosa.

No que diz respeito aos dados demográficos dos casos, a maior incidência de CF ocorreu em pacientes do sexo masculino (74,0%). Este achado corrobora com estudos epidemiológicos realizados no sudeste brasileiro (IBRAHIM et al., 2011; GENARO et al., 2011; NUKKER et al., 2012) além de entrar em concordância com o cenário epidemiológico global de CF (HOFFMAN et al., 2021). González et al. (1996) e Srinivasan et al. (1997) relataram a proporção de homens para mulheres com úlcera de córnea como 1,6 para 1. Isto é provavelmente devido ao fato de homens, especialmente em idade ativa, estarem mais envolvidos em atividades ao ar livre, com uma maior exposição a corpos estranhos e traumas. Em nosso estudo a idade média dos pacientes é de 44,7 anos.

Em relação às comorbidades relatadas como fatores de risco em pacientes com CF, hipertensão (12,0%) e diabetes (10,0%) foram significativamente associados a ocorrência da doença da mesma forma que um estudo recentemente realizado na Índia (TAWDE et al., 2022) teve um resultado semelhante com diabetes (13,6%) e hipertensão (8,6%) de 337 casos diagnosticados. Além disso, o valor obtido pode não ser real, devido ao elevado número de pacientes que não revelaram nenhuma informação (36,0%). Bharathi et al. (2007) mostraram que o diabetes é a principal doença sistêmica doença associada a infecções fúngicas. Em um estudo de Dan et al.(2018), descobriu-se que o diabetes aumenta a gravidade da ceratite, retardando reepitelização da córnea. A debilitada resposta imune juntamente com o fácil estabelecimento de patógenos e retardo a cicatrização epitelial pode contribuir para a eliminação ineficaz de fungos patogênicos que causam FK em pacientes com diabetes (TAWDE et al., 2022).

Em 2005/2006 houve um interesse renovado e um foco em pesquisas sobre epidemiologia, diagnóstico, classificação e tratamento de ceratites fúngicas devido a um surto global de ceratites por *Fusarium* spp. associadas ao uso de lentes de contato e soluções de limpeza para lentes de contato (BULLOCK, 2016). Diferentemente de outros estudos realizados fora do Brasil, (GOWER et al., 2010, KEAY et al., 2011; ONG et al., 2016; HOFFMAN et al., 2021) observamos uma baixa incidência de uso de lentes de contato (2,0%). Apenas um paciente relatou o uso de lentes de contato como fator de risco, o que condiz com o baixa incidência de uso de lentes de contato dentro do cenário brasileiro (PASSOS et al., 2010; FURLANETTO et al., 2010; S IBRAHIM et al., 2011; OECHSLER et al., 2013). Tal fato pode ser explicado pelo baixo nível socioeconômico dos pacientes atendidos nestes dois hospitais além de ser mais observado em pacientes de regiões temperadas e industrializadas (HOFFMAN et al., 2021).

A literatura evidencia o trauma ocular corneano como o principal fator predisponente para CF, com incidência de colonização por fungos filamentosos, em decorrência da sua ampla distribuição. (TANURE et al., 2000; SALERA et al., 2002; HOFLING-LIMA et al., 2005; IBRAHIM et al., 2008). No estudo atual, 36,0% dos pacientes tinham história de trauma ocular. A maioria dos pacientes relatou um início insidioso de sintomas sem recordar uma história de trauma. Essa proporção relativamente baixa de pacientes com uma história definida de trauma contrasta com o quadro epidemiológico mundial analisado por Ahmadikia et al. (2021) em uma meta-análise sobre distribuição, prevalência e agentes causadores de ceratite fúngica. Isso pode ser explicado pela maioria da população do estudo residir em região urbana localizada na capital do Estado do Ceará (60,0%).

As cirurgias oculares são consideradas fatores predisponentes ao desenvolvimento da CF, ocasionando perda da integridade da superfície ocular, predispondo a infecção nesta região (VIEIRA, 1997; HOFLING-LIMA et al., 2005), figurando na casuística um índice de 12,0% no processo infeccioso pós-cirúrgico dos pacientes.

Foram observados procedimentos de intervenção mais drásticos como ceratoplastia e evisceração do olho. Essas medidas foram adotadas devido à gravidade do quadro infeccioso e comprometimento das estruturas oculares. Quase metade dos pacientes do estudo (48,0%) realizaram o procedimento de ceratoplastia. Um paciente precisou realizar a evisceração após a realização de dois transplantes de córnea ao longo de 4 meses, a partir do início dos sintomas. Além disso, a taxa de CF em pacientes pós-ceratoplastia foi de 5,0%, o que corrobora com a literatura, que afirma que após cirurgia de transplante de córnea, a presença de grandes infiltrados pode evoluir para quadros mais graves como endoftalmite, necessidade de novo transplante de córnea e evisceração do olho (JOIN; MUTHY; MOTUKUPALLY, 2017)

No presente estudo, o principal gênero fúngico identificado foi *Fusarium* sp. (84%) o que corrobora com a literatura que afirma este fungo como o principal agente etiológico da ceratite fúngica na maior parte dos estudos a nível mundial, especialmente nas regiões tropicais (MANIKANDAN et al., 2019; HOFFMAN et al., 2021). Em estudos realizados em outras regiões do Brasil, também há o predomínio de *Fusarium* sp. nos casos de CF (PASSOS et al., 2010; FURLANETTO et al., 2010; S IBRAHIM et al., 2011; OECHSLER et al., 2013). *Aspergillus* spp. é o segundo organismo causador mais frequentemente relatados de ceratite fúngica globalmente (AL-HATMI et al., 2019); também foi o segundo gênero mais isolado (8%) dentre as culturas fúngicas positivas de nosso estudo.

