

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CECÍLIA BARROS DUARTE

**CERATITES INFECCIOSAS: FATORES ASSOCIADOS À POSITIVIDADE DAS  
CULTURAS**

CURITIBA

2016

MARIA CECÍLIA BARROS DUARTE

**CERATITES INFECCIOSAS: FATORES ASSOCIADOS À POSITIVIDADE DAS  
CULTURAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Felipe F. Bondan Tuon

CURITIBA

2016

Duarte, Maria Cecília Barros  
Ceratitis infecciosas: fatores associados a positividade  
das culturas / Maria Cecília Barros Duarte. – Curitiba, 2016.  
76 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Felipe F. Bondan Tuon  
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná.

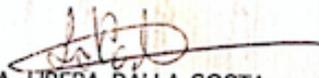
1. Ceratite. 2. Úlcera da córnea. 3. Cultura. 4. Antibacterianos.  
5. Corticosteróides. I. Título.

NLM: WW 220

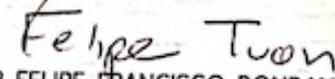


## PARECER

Aos nove dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dezesseis, a banca examinadora constituída pelos Professores: DRA. LIBERA DALLA-COSTA (INSTITUTO DE PESQUISA PEQUENO PRÍNCIPE - Pr), DR. DANIEL WASILEWSKI (UFPR) e ORIENTADOR DR. FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON (UFPR), exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por MARIA CECILIA BARROS DUARTE, pós-graduanda concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: "CERATITES INFECCIOSAS: FATORES ASSOCIADOS À POSITIVIDADE DAS CULTURAS". A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna**, após publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

  
PROFA. DRA. LIBERA DALLA-COSTA

  
PROF. DR. DANIEL WASILEWSKI

  
PROF. DR. FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON

*Aos meus pais, Roberto e Donata.*

*Aos meus irmãos Maria Vitória e Cesar.*

*Aos sobrinhos Carolina, Daniel, Sofia e Eduardo.*

*Por me apoiarem em todos os*

*momentos da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os que estiveram presentes na realização desse trabalho, em especial:

Ao meu orientador, Dr. Felipe Tuon, por acreditar nas minhas ideias, pelo interesse na pesquisa das ceratites infecciosas, pela dedicação e trabalho.

Ao colega Dr. Guilherme Muller, pelo seu trabalho dedicado no ambulatório de doenças externas oculares no Hospital Evangélico, grande parte dos pacientes dessa pesquisa são oriundos desse ambulatório.

Aos funcionários do Hospital de Olhos do Paraná, em especial a auxiliar Andriele pela sua ajuda inestimável.

Aos amigos do laboratório Genoprimer, pela atenção e carinho com os exames de pesquisa de *Acanthamoeba*.

Aos bioquímicos do laboratório de Microbiologia do Hospital Evangélico, em especial Juliette, Lucas e Kaue.

Ao bioquímico Guilherme Becker, por dar os primeiros passos comigo nessa pesquisa.

A Deus, pela oportunidade de realizar um sonho!

*A melhor de todas as coisas é aprender.  
O dinheiro pode ser perdido ou roubado,  
a saúde e força podem falhar,  
mas o que você dedicou à sua mente  
é seu para sempre.*

*LOUIS L. AMOUR*

## RESUMO

A ceratite infecciosa é uma causa importante de morbidade ocular e de prejuízo da visão. O diagnóstico microbiológico precoce e o tratamento imediato podem evitar um prognóstico visual ruim. Os objetivos desse estudo foram: determinar a taxa de positividade das culturas em pacientes com ceratite infecciosa, investigar os fatores associados a culturas positivas, estabelecer as principais etiologias de ceratite em nosso meio e avaliar o grau de concordância entre a cultura e a PCR (reação em cadeia da polimerase) na pesquisa de *Acanthamoeba*. Pacientes com suspeita de ceratite infecciosa atendidos no serviço de emergência de dois hospitais em Curitiba/PR/Brasil, entre junho de 2014 e abril de 2016 foram selecionados para inclusão no estudo. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram submetidos a exame oftalmológico e raspado de córnea para exames laboratoriais. Dados demográficos, história atual da doença, tratamentos em curso e história pregressa de comorbidades oculares foram coletados. Setenta e cinco pacientes preencheram os critérios de inclusão. As culturas foram positivas em 41% (31/75) dos exames. Os agentes causadores mais encontrados foram as bactérias (54%;17/31), seguida por fungos (32%;10/31) e *Acanthamoeba sp.* (16%,5/31)). Os fatores associados com culturas positivas foram o uso de corticoide antes da coleta ( $p=0,006$ ) e úlceras maiores que  $3.62\text{mm}^2$  ( $p=0,016$ ). Pacientes em uso de antibiótico antes da coleta tiveram maior chance de um resultado de cultura negativo [OR: 3,65 (IC95%: 1,32 – 10,07)]. Em 26 casos foi possível comparar a concordância entre os testes de cultura e PCR na pesquisa de *Acanthamoeba*. Houve concordância entre os testes em 96% dos casos. A taxa de positividade das culturas de raspado de córnea encontrada foi de 41%. Os agentes infecciosos mais prevalentes foram as bactérias. O tratamento com antibiótico antes da coleta diminuiu a chance de uma cultura positiva, o uso de colírio de corticoide e o tamanho da úlcera maior que  $3.62\text{mm}^2$  estão associados a maior probabilidade de uma cultura positiva. Houve uma alta concordância entre os testes de cultura e PCR na pesquisa de *Acanthamoeba*.

Palavras-chave: Ceratite. Úlcera da córnea. Cultura. Antibióticos. Corticosteróides.

## ABSTRACT

Infectious keratitis is an important cause of ocular morbidity and visual impairment. Prompt microbiological diagnosis and treatment can avoid a bad outcome. The purposes of this study were: to determine the rate of positive cultures in patients with infectious keratitis, investigate the factors associated with culture positivity, identify the main microorganisms responsible for keratitis in our hospitals and determine the rate of agreement between culture and polymerase chain reaction (PCR) in the identification of *Acanthamoeba*. Patients with suspected infectious keratitis presenting to the emergency service of two hospitals in Curitiba, PR, Brazil, between June 2014 and April 2016, were recruited for the study. Patients who met the inclusion criteria were submitted to eye examination and corneal scraping for laboratorial tests. Demographic data, current medical history, current treatments and history of ocular comorbidities were obtained. Seventy-five patients fulfilled the inclusion criteria. The culture positivity rate was 41.3% (31/75). The most frequent microorganisms identified were bacteria (54%, 17/31), followed by fungi (32%, 10/31), and *Acanthamoeba sp.* (16%, 5/31). Two factors were significantly associated with positive cultures: previous treatment with corticosteroid drops ( $p=0.006$ ) and ulcer size larger than  $3.62 \text{ mm}^2$  ( $p=0.016$ ). Patients on topical antibiotics before corneal scraping were more likely to be culture negative [OR: 3.65 (IC95%: 1.32 – 10.07)]. In twenty-six cases the comparison between culture test and PCR test for *Acanthamoeba sp.* identification was realized. There was agreement between tests in 96% of the cases. The culture positivity rate of corneal scraping was 41.3%. The most frequent microorganisms identified were bacteria. Antibiotic treatment before corneal scraping decreases the probability of a positive culture, corticosteroids treatment and ulcer size larger than  $3.62 \text{ mm}^2$ , are associated with positive cultures. There was a great agreement between the culture test and PCR test in the identification of *Acanthamoeba sp.*

Keywords: Keratitis. Corneal ulcer. Cultures. Antibiotics. Corticoids.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1	OBJETIVOS .....	10
1.1.1	Objetivo principal .....	10
1.1.2	Objetivos secundários.....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1	ASPECTOS HISTÓRICOS .....	12
2.2	ASPECTOS GERAIS .....	13
2.3	CERATITES BACTERIANAS .....	14
2.4	CERATITES FÚNGICAS.....	15
2.5	CERATITES POR <i>ACANTHAMOEBA</i> .....	16
2.6	CERATITES VIRAIS .....	17
2.7	FATORES DE RISCO.....	18
2.8	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL .....	18
2.9	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	19
2.9.1	Microbiologia .....	19
2.9.2	Amplificação de ácidos nucleicos.....	22
2.10	TRATAMENTO EMPÍRICO VERSUS TRATAMENTO BASEADO NA CULTURA.....	23
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	25
3.1	DESCRIÇÃO DO ESTUDO.....	25
3.1.1	Critérios de inclusão.....	25
3.1.2	Critérios de exclusão .....	25
3.2	EXAME OFTALMOLÓGICO .....	26
3.3	EXAME LABORATORIAL: MICROBIOLOGIA .....	26
3.4	EXAME LABORATORIAL: AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS...	27
3.4.1	Extração de DNA.....	28
3.4.2	Nested-PCR .....	28

3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	32
4.2	FATORES DE RISCO .....	32
4.3	EXAME BIOMISCROSCÓPICO .....	34
4.4	RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS E TAXA DE POSITIVIDADE DAS CULTURAS .....	34
4.5	COMPARAÇÃO DA POSITIVIDADE DAS CULTURAS NOS SUBGRUPOS DE PACIENTES COM CERATITE INFECCIOSA .....	36
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
	<b>APÊNDICE 1 – FICHA CLÍNICA DO ESTUDO</b> .....	<b>52</b>
	<b>APÊNDICE 2 – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>54</b>
	<b>ANEXO 1 – PREPARO DO MEIO DE ÁGAR NÃO NUTRIENTE</b> .....	<b>67</b>
	<b>ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO 3 – PARECER DE APROVAÇÃO DO ESTUDO NO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ceratite infecciosa (CI) é uma das principais causas de perda visual evitável no mundo. (WHITCHER; SRINIVASANM.; UPADHYAY, 2001). O peso da cegueira causada pelas doenças da córnea é enorme, tanto para o indivíduo como para a comunidade, em especial quando se considera que tende a acometer pessoas em faixas etárias mais jovens, diferente do que acontece com outras causas de cegueira como o glaucoma e a catarata (BURTON, 2009).

A incidência da CI varia entre os países dependendo do grau de desenvolvimento. Encontramos altos índices na Índia (113 per 100.000 pessoas-ano).(GONZALES et al,; 1996; LIN et al., 2012) e baixos índices nos EUA (11 per 100.000 pessoas-ano). (ERIE et al., 1993). Quando avaliamos o agente etiológico também encontramos diferenças. Em regiões rurais pouco desenvolvidas os fungos são predominantes. (LASPINA et al., 2004; LIN et al., 2012). Já em países desenvolvidos as bactérias e *Acanthamoeba sp.* aparecem com maior frequência devido ao hábito de usar lentes de contato. (PANDA et al., 2007).

O diagnóstico da CI é inicialmente clínico. Baseado nas informações da história e no exame de biomicroscopia elabora-se a hipótese do agente etiológico e inicia-se o tratamento. No entanto, os sinais clínicos não são inequívocos de determinada etiologia e o exame laboratorial de cultura do raspado de córnea com isolamento do agente é o padrão ouro de diagnóstico. (DAHLGREN; LINGAPPAN; WILHELMUS, 2007; KUMAR; CRUZAT; HAMRAH, 2011). As taxas de positividade das culturas ficam em torno de 50%, podendo variar entre 32% a 79% dependendo da publicação. (FEILMEIER et al., 2010; FURLANETTO et al., 2010; IBRAHIM et al.; 2011; LASPINA et al., 2004; LIN et al., 2012; MARANGON; MILLER; ALFONSO, 2004; MARUJO et al., 2013; NG et al., 2015; OTRI et al., 2013). Quando os exames laboratoriais retornam negativos, o tratamento inicial, com colírios antimicrobianos de amplo espectro, é mantido. Escolhe-se o antimicrobiano com base na suspeita clínica e nos dados publicados disponíveis sobre os patógenos oculares mais frequentes de cada região. Se a evolução é desfavorável novas amostras são coletadas para repetir os exames de microbiologia. Em casos que não respondem ao tratamento e evoluem com perfuração ocular o transplante de córnea de urgência é indicado. O tecido ocular retirado é enviado para exames adicionais de microbiologia e patologia.

Outra opção de método diagnóstico é através de técnicas moleculares, como a PCR (reação em cadeia da polimerase). Essa técnica permite maior rapidez na obtenção dos resultados quando comparado com as culturas. Além disso é mais sensível e específica em relação a identificação da *Acanthamoeba sp.* (BOGGILD et al., 2009).

O tratamento com antimicrobianos tópicos e os procedimentos cirúrgicos tem obtido sucesso na resolução da infecção e na preservação da integridade do globo ocular. No entanto, o prejuízo visual é frequente devido a opacidade corneana cicatricial resultante do processo inflamatório envolvido (PANDA et al., 2007). O diagnóstico etiológico precoce e o tratamento adequado imediato são fatores associados com um bom resultado final da CI, mediante a preservação da acuidade visual. (DART; SAW; KILVINGTON, 2009). A recuperação de micro-organismos causadores de CI através das culturas, e mesmo por outros métodos como a PCR, depende de um raspado de córnea bem feito e da semeadura nos diferentes meios de cultura de acordo com a suspeita clínica. Os fatores associados ao sucesso da recuperação dos patógenos na cultura tem sido estudado, porém, ainda existe controvérsia quanto quais seriam esses fatores. (MORLET; MINASSIAN; BUTCHER, 1999; BHADANGE et al., 2015; MARANGON; MILLER; ALFONSO, 2004; MCDONNELL et al., 1992; VAN DER MEULEN et al., 2008).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo principal

Determinar a taxa de positividade das culturas em pacientes com ceratite infecciosa submetidos a coleta de raspado de córnea.

### 1.1.2 Objetivos secundários:

- a) Investigar os fatores associados a culturas positivas.
- b) Estabelecer as principais etiologias de ceratite infecciosa dos pacientes do estudo.
- c) Avaliar o grau de concordância entre dois testes diferentes para pesquisa de *Acanthamoeba sp.*: cultura versus reação em cadeia da polimerase (PCR).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

A literatura do início do século XX evidencia a dificuldade para tratar as ceratites infecciosas, então denominada “ceratite supurativa”, ou “úlceras serpiginosas”. O livro de Nathaniel Bishop Harman’s publicado em 1919 traz a descrição das úlceras serpiginosas; modalidades mais graves das ceratite supurativas. As úlceras serpiginosas acometiam principalmente os pacientes idosos e os malnutridos. Outros fatores de risco eram as doenças purulentas da conjuntiva, o tracoma, úlceras acniformes, úlceras por exposição após paralisia do músculo orbicular e as úlceras tróficas. Os patógenos mais prevalentes eram *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* spp. e a *Moraxella* spp. (ONG; CORBETT, 2015).

Com a inexistência de antibióticos, naquela época, o tratamento baseava-se no uso de antissépticos e desinfetantes. Ácido bórico morno, percloroeto de mercúrio, óxido amarelo de mercúrio e sulfato de zinco estavam entre os tratamentos mais utilizados. Em casos mais graves era realizada cauterização química com ácido tricloroacético, ácido nítrico, iodo, fenol ou lisol. Nas úlceras tróficas ou úlceras resultantes de exposição, sutura das pálpebras nos cantos medial e lateral com lubrificação abundante com vaselina era o tratamento de escolha. O cautério térmico era utilizado nos casos que não respondiam ao tratamento inicial. Outra modalidade de tratamento para úlceras recalcitrantes era a abertura da câmara anterior utilizando a técnica de “ceratotomia delimitante”. A ideia desse procedimento era aliviar a tensão da córnea e permitir o influxo da linfa, com células de defesa, a partir do limbo. Atropina era utilizada e a ferida era aberta diariamente até a cicatrização. (GIFFORD, 1934).

Muitas mudanças ocorreram desde o início do século XX. O avanço dos métodos diagnósticos e principalmente o advento dos antimicrobianos melhorou o tratamento e o prognóstico visual das ceratite infecciosas. Apesar disso, os princípios que norteiam o tratamento da ceratite infecciosa permanecem os mesmos: erradicar o patógeno; abordar os fatores de risco, limitar o dano tecidual e promover a cicatrização. (ONG; CORBETT, 2015).

## 2.2 ASPECTOS GERAIS

A ceratite infecciosa (CI) é uma doença decorrente da invasão e proliferação de microrganismos no epitélio e estroma corneano, gerando uma destruição tecidual e reação inflamatória local. Ela pode ser causada por bactérias, fungos, protozoários ou vírus. Os sintomas mais específicos são dor ocular e diminuição da acuidade visual. A dor decorre do fato de a córnea ser ricamente innervada; é caracteristicamente aguda e de variada intensidade. A acuidade visual pode estar mantida, em casos iniciais em que o acometimento é mais periférico, ou bastante diminuída, nos casos em que a lesão acomete a córnea na área do eixo visual. Outros sintomas como lacrimejamento, hiperemia ocular, fotofobia e dificuldade de manter o olho aberto são frequentes, embora esses sejam sintomas inespecíficos que ocorrem em uma grande variedade de condições.

Ao exame biomicroscópico, observa-se uma opacidade que pode estar apenas no epitélio ou incluir o estroma, essa opacidade decorre da presença de células inflamatórias, as quais normalmente não estão presentes no centro da córnea. O epitélio apresenta uma solução de continuidade (defeito epitelial), podendo haver uma perda do tecido com comprometimento do estroma, o que é descrito como uma úlcera de córnea. Em alguns casos ocorre apenas erosões puntiformes do epitélio com o infiltrado subjacente. A presença de reação de câmara anterior ou mesmo hipópio é frequente. O quadro clínico pode variar dependendo do microrganismo responsável pela infecção.

O tratamento com antimicrobianos tópicos e os procedimentos cirúrgicos tem obtido sucesso na resolução da infecção e na preservação da integridade do globo ocular. Apesar disso, o prejuízo visual é frequente devido a opacidade corneana cicatricial resultante do processo inflamatório envolvido. A evolução do quadro para uma infecção mais grave do globo ocular (endoftalmite) é infrequente, e em geral está associada a condições sistêmicas (diabetes, imunossupressão, HIV, cirrose) e cirurgia ocular prévia. (MALIHI et al., 2016). Henry et al revisaram todos os casos de pacientes tratados por endoftalmite/ceratite com cultura positiva entre 1995 e 2009 no Bascom Palmer Eye Institute e descobriram que dos 9.934 casos de suspeita clínica de ceratite, 49 olhos (0,5%) evoluíram para endoftalmite com cultura positiva. (HENRY et al., 2012)

A cegueira decorrente de doenças corneanas é um grande problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde as opacidades corneanas afetam 1,9 milhões de pessoas (5,1% dos casos de cegueira). Se outras condições causadoras de cegueira decorrentes de patologias da córnea forem incluídas como o tracoma, a deficiência de vitamina A, a oftalmia neonatal e a oncocerquíase, esse número é ainda maior. O peso da cegueira causada pelas doenças da córnea é enorme, tanto para o indivíduo como para a comunidade, em especial quando se considera que tende a acometer pessoas em faixas etárias mais jovens, diferente do que acontece com outras causas de cegueira como o glaucoma e a catarata. (BURTON, 2009).

### 2.3 CERATITES BACTERIANAS

As bactérias são os microrganismos mais frequentemente isolados na maioria dos estudos publicados sobre ceratite. As diferentes publicações trazem taxas que variam entre 40 a 83% de isolados bacterianos dependendo da população estudada. (FEILMEIER et al., 2010; FURLANETTO et al., 2010; MARANGON; MILLER; ALFONSO, 2004; MARUJO et al., 2013; OTRI et al., 2013). *Staphylococcus aureus*, *Estafilococos coagulase-negativa*, *Streptococcus spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* estão entre os mais comuns. (MARUJO et al., 2013; PANDITA; MURPHY, 2011). A progressão da doença depende da virulência da bactéria e das defesas do hospedeiro. Os achados clínicos geralmente não diferenciam o agente causador, porém quando somados a história do paciente podem direcionar o tratamento para um determinado patógeno. Por exemplo, quadros com necrose estromal de rápida progressão, e secreção mucopurulenta em usuário de lente de contato são característicos de *Pseudomonas aeruginosa*. (KRACHMER; MANNIS; HOLLAND, 2005).

As micobactérias atípicas ou não tuberculosas, ou micobactérias de crescimento rápido, são patógenos oportunistas, que promovem infecção após pequenos traumas ou cirurgia ocular, em especial cirurgia refrativa. São ubíquos na natureza e podem ser isolados a partir de vários lugares como solo, poeira, água, animais, leite e comida. Em 1965, Turner e Stinson publicaram o primeiro relato de ceratite por micobactérias após a remoção de um corpo estranho. (TURNER;

STINSON, 1965). Em geral, duas a três semanas após trauma ou cirurgia ocular, observa-se o aparecimento de um infiltrado na córnea, que alguns autores identificam como infiltrado em para-brisa quebrado, de curso indolente que não responde bem ao tratamento com colírios antibióticos. (RAPUANO et al., 2000).

No Brasil, três trabalhos publicados relataram surtos de ceratite por micobactérias em pacientes submetidos a cirurgia de LASIK (*laser in situ keratomileusis*) no início dos anos 2000. Alvarenga et al relataram 3 casos de pacientes que evoluíram com irritação ocular após 15 a 20 dias da cirurgia, em todos os casos infiltrados corneanos foram identificados e o raspado de córnea para investigação laboratorial foi positivo para *Mycobacterium chelonae*. (ALVARENGA et al., 2002). Freitas et al publicaram uma série com 11 olhos com ceratite por *Mycobacterium chelonae* após LASIK em um período de 2 semanas. A principal hipótese foi de contaminação do aparelho vaporizador responsável pela limpeza do microcerátomo. (FREITAS et al., 2003). Sampaio et al relataram 5 casos de ceratite por *Mycobacterium immunogenum* após cirurgia de LASIK em um período de 30 dias. (SAMPAIO et al., 2006).

A identificação das micobactérias atípicas pode ser feita pela microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen e através de meios de culturas específicos como Lowenstein-Jensen. Nas séries de casos de surtos descritas acima foi possível isolar esse agente nos meios de cultura de rotina da oftalmologia, como o ágar sangue. O tratamento em geral é bastante difícil e deve incluir uma combinação de antibióticos por um tempo prolongado e mesmo procedimentos como desbridamento cirúrgico, e transplante de córnea.