Dos 42 isolados de *Fusarium* sp., 32 cepas foram selecionadas para a realização de identificação molecular no Laboratório de Patógenos Emergentes, na UNIFESP. Foi realizada uma seleção baseada na textura, relevo, produção de pigmento, formação de esporodóquio das colônias para o envio dos isolados fúngicos. Devido a alguns fatores como eventuais contaminações das culturas, pouco crescimento fúngico ou presença de colônia mista nas sementeiras, um total de 27 cepas foram sequenciadas para as sequências parciais dos genes *rpb2* e *tef1a*.

As sequências *tef1-α* e *rpb2* sozinhas não foram suficientes para identificar a nível de espécie 14 dos 27 isolados de *Fusarium*. Atualmente, o esquema de identificação recomendado é baseado no sequenciamento de 3 genes: *ef1α* (fator de alongamento de tradução 1 alfa), *rpb1* (maior subunidade de polimerase de RNA) e *rpb2* (segunda maior subunidade de RNA polimerase) que identificam no nível de espécie ou próximo a ele em todas as espécies de

*Fusarium* (O' DONNEL et al., 2022). Porém, na prática laboratorial diária, este esquema pode ser trabalhoso além de oneroso (O' DONNEL et al., 2010).

No presente estudo, o principal complexo de espécie identificado genotipicamente foi o FSSC, em 51,85% dos pacientes. Em um estudo realizado com 41 isolados fúngicos no sudeste do país, (OECHSLER et al.,2013) também houve predominância deste complexo de espécies. Neste mesmo estudo apenas um isolado foi identificado como espécie do FDSC, em contrapartida, em nosso trabalho, nos chamou atenção o expressivo número de cepas identificadas dentro do complexo de espécies *Fusarium dimerum*.

*Fusarium dimerum* é considerado um fungo do solo, porém, também foi encontrado em uma variedade de substratos de plantas em decomposição. Foi originalmente isolado na Itália a partir da casca de limão (VISMER, et al., 2016), e existem alguns relatos na literatura na Europa, Ásia, Austrália, Central e América do Sul (GUGNANI et al., 1978; DOMSCH et al., OECHSLER et al.,2013; VISMER, et al., 2016). É, portanto, de interesse clínico e epidemiológico que este fungo foi identificado em 7 amostras de 27 analisadas aleatoriamente, evidenciando sua tendência a ter ampla incidência no Estado do Ceará.

Os testes de sensibilidade antifúngica têm um valor muito significativo em termos de uma gestão bem-sucedida em pacientes com ceratite fúngica. No entanto, a disponibilidade limitada de agentes antifúngicos, especialmente sob a forma de gotas para os olhos, torna a terapia mais complicada (BHARATHI et al., 2002; MANIKANDAN et al., 2019). Além do mais, no Ceará o voriconazol não é utilizado ativamente na prática clínica e a Natamicina muitas vezes é solicitada de outros estados, principalmente da região Sudeste do país.

Dadas as variações nos padrões de suscetibilidade aos antifúngicos de diferentes gêneros fúngicos e até mesmo diferentes espécies pertencentes ao mesmo gênero, identificação definitiva da etiologia para a nível de espécie é recomendado (KREDICS et al., 2015; GARG et al., 2016; BOURCIER et al., 2017; MAHMOUDI et al., 2018).

As sensibilidades antifúngicas dos isolados foram analisadas e os resultados foram comparados aos relatados na literatura atual. No presente estudo, todos os isolados de FSSC foram inibidos por CIM  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  de AMB e VRZ. NAT apresentou MIC mais elevado para todos os grupos de *Fusarium* estudado. Porém, Xie et al. (2008) afirmaram que 94,2% e 91,3% dos membros do FSSC eram suscetíveis a NAT. Lalitha et al. (2007) também relataram boa atividade de NAT contra *Fusarium*. No entanto, no presente estudo, 71,43% de todos os isolados testados foram suscetíveis à concentração de NAT entre as concentrações 4  $\mu\text{g/ml}$  e 16  $\mu\text{g/ml}$ . A discrepância entre as altas MICs *in vitro* e o sucesso clínico pode ser explicada

pela penetração efetiva do antifúngico na córnea e a resultante maior concentração local em comparação com muitas outras drogas (HASSAN et al., 2016).