## 2.4 CERATITES FÚNGICAS

Estima-se que 5 a 25% de todas as ceratite infecciosas sejam causadas por fungos, sendo os fungos do tipo filamentosos os mais isolados em todo o mundo. *Aspergillus spp* e *Fusarium spp* estão entre os mais encontrados. (MÜLLER; KARA-JOSÉ; DE CASTRO, 2012). As características clínicas das ceratite fúngicas são úlceras com infiltrados de margens irregulares, com coloração acinzentada e a presença de lesões satélites. As infecções fúngicas em geral confundem-se com as bacterianas e a história clínica pode ser muito útil. Trauma com material vegetal e evolução insidiosa falam a favor de etiologia fúngicas. No entanto, apenas o exame

laboratorial pode confirmar a suspeita clínica. O diagnóstico e o tratamento das ceratite fúngicas é desafiador. Há um alto índice de culturas falso negativas (KUMAR; CRUZAT; HAMRAH, 2011), o que atrasa muitas vezes o tratamento correto. Os colírios de antifúngicos não estão disponíveis comercialmente. As preparações de natamicina a 5% são classicamente utilizadas nos casos de fungos filamentosos, e as preparações de anfotericina B 0,15% nos casos de fungos leveduriformes. O epitélio corneano funciona como uma barreira para a penetração de ambos os fármacos. É importante que o epitélio seja desbridado, em especial no início do tratamento para permitir absorção do antifúngico.

## 2.5 CERATITES POR *ACANTHAMOEBA*

A infecção corneana por *Acanthamoeba* foi primeiramente descrita em 1973 e o uso de lente de contato foi identificado como o principal fator de risco. (JONES, 1979). A ceratite por *Acanthamoeba* (CA) é rara em países em desenvolvimento quando comparada aos casos de ceratites fúngicas e bacterianas. (BHARATHI, 2002). Em um estudo retrospectivo realizado em São Paulo, 185 casos de CA provados por cultura foram identificados em um período de 20 anos, com um aumento importante da incidência após 1996. Entre os pacientes com CA, 85% eram usuários de lente de contato e o restante apresentava história de trauma ocular relacionado a corpo estranho. (CARVALHO et al., 2009).

A *Acanthamoeba* é um protozoário de vida livre, muito difundido no ambiente. Apresenta dois estágios no seu ciclo biológico: o trofozoíto (20-40µm) e o cisto (12-30µm). A forma cística é extremamente resistente a condições adversas, como por exemplo variações de osmolaridade, pH, desinfecção, congelamento e agentes antimicrobianos. Apesar de rara, a ceratite por *Acanthamoeba* é uma grande preocupação na oftalmologia, devido ao crescimento do número de casos, da dificuldade do diagnóstico e do tratamento. O quadro clínico é bastante variado, sendo os seguintes achados os mais característicos: dor de forte intensidade desproporcional aos achados clínicos; irregularidade epitelial, padrão dentrítico; ceratoneurite radial e presença de infiltrado em anel. Esse quadro pode ter períodos de exacerbação e remissão, e muitas vezes demora-se para fazer o diagnóstico. (RAPUANO, et al., 2000). É bastante comum que esses pacientes sejam no início inadequadamente tratados como ceratite herpética. Deve-se sempre levantar a

suspeita de ceratite por *Acanthamoeba* em usuários de lente de contato com quadro de ceratite. A confirmação diagnóstica é feita pela pesquisa de *Acanthamoeba* por cultura ou PCR. O tratamento instituído precocemente é determinante para um bom prognóstico. (DART; SAW; KILVINGTON, 2009).

O tratamento da ceratite por *Acanthamoeba* é desafiador. As biguanidas (polihexametileno biguanida e clorexidina) e as diamidinas (isotionato de propamidina e hexamidina) são o tratamento de escolha, uma vez que são os únicos fármacos que eliminam os cistos. (MAYCOCK; JAYASWAL, 2016). A biguanida e a clorexidina devem ser manipuladas em farmácia especializada, uma vez que não estão disponíveis comercialmente. O isotionato de propamidina e a hexamidina não são aprovados pela ANVISA para venda no Brasil. O tratamento deve ser prolongado, durando vários meses.

## 2.6 CERATITES VIRAIS

As ceratites virais mais comuns, que cursam com ulcera de córnea e entram no diagnóstico diferencial das ceratites fúngicas, bacterianas e amebianas são as causadas pelo *herpes simplex* e *herpes zoster*. Outros vírus, como Epstein-Barr, citomegalovírus, poxvírus, adenovírus e os vírus da caxumba e do sarampo são menos comuns e em geral cursam com ceratite superficial, autolimitada e sem perda da visão (KRACHMER; MANNIS; HOLLAND, 2005).

Os vírus *herpes simplex* e *herpes zoster* estão implicados em inúmeras patologias oculares, desde o acometimento das pálpebras até retinites graves. A ceratite herpética é a causa infecciosa mais comum de cegueira em países desenvolvidos, devido seu caráter recorrente (LIESEGANG, 2001). Na maioria das vezes o diagnóstico da ceratite herpética é imediato, uma lesão epitelial dendrítica característica ao exame de biomicroscopia. No entanto, há outras formas de apresentação como úlceras marginais, lesões epiteliais geográficas, inflamações do estroma corneano e mesmo do endotélio. Todas essas apresentações podem gerar confusão diagnóstica com quadros de ceratite bacteriana, fúngica e principalmente ceratite por *Acanthamoeba*.

## 2.7 FATORES DE RISCO

A córnea possui proteção química e mecânica contra os agentes infecciosos. Na lágrima, as imunoglobulinas e enzimas presentes, como a lisozima e a lactoferrina, agem quebrando a parede das bactérias e ativando o sistema imune local. O ato de piscar e a presença do epitélio corneano são defesas mecânicas. Um epitélio sadio proporciona uma importante barreira física contra a adesão e penetração de microrganismos. (KRACHMER; MANNIS; HOLLAND, 2005). Portanto, condições que quebrem essas defesas naturais são fatores de risco para CI. Esses fatores podem ser divididos em: extrínsecos (uso de lente de contato, trauma e cirurgia ocular), doenças da superfície ocular (ceratoconjuntivite seca, ceratoconjuntivite alérgica, ceratopatia bolhosa, triquíase e lagoftalmo) e doenças sistêmicas (diabetes, doenças dermatológicas; colagenoses, deficiência de vitamina A).

Entre os jovens de países desenvolvidos, o fator predisponente mais encontrado é o uso de lentes de contato. (VAN DER MEULEN et al., 2008). Os pacientes com maior risco para CI são aqueles que não seguem as orientações de tempo de uso, higiene das mãos e cuidados das lentes de contato. Estudos mostram que pernoitar com as lentes de contato aumenta o risco de ceratite infecciosa em dez vezes. (BUEHLER, 1992; MATTHEWS, 1992). Microrganismos podem aderir as lentes, independentemente do tipo de material, e sobrevivem na umidade dos estojos. Outro ponto importante é a possibilidade de micro abrasões corneanas que podem ocorrer durante a colocação e remoção das lentes no olho. O trauma ocular também é fator de risco bem estabelecido para as ceratites infecciosas. (LASPINA et al., 2004). Pode ser por químico, corpo estranho ou trauma com material vegetal, esse último está principalmente relacionado com as ceratite fúngicas. (MÜLLER; KARA-JOSÉ; DE CASTRO, 2012).

## 2.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico diferencial das ceratite infecciosas inclui outras causas de epiteliopatia, úlcera e infiltrados estéreis. Infiltrados estéreis podem acontecer em usuários de lente de contato após uso estendido. No entanto, esses resolvem apenas com a descontinuação do uso da lente de contato por alguns dias. Doenças sistêmicas do colágeno, como lúpus, artrite reumatoide e vasculites podem cursar com um

quadro de ceratite ulcerativa periférica que pode dificultar o diagnóstico correto. Em geral essas lesões são na periferia da córnea, e os pacientes relatam história de doença sistêmica. A ceratite ulcerativa periférica melhora com o uso de colírio de corticóide e controle da doença sistêmica de base.

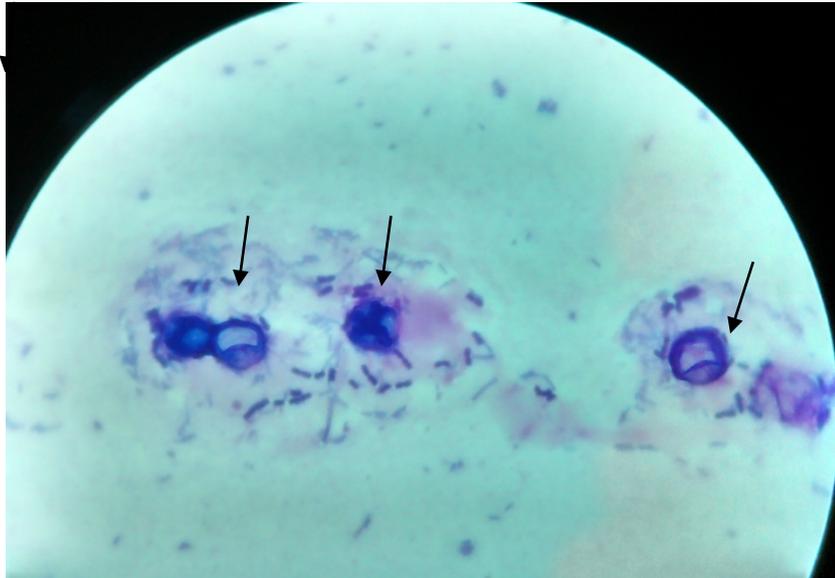
A ceratite neurotrófica é um dos diagnósticos diferenciais mais difíceis na prática clínica, principalmente pela possibilidade de infecção secundária nos casos mais recalcitrantes. A perda de sensibilidade do epitélio corneano o torna vulnerável a lesões ocultas, diminuição do reflexo do piscar e diminuição da cicatrização. Ocorre a formação de defeito epitelial que progride para úlcera e nos estágios mais avançados para perfuração. O tratamento com colírios de antibiótico de hora em hora, no caso de confusão com ceratite infecciosa, impede o fechamento da úlcera pela toxicidade da medicação. Por isso a importância do diagnóstico correto.

## 2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### 2.9.1 Microbiologia

Os testes microbiológicos dividem-se em microscopia e cultura. O exame de microscopia do material coletado da córnea possibilita a detecção inicial de micróbios e sua identificação preliminar. As colorações de Gram, Wright-Giemsa e o KOH a 10% são as predominantemente utilizadas nesse cenário. Quando se raspa a superfície da córnea a quantidade de material que se obtém é pequena, o que pode dificultar a realização dos testes microbiológicos. A sensibilidade da microscopia na detecção dos patógenos causadores de CI é de 65% para fungos e 33% para bactérias (ELEINEN et al., 2012) e 55% para *Acanthamoeba sp.* (BOGGILD et al., 2009). A *Acanthamoeba sp.* pode ser visualizada ao microscópio óptico nos seus dois estágios biológicos: trofozoíto e cisto. O trofozoíto mede de 20-40µm, possui pseudópodos locomotivos em forma de espinho e um núcleo com nucléolo centralizado. O cisto mede 12-30 µm, possui morfologia bem característica com dupla parede (FIGURA 1).