Devido ao pequeno tamanho da amostra e alta variabilidade de dados do MIC não foi possível fazer uma declaração global sobre o perfil de suscetibilidade das três espécies de FDSC. No entanto, AMB e VRZ apresentou MIC de 0,25 µg/ml, enquanto que NAT possuiu os maiores valores. Da mesma forma os FFSC, das três espécies analisadas, houve variabilidade nos MIC's para NAT e VRZ, enquanto que para AMB, todas as cepas obtiveram o CIM de 1 µg/ml.

Em nosso estudo, 9 dos 28 isolados tiveram o crescimento inibido em 0,25 µg/ml para AMB; 10 apresentaram MIC 4 µg/ml e 0,25 para NAT e VRZ, respectivamente. No entanto, a aplicação de drogas e sua penetração na área afetada devem ser levadas em consideração.

Estudos anteriores demonstraram que os MICs mais baixos estão correlacionados com melhores resultados à medida que a reepitelização ocorre mais rápida para esses casos (O'DONNELL et al., 2007; OECHSLER et al., 2009). De acordo com Oechsler et al. (2013), isolados que apresentam MIC's elevados são mais difíceis de tratar e demoram mais tempo a responder à terapia. A baixa penetração dos agentes antifúngicos no estroma da córnea é também um fator limitante para a debelar mais rapidamente a infecção. (OECHSLER et al., 2013)

Nosso estudo teve algumas limitações. Devido ao curto prazo de tempo, o teste de sensibilidade foi realizado ao mesmo tempo que a identificação molecular, não nos permitindo selecionar os isolados em maior quantidade e melhor distribuição dentro dos complexos de espécies. Além disso, foi necessário a repetição de alguns experimentos devido a elevada contaminação nas culturas de *Fusarium*. Outro ponto foi o custo elevado da aplicação da análise molecular, um fator que limitou a quantidade de isolados que tiveram genotipagem realizada.

## 8. CONCLUSÃO

-Os fatores associados à ocorrência de ceratite fúngica foram: pacientes do sexo masculino e pacientes que sofreram algum trauma ocular.

-As principais queixas relatadas pelos pacientes com ceratite foram dor e baixa acuidade visual, o que resultou em utilização de medicamentos antes da coleta de exames microbiológicos, devido à sintomatologia severa.

- Quase metade dos pacientes diagnosticado com ceratite fúngica realizou transplante de córnea, muitos deles chegou a realizar o procedimento mais de uma vez.

-Ocorreu o predomínio de isolamento de fungos filamentosos, com destaque para *Fusarium*, principalmente o complexo de espécies *F.solani*.

- As sequências *tef1-a* e *rpb2* sozinhas não foram suficientes para identificar a nível de espécie todas as cepas de *Fusarium*.

-Foi demonstrado diferenças importantes nos perfis de susceptibilidade antifúngica e sugere diferenças interespecies nos mecanismos de virulência ainda a serem explorados.

## REFERÊNCIAS

AGI, J. et al. Three Decades of Contact Lens-associated Microbial Keratitis in a Referral Hospital in São Paulo, Brazil. **Arq Bras Oftalmol**, v. 84, n. 5, p. 474-480, 2021.

AHEARN, D. G. et al. *Fusarium* keratitis and contact lens wear: facts and speculations. **Medical Mycology**, v. 46, n. 5, p. 397-410, 2008.

AHMADIKIA, K. et al. Distribution, Prevalence, and Causative Agents of Fungal Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (1990 to 2020). **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 26, n. 11, p. 698780, 2021.

ALASTRUEY-IZQUIERDO A. et al. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. **J Antimicrob Chemother.** v.61, n.4, p. 805-809, 2008.

AL-HATMI, A. M. S.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. S. *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005464, 2016.

AL-HATMI, et al. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015. **Emerg Microbes Infect.**, v. 5, n. 12, p. e124, 2016.

ALFONSO, E. C. et al. Insurgence of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear. **Arch Ophthalmol**, v. 124, n. 7, p. 941-947, 2006.

ANSARI, Z.; MILLER, D.; GALOR, A. Current Thoughts in Fungal Keratitis: Diagnosis and Treatment. **Curr Fungal Infect Rep.**, v. 7, n. 3, p. 209-218, 2013.

AUSTIN, A.; LIETMAN, T.; ROSE-NUSSBAUMER, J. Update on the Management of Infectious Keratitis. **Ophthalmology**, v. 124, n. 11, p. 1678-1689, 2017.

BHARATHI, M. J. et al. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. **Indian J Ophthalmol**, v. 51, n. 4, p. 315-321, 2003.

BORAL, H. et al. Mycotic Keratitis Caused by *Fusarium solani* sensu stricto (FSSC5): A Case Series. **Mycopathologia**, v. 183, n. 5, p. 835-840, 2018.

BOONPASART, S. et al. Infectious keratitis at King Chulalongkorn Memorial Hospital: a 12-year retrospective study of 391 cases. **J Med Assoc Thai.**, v. 85, n. 1, p. s217-s230, 2002.

BOOTH, C. The Genus *Fusarium*. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, Surrey, 237, 1971.

BOURCIER, T. et al. Fungal keratitis. **J Fr Ophtalmol.**, v. 40, n. 9, p. e307-e313, 2017.

BROWN, L. et al. The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. **Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 49-57, 2021.

BUCHTA, V. et al. Outbreak of fungal endophthalmitis due to *Fusarium oxysporum* following cataract surgery. **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2, p. 115-121, 2014.

BULLOCK, J. D. et al. Microbiological Investigations of ReNu Plastic Bottles and the 2004 to 2006 ReNu With MoistureLoc-Related Worldwide *Fusarium* Keratitis Event. **Eye Contact Lens**, v. 42, n. 3, p. 147-152, 2016.

BURTON, M. J. et al. Microbial keratitis in East Africa: why are the outcomes so poor? **Ophthalmic Epidemiol.**, v. 18, n. 4, p. 158-163, 2011.

CARVALHO J. A. et al. Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic sporothrix species. **PLoS Negl Trop Dis**. v.14, n.7, p.1-26, 2020.

CARVALHO, M. G. P. et al. Ceratite fúngica no estado do Paraná - Brasil: aspectos epidemiológicos, etiológicos e diagnósticos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 1, n. 18, p. 76-78. 2001.

CHEIKHROUHOU F, et al. A. Epidemiological profile of fungal keratitis in Sfax (Tunisia). **J Mycol Med.**, v. 24, p. 308-312, 2014.

DALLÉ DA ROSA P. et al. In vitro susceptibility and multilocus sequence typing of *Fusarium* isolates causing keratitis. **J Mycol Med**, v. 28, n.3. p. 482-485, 2018.

DE HOOG, G. S. de; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J.. **Atlas of Clinical Fungi**, 3rd ed. Baarn/Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands. 1.600 p., 2011.

DE HOOG, G. S. de; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2. ed. Baarn/Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2.108 p., 2000.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol Plant Pathol.**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DEORUKHKAR, S.; KATIYAR, R.; SAINI, S. Epidemiological features and laboratory results of bacterial and fungal keratitis: a five-year study at a rural tertiary-care hospital in western Maharashtra, India. **Singapore Med J.**, v. 53, n. 4, p. 264-267, 2012.

DIEPENINGEN, A. D. et al. Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. **Curr Fungal Infect Rep.**, v. 9, n. 3, p. 135-143, 2015.

DROGARI-APIRANTHITOU, M. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of filamentous fungi causing rare infections: synergy testing of amphotericin B, posaconazole and anidulafungin in pairs. **J. Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 8, p. 1937-1940, 2012.

DRUMMOND, J. A.; FRANCO, J. L. A.; OLIVEIRA, D. Uma análise sobre a história e a situação das unidades de conservação no Brasil. **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas**. Brasília, DF: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, p. 341-385, 2010.

FERRER, C.; ALIÓ, J. L. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. **J Ophthalmic Inflamm Infect.**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2011.

FURLANETTO R. L. et al. Epidemiology and etiologic diagnosis of infectious keratitis in Uberlandia, Brazil. **Eur J Ophthalmol.**, v. 20, n. 3, p. 498-503, 2010.

X'x'

GALARRETA, D. J. et al. Fungal keratitis in London: microbiological and clinical evaluation. **Cornea**, v. 26, n. 9, p. 1082-1086, 2007.

GHOSH, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction-based ribosomal DNA sequencing technique for the diagnosis of mycotic keratitis. **Am J Ophthalmol**, v. 144, n. 3, p. 396-403, 2007.

GOPINATHAN, U. et al. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care center in South India. **Cornea**, v. 21, n. 6, p. 555-559, 2002.

GOLDSCHMIED, R. A.; FRIEDMAN, J.; BLOCK, C. S. *Fusarium* spp. isolated from non-ocular sites: A 10 year experience at an Israeli general hospital. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 3, n. 1, p. 99-102, 1993.

GOWER, E. W. et al. Trends in fungal keratitis in the United States, 2001 to 2007. **Ophthalmology**, v. 117, n. 12, p. 2263-2267, 2010.

GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 4, p. 470-481, 2013.

Hau S. C. et al. Diagnostic accuracy of microbial keratitis with in vivo scanning laser confocal microscopy. **Br J Ophthalmol.**, v.94, p. 982-987, 2010.

HERKERT P. F. et al. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility of Clinical *Fusarium* Species From Brazil. **Front Microbiol.** v.10, n.10, p. 737, 2019.

HOFLING-LIMA, A. L. et al. Laboratory study of the mycotic infectious eye diseases and factors associated with keratitis. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 68, n. 1, p. 21-27, 2005.

HOMA, M. et al. *Fusarium* keratitis in South India: causative agents, their antifungal susceptibilities and a rapid identification method for the *Fusarium solani* species complex. **Mycoses**, v. 56, n. 5, p. 501-511, 2013.

IBRAHIM, M. M. et al. A New Method to Predict the Epidemiology of Fungal Keratitis by Monitoring the Sales Distribution of Antifungal Eye Drops in Brazil. **PLOS One**, v. 7, n. 3, e33775, 2012.

IBRAHIM, M. M. et al. Epidemiology and medical prediction of microbial keratitis in southeast Brazil. **Arq Bras Oftalmol.**, v.74, n. 1, p.12, 2011.