FIGURA 1 –FOTOGRAFIA DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE AMOSTRA DE RASPADO DE CÓRNEA EM LÂMINA CORADA PELO GRAM EVIDENCIANDO CISTOS SUGESTIVOS DE *ACANTHAMOEBA SP.*



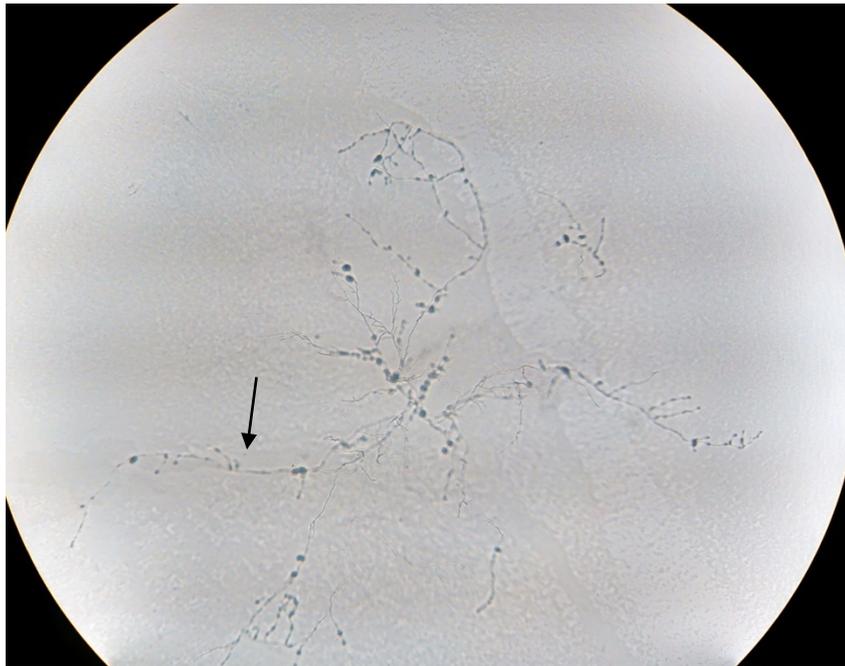
As setas apontam para estruturas sugestivas de cistos de *Acanthamoeba sp.*

Fonte: a autora

O padrão ouro de diagnóstico da ceratite infecciosa é o isolamento do agente em cultura. Além da confirmação diagnóstica permite o teste de sensibilidade aos antimicrobianos nos casos de isolamento de bactérias. A sensibilidade das culturas na recuperação de patógenos nos casos de ceratite infecciosa é de 59% para fungos e 57% para bactérias. (ELEINEN et al., 2012). Os meios de caldo BHI, ágar sangue e ágar chocolate semeados são incubados em atmosfera ambiente a 35°C, ou em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 a 7 dias. Estes materiais são analisados diariamente para observação do crescimento. Quando se observa turvação do meio no caldo BHI, este é repicado para uma placa de ágar sangue para obtenção de colônias isoladas. As placas de ágar Sabouraud semeadas são incubadas a 25°C em estufa própria para cultura de fungos. As culturas de fungos são incubadas por 15 a 30 dias antes de serem consideradas negativas. As placas de ágar não nutriente enriquecidas com *E. coli* semeadas são incubadas a 30°C por até 21 dias e são usadas para cultivo de *Acanthamoeba sp.*. Ao contrário dos outros micro-organismos pesquisados, a *Acanthamoeba sp.* não forma colônias. Nesta análise, observa-se em microscópio

com aumento de 10 vezes a presença de trilhas de trofozoítos na placa de cultivo (FIGURA 2).

FIGURA 2 –FOTOGRAFIA DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE AMOSTRA DE RASPADO DE CÓRNEA SEMEADA HÁ 7 DIAS EM PLACA DE ÁGAR EVIDENCIANDO TRILHAS, SUGESTIVO DA PRESENÇA DE TROFOZOÍTOS.



A seta aponta para uma das trilhas sugestiva da presença de trofozoítos de *Acanthamoeba sp.*

Fonte: a autora

Para a identificação de bactérias e fungos a partir de colônias isoladas nos meios de cultura podem-se utilizar esquemas de identificação baseados nas características genóticas, através da amplificação de DNA, ou baseados nas características fenotípicas, através de estudos da morfologia, metabologia e resistência ou sensibilidade aos agentes antimicrobianos. O esquema fenotípico é a forma clássica de identificação das bactérias e fungos. Para a identificação de bactérias e leveduras sistemas automatizados como o Vitek® 2 compact são comumente utilizados. Para a identificação dos fungos filamentosos uma opção é a

técnica de microcultivo em lâmina. Essa técnica permite a visualização das estruturas intactas do fungo no seu estado de crescimento. Após a incubação observa-se ao microscópio o tipo de micélio e estrutura de reprodução.

### 2.9.2 Amplificação de ácidos nucleicos

O diagnóstico molecular das infecções oculares é baseado na detecção de DNA dos microrganismos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) nas amostras de raspado de córnea. Graças a sensibilidade desta metodologia, amostras de DNA microbiano muito diluídas podem ser detectadas ainda que o agente não esteja se replicando. Esta é uma vantagem da utilização desse método nos casos das ceratites, uma vez que a quantidade de material obtida na raspagem da córnea é pequena. Vários estudos têm mostrado a eficácia e a rapidez deste teste, e sua importância nos casos em que os testes laboratoriais convencionais falham. (BOGGILD et al., 2009; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016; THOMPSON et al., 2008). Se a microscopia não identifica o microrganismo, os resultados de crescimento da cultura podem demorar até 21 dias, enquanto testes de PCR são executados em algumas horas. (ELEINEN et al., 2012; MAUBON et al., 2012).

No diagnóstico das ceratite infecciosas é necessário a utilização de nucleotídeos iniciadores (“primers”) que reconheçam todas as bactérias e todos os fungos. Os nucleotídeos iniciadores (“primers”) pan-bacterianos são desenhados para amplificação do gene bacteriano 16S rRNA, os nucleotídeos iniciadores (“primers”) universais para identificação de fungos são desenhados para amplificação da região D1/D2 do DNA dos fungos. O PCR de amplo alcance precisa ser seguido por PCR para sequenciamento de DNA nos casos positivos, para que se possa descobrir se o agente identificado é um patógeno verdadeiro ou um possível contaminante. A concordância dos resultados de sequenciamento de DNA por PCR com as culturas pode chegar a 89% nos casos de fungos. Porém fica em torno de 63% nos casos de bactérias, o que pode ser explicado pela detecção de bactérias da microbiota ocular. (ELEINEN et al., 2012; KIM et al., 2008).

O PCR é especialmente útil na detecção de *Acanthamoeba sp.* nas amostras de raspado de córnea. Os exames microbiológicos para identificação de *Acanthamoeba sp.* não fazem parte da rotina dos laboratórios de nosso país. O PCR

apresenta sensibilidade superior em relação a microscopia e a culturas. (BOGGILD et al., 2009; MAUBON et al., 2012).

Apesar de todas as vantagens os resultados do PCR das amostras de ceratite infecciosa devem ser interpretados juntamente com as culturas.

## 2.10 TRATAMENTO EMPÍRICO VERSUS TRATAMENTO BASEADO NA CULTURA

Os princípios do tratamento da ceratite infecciosa são: erradicar o patógeno, abordar os fatores de risco quando houver, limitar a destruição tecidual e promover a cicatrização. O tratamento inicial é feito com colírios antimicrobianos. Duas abordagens são praticadas: tratamento empírico ou tratamento baseado no resultado da cultura.

O tratamento empírico é apropriado nos casos suspeitos de etiologia bacteriana, quando o acometimento da córnea é periférico e pequeno, uma vez que esses casos têm baixo potencial de perda de visão, além da fácil disponibilidade dos colírios de antibiótico com amplo espectro de ação, como as fluoroquinolonas de quarta geração, ou os colírios fortificados de cefazolina e gentamicina.

Quando no exame clínico há suspeita de etiologia fúngica, amebiana ou por outros patógenos menos comuns, ou quando há uma lesão corneana central, profunda, ou grande, deve-se optar pelo raspado de córnea para os exames laboratoriais de microbiologia, já que esses casos têm alto potencial de perda de visão. (VITAL et al., 2007). Nesse cenário, após a coleta do raspado de córnea, o paciente inicia um colírio de antibiótico de amplo espectro, como na abordagem empírica, até que os resultados laboratoriais estejam prontos ou até que colírios antifúngicos ou cisticidas estejam disponíveis, de acordo com a suspeita clínica. Quando os resultados de microbiologia são negativos, segue-se com o tratamento empírico e observa-se a evolução do caso. Em casos que não respondem ao tratamento, novo raspado de córnea para microbiologia está indicado. O tratamento cirúrgico da CI está indicado nos casos de perfuração ocular, ou quando há falha do tratamento clínico. As modalidades de tratamento cirúrgico são: lavagem da câmara anterior com preparações de anfotericina B; uso de cola biológica nas perfurações pequenas e transplante de córnea “a quente” (em vigência de infecção e inflamação).

Apesar de as orientações de quando coletar o raspado de córnea para exames microbiológicos estarem bem definidas, na prática, a maioria dos oftalmologistas trata a CI de forma empírica, o que foi comprovado pelo trabalho de McDonnell (MCDONNELL et al., 1992). O tratamento baseado na cultura fica quase sempre restrito aos centros de referência.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este foi um estudo observacional, descritivo e transversal realizado no Hospital de Olhos do Paraná, no Hospital Evangélico de Curitiba e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de junho de 2014 até abril de 2016. Todos os participantes ou responsáveis assinaram termo de consentimento da pesquisa (ANEXO 2). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Parecer número 626.556 de 24/03/2014) (ANEXO 3).

##### 3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes atendidos na emergência oftalmológica com sintomas e sinais de ceratite infecciosa e que concordaram com o procedimento de raspado de córnea para obtenção de material para investigação laboratorial. A partir dos achados do exame de biomicroscopia com o uso do colírio de fluoresceína a ceratite infecciosa foi definida como: presença de infiltrado inflamatório estromal associado a lesão de córnea. A lesão de córnea poderia ser uma úlcera (defeito epitelial mais perda de tecido estromal); ou apenas defeito epitelial ou apenas erosões puntiformes do epitélio.

##### 3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com diagnóstico de ceratite herpética sem suspeita de *Acanthamoeba*, aqueles com perfuração no momento do diagnóstico, os casos de úlceras neurotróficas e úlceras auto-imunes, os casos em que a coleta de raspado de córnea não obedeceu o protocolo do estudo, e os casos em que os dados foram preenchidos de forma incompleta.

### 3.2 EXAME OFTALMOLÓGICO

Informações detalhadas sobre cada paciente foram obtidas pelo preenchimento de uma ficha clínica no momento do atendimento (APÊNDICE 1). Dados como idade, gênero, local de habitação e trabalho, história atual da doença, tratamentos em curso, presença de comorbidades oculares, história de trauma ocular recente e uso de lente de contato foram investigados.

Exame biomicroscópico foi realizado para identificar as características da ceratite, como tamanho da úlcera e a presença ou ausência de hipópio. O tamanho da úlcera foi registrado em mm<sup>2</sup>, e calculado pelo produto das 2 maiores dimensões do defeito epitelial. (APÊNDICE 1). Quando não havia defeito epitelial atribuíamos zero ao tamanho da úlcera.

### 3.3 EXAME LABORATORIAL – MICROBIOLOGIA

#### 3.3.1 Coleta e processamento

O médico oftalmologista atendente, após instilação de colírio anestésico, raspava as bordas da úlcera com lâmina de bisturi número 15, o material obtido era colocado em uma lâmina para posterior microscopia com coloração de Gram. Novos raspados, da mesma úlcera, eram obtidos sequencialmente e diretamente inoculados nos seguintes meios: ágar sangue, ágar chocolate, ágar Sabourad dextrose, BHI (infusão cérebro-coração) e tioglicolato. Nos pacientes com suspeita de ceratite por *Acanthamoeba sp* um novo raspado da úlcera era realizado e semeado em ágar não nutriente e no tubo Falcon® contendo tampão fosfato-salino (PBS) para realização de teste de reação em cadeia da polimerase PCR) para pesquisa de *Acanthamoeba sp*. Para cada meio de cultura um novo raspado da mesma lesão da córnea era realizado. Todas as amostras de raspado de córnea coletadas nas lâminas e nos meios de cultura foram examinadas no mesmo laboratório de microbiologia.