JACCARD P. The distribution of the flora in the alpine zone.1. **New Phytol.** v.11, n. 2, p. 37-50, 1912.

KANSKI, J. J.; BOWLING, B. Córnea. *In: Oftalmologia Clínica: Uma abordagem sistêmica*. 7. Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2012. Cap 6, p.167-238.

KAPLAN, H. J. Anatomy and function of the eye. **Chem Immunol Allergy.**, v. 92, p. 4-10, 2007.

KARTHIKEYAN, R. S. et al. Expression of innate and adaptive immune mediators in human corneal tissue infected with *Aspergillus* or *Fusarium*. **J Infect Dis.**, v. 204, n. 6, p. 942-950, 2011.

KAUR, I. P.; RANA, C.; SINGH, H. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. **J Ocul Pharmacol Ther.**, v. 24, n. 5, p. 481-493, 2008.

KARKHUR, S. et al. Posterior hypopyon in fungal endogenous endophthalmitis secondary to presumably contaminated dextrose infusion. **Am J Ophthalmol Case Rep.**, v. 1, n. 18, p. 100681, 2020.

KATOH K, TOH H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform.*; p.9, n. 4, p.286-298, 2008.

KEAY, L. J. et al. Clinical and microbiological characteristics of fungal keratitis in the United States, 2001-2007: a multicenter study. **Ophthalmology**, v. 118, n. 5, p. 920-926, 2011.

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.** v.16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol.** v.33, n.7, p. 1870-1874, 2016.

LABIRIS, G. et al. Bilateral *Fusarium oxysporum* keratitis after laser in situ keratomileusis. **J Cataract Refract Surg.**, v. 38, n. 11, p. 2040-2044, 2012.

LAURENCE, M. H. et al. Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. **Fungal Diversity**, 2015.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. **Blackwell Publishing**. Ames, Iowa, p. 388, 2006.

LECK, A.; BURTON, M. Distinguishing fungal and bacterial keratitis on clinical signs. **Community Eye Health.**, v. 28, n. 89, p. 6-7, 2015.

LINK, J. H. F. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio Ima. **Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin, Magazin**, v. 3, n. 1, p. 3-42, 1809.

LIU, H. et al. Microbial Keratitis in Taiwan: A 20-Year Update. **American Journal of Ophthalmology**, v. 205, n. 1, 74-81, 2019.

LIU N., ZHANG K., ZHAO H. Haplotype-association analysis. **Adv Genet.** v.60, n.14, p. 335-405, 2008.

LORTHOLARY, O. et al. International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4446-4450, 2010.

MAHARANA, P. K. et al. Recent advances in diagnosis and management of Mycotic Keratitis. **Indian J Ophthalmol**, v. 64, n. 5, p. 346-357, 2016.

MAHMOUDI S, et al. Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects. **Mycoses**, v. 61; p. 916-930, 2018.

MANIKANDAN P, et al. Fungal Keratitis: Epidemiology, Rapid Detection, and Antifungal Susceptibilities of *Fusarium* and *Aspergillus* Isolates from Corneal Scrapings. **Biomed Res Int.**, v. 20, 2019.

MARINACH-PATRICE C. et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. **Clin Microbiol Infect.** v.15, n. 7, p. 634-6342, 2009.

MARTINO, P. et al. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **J Infect.**, v. 1, n. 1, p. 7-15, 1994.

MIGHELI, Q. et al. Molecular Phylogenetic Diversity of Dermatologic and Other Human Pathogenic Fusarial Isolates from Hospitals in Northern and Central Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1076-1084, 2010.

MONTEIRO, R. et al., In silico and in vitro validation of new amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting for genetic studies of clinical *Fusarium* species. **31º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 0905-1, Anais, 2021.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clin Microbiol Rev.**, v. 7, n. 4, p. 479-504, 1994.

NGO, J.; KHOO, P.; WATSON, S. L. Improving the Efficiency and the Technique of the Corneal Scrape Procedure via an Evidence Based Instructional Video at a Quaternary Referral Eye Hospital. **Curr Eye Res.**, v. 45, n. 5, p. 529-534, 2020.

NIU, L. et al. Fungal keratitis: Pathogenesis, diagnosis and prevention. **Microb Pathog.**, v. 138, 103802, 2019.

O'DONNELL K, SARVER BAJ, BRANDT M, et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. **J Clin Microbiol.** v.45, n7, p. 2235-2248, 2007.

O'DONNELL K, KISTLER HC, CIGELNIK E, PLOETZ RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proc Natl Acad Sci.** v.95, n.5, p.2044-2049, 1998.

O' DONNEL, K. et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **J Clin Microbiol.**, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.

O'Donnell K, et al. DNA Sequence-Based Identification of *Fusarium*: A Work in Progress. **Plant Dis.** v. 6, n. 10, p. 1597-1609, 2022.

OECHSLER R. A., et al. *Fusarium* keratitis: genotyping, in vitro susceptibility and clinical outcomes. **Cornea.** v. 32, n. 5, p. 667-73, 2013.

ONG, H. S. et al. Altered Patterns of Fungal Keratitis at a London Ophthalmic Referral Hospital: An Eight-Year Retrospective Observational Study. **Am J Ophthalmol**, v. 168, n. 1, p. 227-236, 2016.

ORTEGA-ROSALES, A. et al. A case of fungal keratitis due to *Fusarium solani* after an indigenous healing practice. **IDCases**, v. 5, n. 18, p. 00618, 2019.

OU, J. I.; ACHARYA, N. R. Epidemiology and treatment of fungal corneal ulcers. **Int Ophthalmol Clin.**, v. 47, n. 3, p.7-16. 2007.

PASSOS R. M. et al. Microbial keratitis in the elderly: a 32-year review. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 73, n. 4, p. 315-319, 2010.

PEREIRA L. A. et al. Correlation between pathogenic species and clinical findings, disease severity, and visual outcome in patients with fungal keratitis. **Arq Bras Oftalmol.**, v.82, n.1, p. 2-5, 2018.

PORTELA, F. V. M. **Atividade antifúngica da prometazina sobre espécies do complexo *Fusarium solani* oriundas de infecções oculares.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2019.

POSADA D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Mol Biol Evol.** v.25, n.7, p. 1253-1256, 2008.

PRAJNA, N. V. et al. Effect of Oral Voriconazole on Fungal Keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II (MUTT II): A Randomized Clinical Trial. **JAMA Ophthalmol**, v. 134, n. 12, p. 1365-1372, 2016.

PRAJNA, N. V. et al. The mycotic ulcer treatment trial: a randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. **JAMA Ophthalmol**, v. 131, n. 4, p. 422-429, 2013.

QUIAO, G. L. et al. Candida Keratitis: Epidemiology, Management, and Clinical Outcomes. **Cornea**, v. 39, n. 7, p. 801-805, 2020.

RABODONIRINA, M. et al. *Fusarium* infections in immunocompromised patients: case reports and literature review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 13, n. 2, p. 152-161, 1994.

RAJ N. et al. Recent Perspectives in the Management of Fungal Keratitis. **J Fungi (Basel)**, v.7, n.11, 2021.

REBELL, G. *Fusarium* infections in human and veterinary medicine, p. 210-220, 1981. In NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy.* **Pennsylvania State University Press**, University Park, Pennsylvania.

ROCHA, M. Micoses em oftalmologia. **Arquivo Instituto Penido Burnier**, v.9, p.28-69, 1952.

ROZAS J, FERRER-MATA A, SANCHEZ-DELBARRIO JC, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Mol Biol Evol.** v. 34, n. 12, p.3299-3302, 2017.

RUFER, F.; SCHRODER, A.; ERB, C. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. **Cornea**, v. 24, n. 3, p. 259-261, 2005.

SABINO, Shirley Maria Lima. O holoceno tardio no Pantanal do Pandeiros: paleoecologia de uma área úmida em meio ao semiárido de Minas Gerais. **Revista Equador**, v. 9, n. 3, 2020.

SAENZ, V. et al. A One Health Perspective to Recognize *Fusarium* as Important in Clinical Practice. **J Fungi (Basel)**, v. 20, n. 6, n. 4, p. 235, 2020.

SAHAY, P. et al. Pharmacologic therapy of mycotic keratitis. **Surv Ophthalmol**, v. 64, n. 3, p. 380-400, 2019.

SALAH, H. et al. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. **J Infect.**, v. 71, n. 6, p. 658-666, 2015.

SHARMA, N. et al. Comparative evaluation of topical versus intrastromal voriconazole as an adjunct to natamycin in recalcitrant fungal keratitis. **Ophthalmology**, v. 120, n. 4, p. 677-681, 2013.

SHARMA, N. et al. Fungal keratitis: A review of clinical presentations, treatment strategies and outcomes. **Ocul Surf.**, v. 24, n. 1, p. 22-30, 2022.

SHEU, S. J. Endophthalmitis. **Korean J Ophthalmol.**, v. 31, n. 4, p. 283-289, 2017.

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

SIMON, L. et al. First endogenous fungal endophthalmitis due to *Fusarium dimerum*: A severe eye infection contracted during induction chemotherapy for acute leucemia. **J Mycol Med.**, v. 28, n. 2, p. 403-406, 2018.

SOMMER, A. Epidemiology and Statistics for the Ophthalmologist. New York: **Oxford University Press**, 1980.

SRINIVASAN, M. et al. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, south India. **Br J Ophthalmol**, v. 81, n. 11, p. 965-971, 1997.

THOMAS, P. A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. **Clin Microbiol Rev.**, v. 16, n. 4, p. 730-797, 2003.

THOMAS, P. A.; LECK, A. K.; MYATT, M. Characteristic clinical features as an aid to the diagnosis of suppurative keratitis caused by filamentous fungi. **Br J Ophthalmol.**, v. 89, n. 12, 1554-1558, 2005.

THOMAS, P. A.; KALIAMURTHY, J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. **Clin Microbiol Infect.**, v. 19, n. 3, p. 210-220, 2013.

THOMSON, R. B. et al. Contamination of cultures processed with the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. *J Clin Microbiol.*, v. 19, n. 2, p. 97-99, 1984.