No laboratório as placas ágar não nutriente eram semeadas com uma camada de *Escherichia coli*. O tubo Falcon® com a amostra da córnea era armazenado em congelador no laboratório de microbiologia. As culturas foram processadas de acordo com a rotina do laboratório (QUADRO 1). Foi definido como resultado positivo na microscopia a presença de estruturas coradas ou não pelo método de Gram com

morfologia característica de bactérias (cocos, bacilos, cocobacilos), fungos (hifas, leveduras) e trofozoítos ou citos sugestivos de *Acanthamoeba*. Foi definido como resultado positivo as culturas de bactérias e fungos em que se observou crescimento de micro-organismos ao longo da linha de inoculação. Nos casos de culturas de *Acanthamoeba sp.*, as placas de ágar não nutriente foram observadas com lentes objetivas com aumento de 10 vezes procurando por cistos e trilhas de trofozoítos ao longo da linha de inoculação.

As bactérias foram identificadas pelo sistema automatizado Vitek® 2 compact. Os fungos foram identificados pela técnica de microcultivo em lâmina.

QUADRO 1 – PROTOCOLO DE CULTURAS

Meio de cultura	Condições de incubação	tempo
Ágar chocolate	35°C em atmosfera de CO <sub>2</sub>	2 dias
Ágar sangue, Caldo BHI e Caldo tioglicolato	35°C em atmosfera ambiente	2 dias
Ágar não nutriente com E. coli.	30°C em atmosfera ambiente	21 dias
Ágar Sabourad dextrose	25°C em atmosfera ambiente	30 dias

BHI: infusão cérebro-coração (*brain-heart infusion*)

Fonte: A autora (2016).

### 3.4 EXAME LABORATORIAL – AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Foi realizada Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*, PCR) para detecção de *Acanthamoeba sp.*, mais especificamente, uma variação desta técnica denominada *Nested PCR*. As amostras de raspado de córnea, em tubo Falcon® contendo tampão fosfato-salino (PBS), que chegavam ao laboratório de microbiologia eram congeladas à -20°C. A cada 30 dias levavam-se as amostras acumuladas para análise no laboratório de biologia molecular Genoprimer (Laboratório privado especializado em diagnóstico através de detecção de ácido nucleico). No laboratório Genoprimer as amostras eram recebidas, armazenadas e processadas em um limite máximo de 24 horas.

### 3.4.1 Extração de DNA

O primeiro passo realizado era a extração de ácidos nucleicos totais com o *kit* de extração NucliSENS®, método baseado na utilização de sílica magnetizada. Descongelavam-se as amostras de raspado de córnea à temperatura ambiente. Seguia-se com a separação de 200 µL da amostra em um microtubo e adicionava-se 1ml de tampão de lise. Esse produto era incubado à temperatura ambiente por 10 minutos, agitando-se a cada 2 minutos. Adicionava-se 50 µL de sílica magnetizada, agitando brevemente e incubava-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Após colocar os microtubos em estante magnetizada, o sobrenadante era aspirado. Retiravam-se os microtubos da estante magnetizada, adicionava-se a solução tampão 1, agitava-se e colocava-se novamente na estante magnetizada, aspirava-se o sobrenadante. Este procedimento era repetido mais uma vez com a solução tampão 1, depois 2 vezes com a solução tampão 2 e uma vez com a solução tampão 3. Por fim, adicionava-se 75 µL da solução tampão 3, incubava-se no termobloco à temperatura de 60°C por 5 minutos, agitando o microtubo no vórtex a cada 2 minutos. Os ácidos nucleicos extraídos eram armazenados à -20°C no congelador.

### 3.4.2 Nested-PCR

Após extração do DNA realizavam-se os procedimentos de *Nested* PCR. O quadro 2 descreve a sequência dos nucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na reação.

QUADRO 2 - NUCLEOTÍDEOS INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *ACANTHAMOEBA SP*

Gene	Nome do nucleotídeo iniciador	Sequência 5' - 3'
<sup>1</sup> <i>Acanthamoeba sp.</i> gene 18S rRNA	Acant-F900 <sup>2</sup> ( <i>forward</i> <sup>3</sup> )	CCCAGATCGTTTACCGTGAA
	FOF2 ( <i>forward</i> )	TTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG
	ROF ( <i>reverse</i> <sup>4</sup> )	CAACGTCTCCTAATCGCTG

<sup>1</sup> Sequência de referência para desenho dos nucleotídeos iniciadores (*primers*):

GenBank:JQ418506.1 *Acanthamoeba sp.* FL1 18S ribosomal RNA gene

<sup>2</sup> Nucleotídeo iniciador (*primer*) obtido da publicação de Qvarnstrom *et al*, 2006

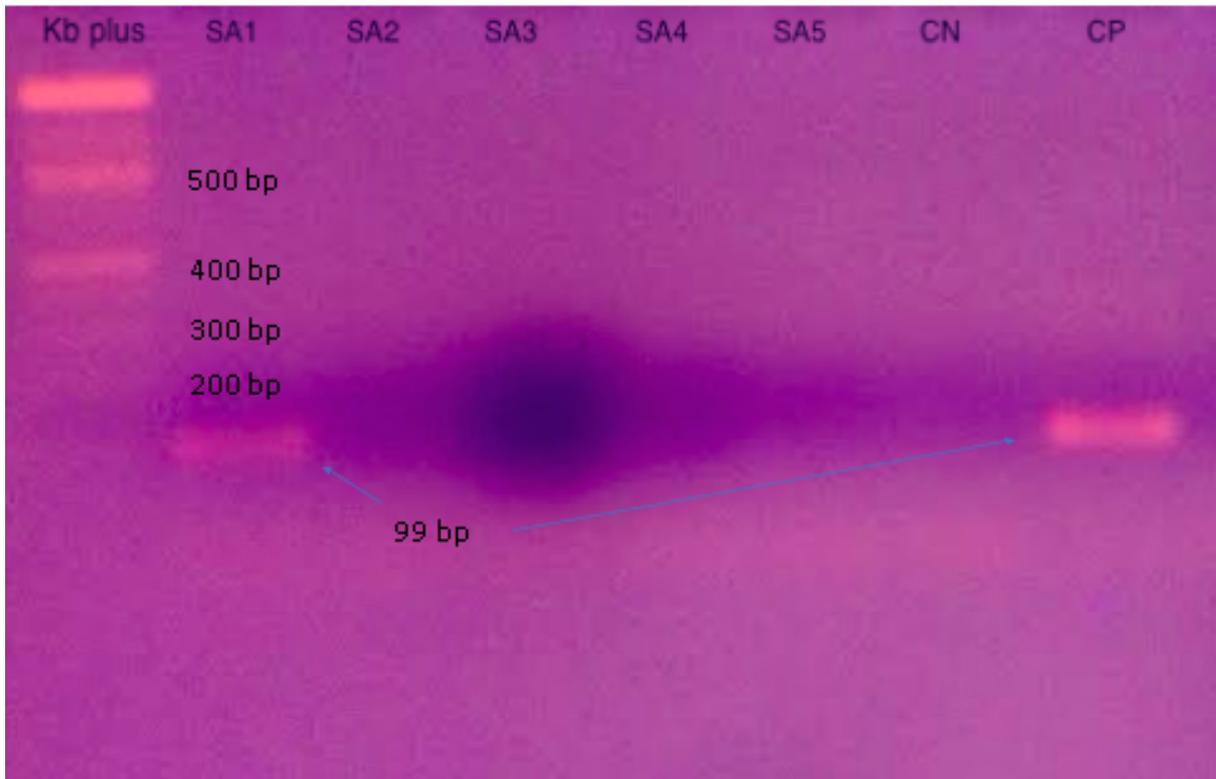
<sup>3</sup> *forward*: anterógrado;

<sup>4</sup> *reverse*: retrógrado.

Fonte: A autora (2016).

Duas *mix* de reações eram preparadas. A *mix* de reação 1 era composta de 0.5  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA Polymerase Thermo Scientific®, 2.0  $\mu\text{L}$  de tampão, 0.5  $\mu\text{M}$  do nucleotídeo iniciador Acant-F900, 0.5  $\mu\text{M}$  do nucleotídeo iniciador ROF (*reverse*), 1 mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), 2mM de dNTP, 5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA extraído, adicionando-se água deionizada para um volume final de 20  $\mu\text{L}$  de reação. Na *mix* de reação 2 o nucleotídeo iniciador Acant-F900 é substituído pelo nucleotídeo iniciador Acant-FOF2 (*forward*) na mesma concentração, mantendo-se a concentração dos demais reagentes da *mix* 1. A primeira PCR, *mix* 1, foi realizada no termociclador Veriti®. Condições de termociclagem: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, seguido por 1 ciclo de 72°C por 7 minutos e mantida temperatura à 10°C. Após o término da ciclagem, os microtubos de reação 1 eram abertos cuidadosamente e 2  $\mu\text{L}$  eram transferidos para os tubos contendo a *mix* de reação 2. Os tubos eram posicionados no termociclador Veriti® para uma nova termociclagem idêntica à primeira. O produto de PCR obtido ao final da segunda reação de PCR era de 99 pares de bases; conforme esperado tomando-se como referência a sequência GenBank: JQ418506.1. Ao final da termociclagem, os microtubos eram retirados do termociclador e realizava-se a eletroforese horizontal em gel de agarose utilizando-se 5  $\mu\text{L}$  da última reação de PCR. Ao final da corrida eletroforética seguiu-se com a leitura do gel no transiluminador ultra-violeta. O gel era fotografado com câmera digital (FIGURA 1).