TING, D. S. J. et al. Diagnostic armamentarium of infectious keratitis: A comprehensive review. **Ocul Surf.**, v. 23, n. 1, p. 27-39, 2022.

TORTORANO, A. M. et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. **Clin Microbiol Infect.**, v. 3, n. 1, p. 27-46, 2014.

UNG, L. et al. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. **Surv Ophthalmol**, v. 64, n. 3, p. 255-271, 2019.

VAN DER MEULEN, I. J. et al. Age-related risk factors, culture outcomes, and prognosis in patients admitted with infectious keratitis to two Dutch tertiary referral centers. **Cornea**, v. 27, n. 5, p. 539-544, 2008.

VISMER, H. F. et al. *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infections. **Med Mycol.**, v. 40, n. 4, p. 399-406, 2002.

WHITCHER, J. P.; SRINIVASAN, M.; UPADHYAY, M. P. Corneal blindness: a global perspective. **Bull World Health Organ**, v. 79, n. 3, p. 214-221, 2001.

WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 48 p., 2022.

WONG, T. W. et al. Risk factors and clinical outcomes between fungal and bacterial keratitis: a comparative study. **CLAO J.**, v. 23, n. 4, p. 275-281, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Concil for international Organization of Medical Sciences, International Nomenclature of Diseases, v.II, p.33, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Universal eye health: a global action plan 2014–2019, 2013.

## Anexo I

<b>QUESTIONÁRIO</b>	
<b>1. IDENTIFICAÇÃO</b>	
Ficha:	
Local:	
Data:	Prontuário:
Profissão:	Estado Civil:
Sexo:	Naturalidade:
<b>2. HISTÓRIA CLÍNICA</b>	
Início da doença: ( ) 5 dias ( ) 10 dias ( ) 15 dias ( ) ~1mê	
<b>3. TRATAMENTOS PRÉVIOS:</b>	
<b>Tópicos:</b>	( ) Antibióticos ( ) Antifúngico ( ) Corticoides ( ) Quais: _____
<b>Condições predisponentes:</b>	( ) Traumatismo ocular ( ) HIV ( ) Diabetes Mellitus ( ) Doença auto-imune ( ) Lentes de contato ( ) Hipertensão ( ) Ceratoplastia ( ) Triquíase ( ) Lagofalmo ( ) Outros: _____
<b>Dados clínicos:</b>	
( ) Olho Vermelho	( ) Dor nos olhos ( ) Episódio anterior de ceratite
( ) Sensação de corpo estranho	( ) Sensibilidade à luz (fotofobia) ( ) Necrose
(“sensação de areia nos olhos”)	( ) Olhos lacrimejantes ( ) Dor
( ) Outros: _____	( ) Deficiência de visão ( ) Hipópio
<b>4.FORMA CLÍNICA:</b>	
( ) Inflamação	( ) Úlcera
<b>5.EXAMES LABORATORIAIS</b>	
( ) Pesquisa de fungos _____	( ) Bacterioscopia _____
( ) Cultura para fungos _____	( ) Cultura para bactérias _____

## Anexo II

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS CERATITES POR FUNGOS NO ESTADO DO CEARÁ

**Pesquisador:** Edlány Pinho Romão Milanez

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 40737720.5.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.632.640

**Apresentação do Projeto:**

Projeto de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica que pretende identificar os patógenos fúngicos mais frequentemente isolados nos casos de úlceras de córnea no Estado do Ceará e quais as principais características clínico-epidemiológicas das úlceras de córnea por *Fusarium* no Estado do Ceará.

**Objetivo da Pesquisa:**

Geral: Caracterizar o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial de pacientes com ceratite fúngica no Estado do Ceará.

Específicos:

1. Determinar as frequências dos principais marcadores clínicos e epidemiológicos dos pacientes com ceratite fúngica no período estudado.
2. Isolar fungos de amostras clínicas obtidas de ceratites de pacientes atendidos em unidades hospitalares de oftalmologia em Fortaleza;
3. Analisar fenotipicamente, pela macro e micromorfologia, os isolados fúngicos;
4. Identificar os agentes por meio de análise proteômica;
5. Traçar o perfil de sensibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, natamicina,

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.632.640

posaconazol e voriconazol.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os possíveis riscos ou desconfortos no momento da coleta estão descritos no TCLE.

**Benefícios:** Os dados catalogados servirão como um estudo epidemiológico das ceratites fúngica no Estado do Ceará. Pacientes que estiverem portando ceratites terão o diagnóstico laboratorial.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Será realizado um estudo epidemiológico no período de outubro de 2019 a julho de 2022, com caráter observacional descritivo e experimental dos casos de úlcera de córnea. A pesquisa contemplará um eixo retrospectivo e outro prospectivo, que serão realizados nas seguintes unidades hospitalares e laboratorial: Laboratório Emilio Ribas Medicina Diagnóstica (ERMD, no Hospital Oftalmoclínica 13 de Maio e no Hospital de Olhos Leiria de Andrade. As amostras coletadas durante o estudo prospectivo nas unidades hospitalares serão encaminhadas ao Setor de Micologia do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), para análise laboratorial.