FIGURA 3 –FOTOGRAFIA DE GEL DE AGAROSE OBSERVADO SOB LUZ ULTRA-VIOLETA. RESULTADOS DA PESQUISA DE *ACANTHAMOEBA SP.* DE ALGUNS PACIENTES DO ESTUDO



*Kb plus*: marcador de massa molecular (DNA); bp: número de pares de bases, (do inglês, *base pair*); SA1: amostra positiva para *Acanthamoeba sp.*; SA2-SA5: amostras negativas; CN: controle negativo e CP: controle positivo.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos foram expressos em médias ou medianas conforme a distribuição, a qual foi representada como desvio padrão (DP) para as médias e valores mínimos e máximos para mediana. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20. Para a determinação de pontos de corte para a e o tamanho da úlcera, associados aos resultados dos exames de cultura, foram ajustadas curvas ROC. Para avaliação da associação entre duas variáveis qualitativas foi considerado o teste exato de Fisher. A comparação dos grupos definidos pelos resultados dos exames de cultura (negativo ou positivo), em relação a variáveis quantitativas, foi feita usando-se o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A condição de normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

## 4 RESULTADOS

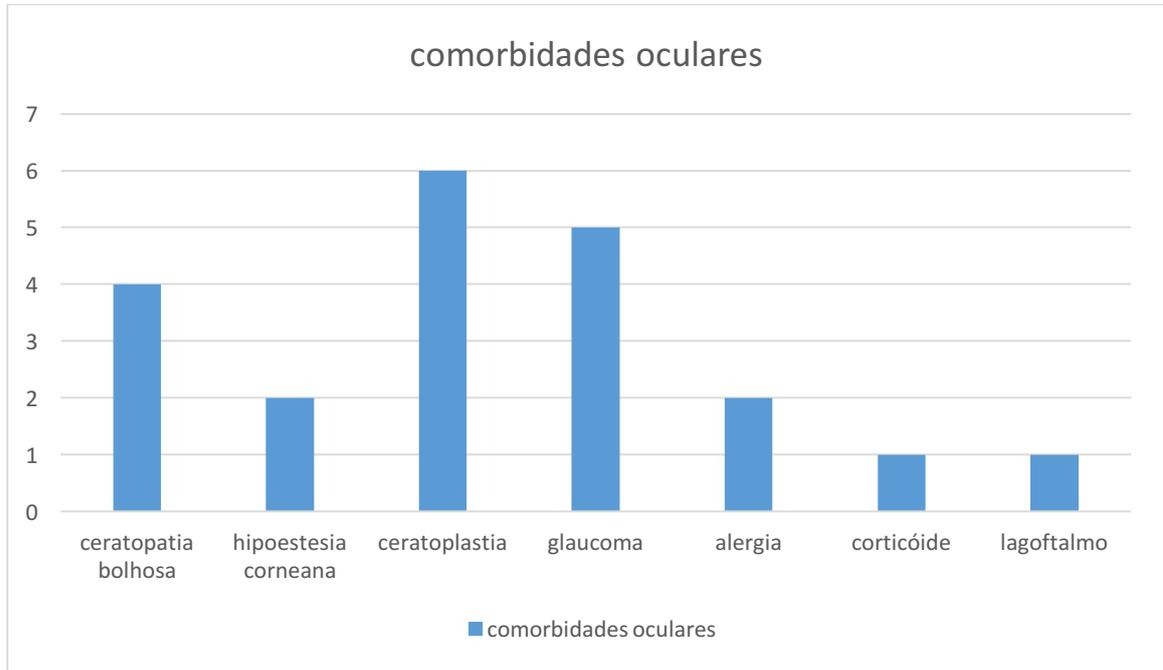
### 4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Setenta e cinco pacientes foram estudados. Todos os 75 pacientes incluídos apresentavam ceratite infecciosa unilateral. A média de idade foi de 45,1 anos (3 a 89 anos) (DP=18,7), com preponderância do gênero masculino (58/75; 69%). Dezoito participantes (24,3%) eram provenientes de área rural. Sessenta e oito por cento (51/75) estava usando colírio de antibiótico no momento do diagnóstico; 17% (13/75) estavam em uso de corticoide tópico e 8% (6/75) estavam em uso de ambos.

### 4.2 FATORES DE RISCO

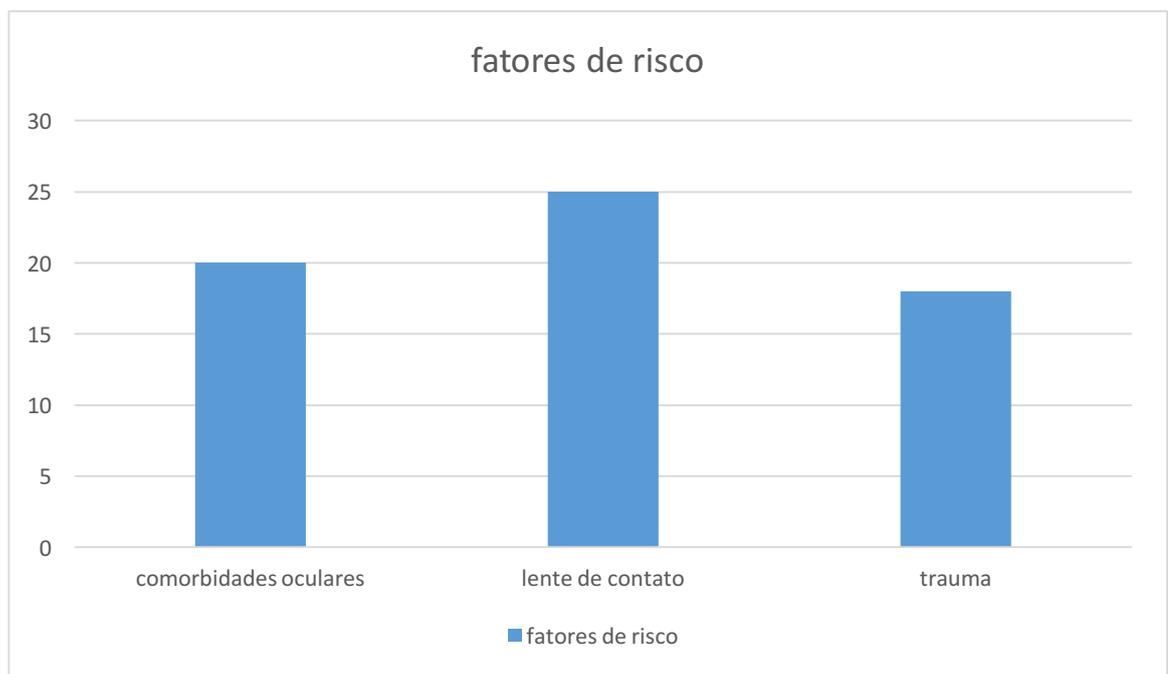
A presença de comorbidades oculares foi registrada em 26,7% dos pacientes (GRÁFICO 1). A ceratopatia bolhosa observada em 4 pacientes e a hipoestesia corneana, observada em 2, foram agrupadas como doença de superfície ocular, somando um total de 6 casos. Foram também registrados casos de ceratoplastia penetrante (6); glaucoma (5); ceratoconjuntivite alérgica (2); uso crônico de corticoide tópico (1) e lagofalmo (1). Quanto ao uso de lente de contato (LC), foram observados 25 casos (33,3%). Dezoito pacientes (24%) relataram história de trauma ocular recente. (GRÁFICO 2)

GRÁFICO 1- DISTRIBUIÇÃO DAS DIFERENTES PATOLOGIAS OCULARES IDENTIFICADAS NOS PACIENTES DO ESTUDO.



Fonte: A autora (2016).

GRÁFICO 2- DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES DE RISCO NOS PACIENTES DO ESTUDO



Fonte: A autora (2016).

### 4.3 EXAME BIOMICROSCÓPICO

O tamanho médio das úlceras foi de 9,72mm<sup>2</sup> (0 a 100m<sup>2</sup>). Um total de 9 pacientes não apresentavam defeito epitelial, nesses casos o tamanho da úlcera foi registrado como 0mm<sup>2</sup>. Ao exame, hipópio estava presente em 20 pacientes (26,7%).

### 4.4 RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS E TAXA DE POSITIVIDADE DAS CULTURAS

Microscopia positiva foi obtida em 25 de 73 pacientes (32%). Em dois pacientes não foi possível realizar a microscopia devido quantidade insuficiente de material na lâmina. (TABELA 1).

TABELA 1 – RESULTADOS DA MICROSCOPIA

<b>ACHADOS</b>	<b>Número</b>
Cocos Gram-positivos	3
Bacilos Gram-positivos	1
Bacilos Gram-negativos	11
Hifas fúngicas	8
Cistos de <i>Acanthamoeba</i>	2
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>

Fonte: A autora (2016).

Todos os pacientes tiveram amostras semeadas em placas de ágar sangue e/ou ágar chocolate, tioglicolato e/ou BHI (infusão cérebro-coração), em 72 casos as amostras de raspado de córnea foram semeados em placas de ágar Sabourad e 43 amostras foram inoculadas em ágar não nutriente para pesquisa de *Acanthamoeba*. Em dois pacientes não foi realizada a semeadura em ágar Sabourad por falta de cooperação com o exame. Em ambos os casos a suspeita era de ceratite bacteriana, e a cultura foi positiva para bactéria. A taxa de positividade das culturas foi de 41,3% (31/75). Os patógenos mais encontrados nas culturas foram: bactérias Gram-positivas (10); fungos (10), bactérias Gram-negativas (6) e *Acanthamoeba* (5) (TABELA 2).

TABELA 2 – RESULTADOS DAS CULTURAS E DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS DE MICROORGANISMOS, GÊNEROS E ESPÉCIES IDENTIFICADAS.

Microrganismos	Número	% de 31 culturas positivas
<b>Bactérias Gram-positivas</b>	<b>10</b>	<b>(32%)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	3	
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>viridans</i>	1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	
Bacilos Gram-positivos	1	
<b>Cultura mista de bactérias</b>	<b>1</b>	<b>(3%)</b>
<b>Bactérias Gram-negativas</b>	<b>6</b>	<b>(19%)</b>
<i>Pseudomonas sp.</i>	3	
<i>Serratia marcescens</i>	2	
<i>Moraxella sp.</i>	1	
<b>Fungos</b>	<b>10</b>	<b>(32%)</b>
<i>Fusarium sp.</i>	3	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	
<i>Aspergillus niger</i>	2	
<i>Cladosporium sp.</i>	1	
<i>Acremonium sp.</i>	1	
<i>Phoma sp.</i>	1	
Leveduras	1	
<b>Cultura mista de bactérias e fungos</b>	<b>1</b>	<b>(3%)</b>
<i>Bacilo gram-positivo e Aspergillus niger</i>	1	
<b>Amoeba</b>	<b>5</b>	<b>(16%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>100%</b>

Fonte: A autora (2016).

Foram realizados testes de pesquisa de *Acanthamoeba sp.* por PCR (reação em cadeia da polimerase). Dos 43 pacientes com suspeita de *Acanthamoeba sp.* que coletaram material para cultura, 26 testes de PCR foram realizados. Quando comparamos os resultados do PCR com os resultados das culturas para *Acanthamoeba sp.* encontramos: 20 casos (76,9%) com resultados negativos nos dois testes, 5 casos (19,2%) com resultados positivos nos dois testes. Somente 1 caso (3,8%) com resultado negativo na cultura e positivo no PCR. Houve concordância geral entre os testes de 96,2% dos casos, e discordância em 3,8%. O coeficiente de concordância de Kappa estimado foi de 0,89 com intervalo de confiança de 95% dado por: 0,67 a 1. Este resultado indica uma concordância alta entre os dois testes (TABELA 3).

TABELA 3 - CONCORDÂNCIA ENTRE OS TESTES DE CULTURA E PCR NA PESQUISA DE *ACANTHAMOEBA SP*

Cultura <i>Acanthamoeba</i>	PCR*		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	20	1	21
	76,9%	3,8%	80,8%
Positivo	0	5	5
	0,0%	19,2%	19,2%
Total	20	6	26

\* PCR, reação em cadeia da polimerase

Fonte: A autora (2016).

#### 4.5 COMPARAÇÃO DA POSITIVIDADE DAS CULTURAS NOS SUBGRUPOS DE PACIENTES COM CERATITE INFECCIOSA

A idade média entre pacientes com culturas positivas foi de 48,1 anos (DP=17,7). A idade média entre pacientes com culturas negativas foi de 43 anos (DP=19,3), sem diferença estatística entre os dois grupos ( $p=0,245$ ). Quando comparamos a positividade das culturas entre homens e mulheres, também não encontramos diferença estatística: 44,2% de culturas positivas versus 34,8%, respectivamente ( $p=0,612$ ). Pacientes provenientes de área rural tiveram 55,6% de

culturas positivas versus 35,7% entre os provenientes de área urbana, sem diferença estatística ( $p=0,172$ ).

A taxa de culturas positivas entre pacientes com comorbidade ocular foi de 50% versus 38,2% entre pacientes sem comorbidades, sem diferença estatística ( $p=0,430$ ). Apesar disso, quando selecionamos apenas culturas bacterianas observamos uma associação significativa entre a presença de comorbidades e a taxa de culturas bacterianas positivas (50% de culturas bacterianas positivas no grupo com comorbidades versus 12,7% no grupo sem comorbidades,  $p=0,001$ ). Uso de lente de contato e história de trauma ocular não foram fatores associados a culturas positivas ( $p=1$ ;  $p=0,584$ , respectivamente). No entanto, quando selecionamos apenas as culturas para fungos observamos uma associação significativa entre história de trauma e cultura para fungo positiva (33,3% de culturas fúngicas positivas no grupo com história de trauma versus 7,4% no grupo sem trauma;  $p=0,012$ ).

Dos 51 pacientes em uso de colírio de antibiótico antes da cultura, 31,4% tiveram resultados de cultura positivos, comparado com 62,5% de resultados positivos entre os pacientes que não usaram antibióticos, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p=0,013$ ). Entre os pacientes em uso de colírio de corticoide antes das culturas, 76,9% obtiveram culturas positivas versus apenas 33,9% entre os que não usaram, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p=0,006$ ).

O tamanho médio das úlceras foi de  $12,92\text{mm}^2$  no grupo de pacientes com cultura positiva (0 a  $100\text{mm}^2$ ) e de  $7,50\text{mm}^2$  no grupo com cultura negativa (0 a  $31,5\text{mm}^2$ ) sem diferença estatística ( $p=0,185$ ). O ajuste da curva ROC encontrou que o valor de corte para o tamanho da úlcera que está estatisticamente associado com a positividade das culturas é  $3,62\text{mm}^2$ . O grupo de pacientes com úlceras maiores que  $3,62\text{mm}^2$  teve 53,3% de culturas positivas versus 23,3% entre os pacientes com úlceras menores ou igual a  $3,62\text{mm}^2$  com diferença estatística ( $p=0,016$ ). A presença de hipópio mostrou uma tendência de associação com culturas bacterianas positivas, porém sem significância estatística; 40% no grupo com hipópio versus 16,4% no grupo sem hipópio ( $p=0,058$ ). As taxas de culturas positivas nos subgrupos de pacientes com CI, bem como a significância estatística é mostrada na TABELA 4.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DA TAXA DE POSITIVIDADE DAS CULTURAS EM SUBGRUPOS DE PACIENTES COM CERATITE INFECCIOSA

Características dos pacientes no diagnóstico		Número	% culturas positivas (n=31)	Valor de p
<b>Gênero</b>				
masculino		52	44%	p=0,612
feminino		23	35%	
<b>Local de residência</b>				
área urbana		57	36%	p=0,172
área rural		18	56%	
<b>Tamanho da úlcera</b>				
≤3,62mm <sup>2</sup>		30	23%	<b>p=0,016</b>
> 3,62mm <sup>2</sup>		45	53%	
<b>Hipópio</b>				
presente		20	55%	p=0,188
ausente		55	36%	
<b>Comorbidade ocular</b>				
presente		20	50%	p=0,430
ausente		55	39%	
<b>Fatores de risco</b>				
trauma	presente	18	33%	p=0,584
	ausente	57	44%	
lente de contato	presente	25	40%	p=1
	ausente	50	42%	
<b>Tratamento em curso</b>				
antibióticos	presente	51	31%	<b>p=0,013</b>
	ausente	24	62.5%	
corticóide	presente	13	77%	<b>p=0,006</b>
	ausente	62	34%	

Fonte: A autora (2016).

## 5 DISCUSSÃO

Dos 75 pacientes com ceratite infecciosa analisados nesse estudo 31 (41%) apresentaram resultado positivo nas culturas, o que está de acordo com os 32% a 79% de positividade relatado em outras séries publicadas. (FEILMEIER et al., 2010; FURLANETTO et al., 2010; IBRAHIM et al., 2011; LASPINA et al., 2004; LIN et al., 2012; MARUJO et al., 2013; NG et al., 2015; OTRI et al., 2013). (QUADRO 3).

QUADRO 3 - TAXA DE POSITIVIDADE DAS CULTURAS EM DIFERENTES PUBLICAÇÕES AO REDOR DO MUNDO

<b>Autor e ano</b>	<b>Amostra</b>	<b>Região</b>	<b>Positividade</b>
Laspina, 2004	660	Assunção, Paraguai	79%
Furlanetto, 2010	65	Uberlândia/MG, Brasil	49%
Feilmeier, 2010	468	Kathmandu, Nepal	40%
Ibrahim, 2011	118	Ribeirão Preto/SP, Brasil	62%
Lin, 2012	6967	Madurai, Índia	58%
Otri, 2012	127	Nottingham, UK	41 %
Marujo, 2013	2049	São Paulo, Brasil	71%
Ng, 2015	347	Hong Kong, China	32%

Fonte: A autora (2016).

A variabilidade das taxas de positividade das culturas entre os estudos pode em parte ser explicada pelas diferenças na metodologia utilizada em cada pesquisa, como por exemplo, os critérios de inclusão e exclusão, o local do raspado ocular para obtenção da amostra e os meios de cultura utilizados. Os estudos com altas taxas de positividade incluíram na análise culturas de amostras de raspado de

conjuntiva (LASPINA et al., 2004), ou mesmo cultura de lente de contato e outros materiais (MARUJO et al., 2013).

Os agentes isolados nas culturas foram predominantemente bactérias (54%), seguidos por fungos filamentosos (29%) e *Acanthamoeba sp.* (16%). As bactérias são os patógenos mais comumente isolados pela cultura na maioria das publicações (MARANGON; MILLER; ALFONSO, 2004; MARUJO et al., 2013; OTRI et al., 2013), porém os fungos superam as bactérias em algumas publicações, o que ocorre devido ao clima quente e a atividade predominantemente agrícola de algumas regiões (FEILMEIER et al., 2010; FURLANETTO et al., 2010). (QUADRO 4).

QUADRO 4 - AGENTES MICROBIANOS MAIS ISOLADOS EM DIFERENTES PUBLICAÇÕES AO REDOR DO MUNDO

Continente/país	Cidade	Tipos de microrganismos	Microrganismos mais prevalentes
América do sul Brasil	Marujo, 2013, São Paulo	80% bactérias	<i>Staphylococcus sp.</i>
		7% fungos	<i>Fusarium sp.</i>
		6% amoeba	
	Furlanetto, 2010, Minas Gerais	56,25% fungos 43,75% bactérias	<i>Fusarium sp.</i> <i>S. pneumoniae</i>
Estados Unidos	Maragon, 2004, Miami	47,5% GN	<i>Pseudomonas sp.</i>
		28,7% GP	<i>Staphylococcus sp.</i>
		15,8% fungos	<i>Fusarium sp.</i>
		2% amoebas	
Europa, Reino Unido	Otri, 2012, Nottingham, UK	49% GP	<i>Staphylococcus sp.</i>
		34% GN	<i>Pseudomonas sp.</i>
		16,9% amoeba	
Asia, Nepal	Feilmeier, 2010, Kathmandu	61% fungos	<i>Aspergillus sp.</i>
		35% GP	<i>S. pneumoniae</i>
		4% GN	<i>Pseudomonas sp.</i>
GP, gram-positivo; GN, gram-negativo			

Fonte: A autora (2016).

A taxa de 16 % de positividade das culturas de *Acanthamoeb sp.* foi similar a encontrada por OTRI em seu estudo no Reino Unido (OTRI et al., 2012). No entanto, foi maior que a relatada pela maioria das outras publicações. Em estudo brasileiro, com dados de 4 anos de culturas, a grande maioria dos isolados foram bactérias (80%); seguidos por fungos (7%) e *Acanthamoeba sp.* (6%) (MARUJO et al., 2013). LIN et al. (2012) encontraram 1,3% na Índia e Marangon, Miller e Alfonso, (2004) relataram 2% nos Estados Unidos. A alta taxa de culturas positivas para *Acanthamoeba* em nosso estudo, deve-se ao fato de a pesquisa ser realizada em

hospitais terciários, sendo a maioria pacientes referidos por oftalmologistas gerais, já em tratamento com antibióticos, o que seleciona os casos de ceratites fúngicas e amebianas. Algumas publicações com grandes amostras de pacientes não incluíram pesquisa de *Acanthamoeba sp.* nos exames laboratoriais. (LASPINA, et al. 2004; FEILMEIER et al., 2010). As culturas para *Acanthamoeba sp.* não fazem parte da rotina dos laboratórios gerais em nosso país, as placas de ágar não nutriente foram preparadas especialmente para este estudo. Esse tipo de cultura é trabalhosa, exige perícia técnica, tem alta especificidade, porém baixa sensibilidade. (BOGGILD et al., 2009). A taxa de 16% de culturas positivas para *Acanthamoeba sp.* evidencia a importância de incluir os exames de pesquisa desse patógeno na rotina dos laboratórios.

Dos 43 casos em que se realizaram culturas para *Acanthamoeba sp.*, 26 também realizaram PCR. A concordância encontrada entre os dois exames nos 26 casos, foi alta (coeficiente de Kappa de 0,89). O número limitado de casos com teste de PCR desse estudo prejudicou a avaliação da sensibilidade e especificidade do PCR tendo como referência a cultura (padrão ouro). Na literatura, quando se comparam os testes de microscopia, cultura e PCR na pesquisa de *Acanthamoeba*, observar-se que a microscopia tem a pior sensibilidade, e o PCR a maior. Quanto a especificidade, a microscopia e a cultura chegam a 100%, enquanto que o PCR fica em torno de 90% (BOGGILD et al., 2009). Portanto a combinação dos testes de Cultura e PCR na pesquisa de *Acanthamoeba sp.* é a melhor escolha, obtendo assim a especificidade do primeiro com a agilidade e sensibilidade do segundo.

A associação entre tamanho da úlcera e positividade da cultura foi descrita por Morlet et al. Esse autor observou que úlceras maiores que 5mm<sup>2</sup> tinham chance 2,68 maiores de ter um resultado positivo de cultura (IC 95% 1.80-3.99; p=0,001). (MORLET; MINASSIAN; BUTCHER, 1999). Outras publicações, comparando tamanho de infiltrado e positividade das culturas, não encontraram associação significativa. (BHADANGE, et al., 2015; OTRI et al., 2012). Nós utilizamos a medida do defeito epitelial corado com fluoresceína ao invés da medida do infiltrado. Encontramos que úlceras maiores que 3,62 mm<sup>2</sup> estão associadas com resultado de cultura positiva (p=0,016). Existe uma relação entre tamanho da úlcera e gravidade da ceratite infecciosa. Por isso, a recomendação da Academia Americana de Oftalmologia de sempre coletar material para exames microbiológicos quando as úlceras são grandes. (JONES, 1979). Considerando que 68% dos pacientes já

estavam sendo tratados no momento do estudo, úlceras maiores podem representar casos com infecção ativa, com uma carga grande de microrganismos, e, portanto, uma maior probabilidade de recuperar no exame de cultura. Por outro lado, úlceras menores podem representar casos já em remissão, com menor quantidade de microrganismos e menor probabilidade de crescer na cultura.