A População de estudo será constituída por pacientes que apresentarem lesões suspeitas de ceratite com diagnóstico prévio. Serão analisadas, através de um questionário, as variáveis de sexo, idade, profissão, procedência, sinais e sintomas, descrição do exame da córnea, fatores de risco, medicações prévias, tratamento inicial instituído e condições associadas (traumatismo ocular, lentes de contato, HIV, diabetes mellitus, ceratoplastia, lagofalmo e triquíase).

As amostras serão coletadas pelos médicos nas unidades hospitalares. Será fornecido um "kit" para coleta composto de: três unidades de swab – rayon estéril, um tubo contendo meio Sabouraud glicose ágar, um tubo contendo meio Sabouraud com Cloranfenicol e duas lâminas de microscopia. Uma vez coletado o material, os swabs serão introduzidos nos tubos contendo os meios de cultura e deixados à temperatura ambiente até o transporte para o laboratório. O terceiro swab será para coleta e esfregaço nas lâminas. Ao chegar ao laboratório, as lâminas serão coradas pelo método de Gram e hidróxido de sódio e observadas ao microscópio óptico. Os meios de cultura com material clínico coletados serão incubados a 30°C por até 6 semanas e será feito a leitura diária para verificar crescimento. A cultura será considerada positiva quando houver crescimento nos dois meios de cultura ou se houver crescimento confluyente no local de inoculação no meio em pelo menos um meio de cultura. Serão realizadas Identificação Proteômica e Teste de sensibilidade a antifúngicos.

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**CEP:** 60.430-275

**E-mail:** comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.632.640

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados de forma adequada: folha de rosto; cronograma; orçamento; declaração dos pesquisadores; declaração de infraestrutura das 3 instituições; ofício de encaminhamento ao CEP e TCLE

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Enviar o relatório final ao concluir a pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1618769.pdf	02/03/2021 23:46:07		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	02/03/2021 23:45:46	Edlány Pinho Romão Milanez	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	29/01/2021 12:00:01	Edlány Pinho Romão Milanez	Aceito
Orçamento	cronograma.pdf	29/01/2021 11:56:42	Edlány Pinho Romão Milanez	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_edlany.docx	28/01/2021 21:42:23	Edlány Pinho Romão Milanez	Aceito
Declaração de Pesquisadores	concordancia.pdf	07/11/2020 16:34:15	Edlány Pinho Romão Milanez	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacoes.pdf	07/11/2020 16:30:42	Edlány Pinho Romão Milanez	Aceito
Outros	carta.pdf	07/11/2020 16:27:10	Edlány Pinho Romão Milanez	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.632.640

FORTALEZA, 06 de Abril de 2021

---

**Assinado por:**  
**FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** RUA CAL. NUNES DE MENEZES, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE **Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

**ANEXO III**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(TCLE)**

Você está sendo convidada pela aluna Edlâny Pinho Romão Milanez como participante da pesquisa intitulada **“ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DAS CERATITES POR FUNGOS NO ESTADO DO CEARÁ”**. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

A sua participação envolve o fornecimento de uma amostra da sua córnea (a parte da frente do seu olho) que será coletada pelo seu médico oftalmologista. Para tanto, ele usará um cotonete com cabo longo chamado “swab” que possui uma ponta arredondada com textura macia. O médico tocará levemente a sua córnea com a ponta deste cotonete. Neste momento, você pode sentir desconforto no local, vontade de coçar o olho ou ardor em todo o olho. Todas essas sensações são temporárias e devem desaparecer em alguns minutos após o exame. O procedimento será realizado de forma a evitar a entrada de micróbios no seu olho, pois todos os instrumentos são estéreis (não possuem nenhum micróbio vivo). Após a realização deste exame, o médico lhe fará uma entrevista com perguntas de um questionário e anotará todas as suas respostas. O objetivo desta pesquisa é conhecer os microrganismos que podem estar causando a sua doença. Informo que não haverá pagamentos, entrega de brindes ou vantagens financeiras para nenhum participante desta pesquisa.

Os benefícios desta pesquisa: a sua participação poderá contribuir para a geração de dados que, no futuro, auxiliarão os médicos na descoberta de novas formas de tratar a úlcera de córnea. Além disso o seu médico receberá o resultado do exame realizado para auxiliá-lo no tratamento. Sua privacidade será respeitada ao longo desta pesquisa. Você pode se recusar a participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem justificativa e sem prejuízo ao seu atendimento.

As informações conseguidas por meio da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e a divulgação das informações mencionadas só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Dados do responsável pela pesquisa:

Edlâny Pinho Romão Milanez

Bióloga - CRBio: 99.341/05-D

Endereço: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Bloco da Biomedicina, Laboratório de Micologia. Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Bairro: Rodolfo Teófilo, Fortaleza-Ceará, CEP: 60.430-270. Telefone para contato: (85) 987638799

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ. Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O \_\_\_\_\_ abaixo assinado

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos,

RG: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa.

Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome da participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Nome do profissional que aplicou o TCLE: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_