Pacientes em uso de antibióticos tópicos antes da coleta de material da córnea foram mais propensos a ter um resultado de cultura negativo [OR: 3,65 (IC95%: 1,32 – 10,07)]. Os mesmos achados foram publicados por Van der Meulen et al. (2008) e Dahlgreen, Lingappan e Wilhelmus (2007). Marangon, Miller e Alfonso (2004) relatam que pacientes em uso de antibiótico eram ligeiramente mais propensos a uma cultura negativa, porém significativamente mais propensos a ter um atraso na recuperação dos patógenos. McDonnell et al. (1992) não encontraram diferença nas taxas de positividade das culturas entre pacientes tratados previamente com antibióticos e não tratados. Outras publicações relatam essa mesma conclusão. (BHADANGE et al., 2015; IBRAHIM et al., 2011; OTRI et al., 2012; NENTWICH et al., 2015). Ainda que os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos nos estudos procurem descartar outras causas de ceratite, alguns casos de ceratite não infecciosa podem estar entre as amostras selecionadas nos estudos. Esse fato pode confundir a associação entre antibióticos e cultura negativa. Além disso o pequeno tamanho da amostra desse e de outros estudos é uma limitação.

Pacientes em uso de corticoide tópico antes da coleta de material da córnea foram mais propensos a ter um resultado de cultura positivo [OR: 6,51 (IC95%: 1,62 – 21,21)]. O uso crônico de corticóide é um fator de risco bem conhecido para ceratite infecciosa. (VAN DER MEULEN et al., 2008). Dos 10 pacientes com culturas positivas que estavam usando corticoide, 5 faziam uso crônico. Por outro lado, dos 5 pacientes com cultura positiva para *Acanthamoeba*, 4 estavam sendo tratados para ceratite por *herpes vírus*, e desses, 3 estavam usando corticóide. A ceratite por *herpes vírus* é um diagnóstico diferencial de ceratite por *Acanthamoeba*, os corticoides são utilizados em algumas formas clínicas de ceratite por vírus herpes. O uso de colírio de corticoides sem o uso de colírios amoebicidas é causa de mau prognóstico nos casos de ceratite por *Acanthamoeba sp.* (DART; SAW; KILVINGTON, 2009). Os corticoides promovem imunossupressão local, prejuízo da fagocitose, e aumento de crescimento do patógeno. É crucial excluir infecção por *Acanthamoeba* antes de iniciar corticoide,

principalmente em pacientes usuários de lente de contato com diagnóstico de ceratite herpética.

Analisando apenas as culturas positivas para crescimento de bactérias, observamos uma associação entre presença de comorbidade ocular e culturas bacteriana positiva. As bactérias gram-positivas são os micro-organismos predominantes na microbiota da conjuntiva e das pálpebras (RAPUANO et al., 2000). As comorbidades oculares enfraquecem os mecanismos naturais de defesa, ocorrendo a infecção por micro-organismos da própria microbiota ocular, que são predominantemente bactérias.

Avaliando apenas as culturas positivas para fungos, observamos uma associação entre história de trauma ocular e cultura positiva para fungos. Essa relação está bem estabelecida na literatura, em especial nos casos de trauma com material vegetal. (MÜLLER; KARA-JOSÉ; DE CASTRO, 2012; NENTWICH et al., 2015).

Nosso estudo teve algumas limitações. Não incluímos a coloração de Ziehl-Neelsen e o meio de Lowenstein-Jensen para pesquisa de micobactérias. Apesar de entre os pacientes do estudo não ter havido a suspeita clínica de ceratite por micobactéria, o tecido ocular de um paciente que teve perda do globo pela infecção, evidenciou micobactéria atípica no exame anatomopatológico. Além disso, o tempo de incubação das placas de ágar sangue e chocolate foi de apenas 48 horas, conforme o protocolo de rotina do laboratório de microbiologia do Hospital Evangélico. O estudo de Marangon mostra que 87% das culturas são positivas nas primeiras 48 horas, porém nos casos de pacientes em uso de antibiótico antes da coleta há um atraso na recuperação de patógenos. (MARANGON; MILLER; ALFONSO, 2004). Outro ponto foi não realizar o exame de PCR para pesquisa de herpes virus. Em geral a apresentação clínica das ceratites herpéticas é bastante característica, porém algumas formas atípicas podem ser confundidas com outras etiologias como bactérias, fungos e amoeba.

## 6 CONCLUSÃO

- A taxa de positividade das culturas foi de 41,3%.
- O tratamento da ceratite infecciosa com colírios de antibiótico antes da coleta está associado com maior probabilidade de cultura negativa.
- O tratamento com corticoide antes da coleta do raspado de córnea está associado com maior probabilidade de cultura positiva.
- Úlceras maiores que 3,62mm<sup>2</sup> tem maior probabilidade de cultura positiva.
- Os agentes mais encontrados nas culturas foram: bactérias Gram-positivas (32%); fungos (32%), bactérias Gram-negativas (19%) e *Acanthamoeba* (16%)
- Observamos uma alta concordância entre os testes de cultura e PCR na pesquisa de *Acanthamoeba*.

## 7 PERSPECTIVAS

- Correlacionar positividade das culturas com prognóstico de ceratite infecciosa.
- Identificar pela técnica de PCR as espécies de *Acanthamoeba* e correlacionar com o quadro clínico da ceratite.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, L. et al. Infectious Post-LASIK Crystalline Keratopathy Caused by Nontuberculous Mycobacteria. **Cornea**, New York, v.21, n.4, p. 426-429, 2002.
- BHADANGE, Y. et al. Comparison of culture-negative and culture-positive microbial keratitis: cause of culture negativity, clinical features and final outcome. **British Journal of Ophthalmology**, London, v,99, p. 1498-1502, 2015.
- BHARATHI, M,J. et al. Aetiological diagnosis of microbial keratitis in South India - a study of 1618 cases. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v. 20, n. 1, p. 19–24, 2002.
- BOGGILD, A. K. et al. Laboratory diagnosis of amoebic keratitis: comparison of four diagnostic methods for different types of clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 5, p. 1314-1318, 2009.
- BUEHLER, P. O. The increased risk of ulcerative keratitis among disposable soft contact lens users. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 110, n. 11, p. 1555, 1992.
- BURTON, MJ. Prevention, treatment an rehabilitation. **Community Eye Health**, London, v. 22, n. 71, p. 33-35, 2009.
- CARVALHO, F. R. S. et al. Twenty years of acanthamoeba keratitis. **Cornea**, New York, v. 28, n. 5, p. 516–9, 2009.
- DAHLGREN, M. A.; LINGAPPAN, A.; WILHELMUS, K. R. The clinical diagnosis of microbial keratitis. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 143, n. 6, p. 940–944, 2007.
- DART, J. K. G.; SAW, V. P. J.; KILVINGTON, S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 148, n. 4, p. 487-499.e2, 2009.
- ELEINEN, K. G. A. et al. Polymerase chain reaction-guided diagnosis of infective keratitis - a hospital-based study. **Current Eye Research**, London, v. 37, n. 11, p. 1005–1011, 2012.

ERIE, J. C. et al. Incidence of ulcerative keratitis in a defined population from 1950 through 1988. **Archives of ophthalmology**, Chicago, v. 111, n. 12, p. 1665–1671, 1993.

FEILMEIER, M. R. et al. Etiologic diagnosis of corneal ulceration at a tertiary eye center in Kathmandu, Nepal. **Cornea**, New York, v. 29, n. 12, p. 1380-1385, 2010.

FREITAS, D. et al. An Outbreak of Mycobacterium Chelonae Infection after LASIK. **Ophthalmology**, v.110, p.276-285, 2003.

FURLANETTO, R. L. et al. Epidemiology and etiologic diagnosis of infectious keratitis in Uberlandia, Brazil. **European Journal of Ophthalmology**, Milano, v. 20, n. 3, p. 498–503, 2010.

GONZALES, C. A. et al. Incidence of corneal ulceration in Madurai district, South India. **Ophthalmic epidemiology**, v. 3, n. 3, p. 159–66, 1996.

GIFFORD, S. R. The treatment of corneal infections. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 31, n. 5, p. 527–531, 1934.

HENRY, C. R. et al. Infectious keratitis progressing to endophthalmitis: a 15-year study of microbiology, associated factors, and clinical outcomes. **Ophthalmology**, v. 119, p.2443-2449, 2012.

IBRAHIM, M. M. et al. Epidemiology and medical prediction of microbial keratitis in southeast Brazil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 7–12, 2011.

JONES, D. B. Bacterial keratitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 71–77, 1979.

KIM, E. et al. Prospective comparison of microbial culture and polymerase chain reaction in the diagnosis of corneal ulcer. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 146, n. 5, 2008.

KRACHMER, J.H; MANNIS, M.J.; HOLLAND, E. J. (Ed.). **Cornea**. 2.ed. Philadelphia: Elsevier, 2005.

KUMAR, R. L.; CRUZAT, A.; HAMRAH, P. Current state of in vivo confocal microscopy in management of microbial keratitis. **Seminars in Ophthalmology**, Orlando, v. 25, n. 5–6, p. 166–170, 2011.

LASPINA, F. et al. Epidemiological characteristics of microbiological results on patients with infectious corneal ulcers: a 13-year survey in Paraguay. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Berlin, v. 242, n. 3, p. 204–209, 2004.

LIESEGANG, T. J. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. **Cornea**, New York, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2001.

LIN, C. C. et al. Seasonal trends of microbial keratitis in South India. **Cornea**, New York, v. 31, n. 10, p. 1123–1127, 2012.

MALIHI, M. et al. Infectious keratitis-associated endophthalmitis. **Retina**, Philadelphia, v. 0, n. 0, p.1-5, 2016.

MARANGON, F. B.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. Impact of prior therapy on the recovery and frequency of corneal pathogens. **Cornea**, New York, v. 23, n. 2, p. 158–164, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075885>>..

MARUJO, F. I. et al. Distribuição das ceratites infecciosas em hospital terciário no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 76, n. 6, p. 370–373, 2013.

MATTHEWS, T. D. Risks of keratitis and patterns of use with disposable contact lenses. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 110, n. 11, p. 1559, 1992.

MAUBON, D. et al. A one-step multiplex PCR for *acanthamoeba* keratitis diagnosis and quality samples control. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 53, n. 6, p. 2866, 2012.

MAYCOCK, N. J. R.; JAYASWAL, R. Update on acanthamoeba keratitis: diagnosis, treatment, and outcomes. **Cornea**, New York, v. 35, n. 5, p. 713–720, 2016.

MCDONNELL, P. J. et al. Community care of corneal ulcers. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 114, n. 5, p. 531–538, 1992.

MORLET, N.; MINASSIAN, D.; BUTCHER, J. Risk factors for treatment outcome of suspected microbial keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 83, n. 9, p. 1027–1031, 1999.

MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N.; DE CASTRO, R. S. Perfil epidemiológico das ceratomicoses atendidas no HC-UNICAMP. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 247–250, 2012.

NENTWICH, M. M. et al. Clinical and epidemiological characteristics of infectious keratitis in Paraguay. **International Ophthalmology**, Dordrecht, v. 35, n. 3, p. 341-346, 2015.

NG, A. L. K. et al. Predisposing factors, microbial characteristics, and clinical outcome of microbial keratitis in a Tertiary Centre in Hong Kong: A 10-year experience. **Journal of Ophthalmology**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

ONG, H. S.; CORBETT, M. C. Corneal infections in the 21st century. **Postgraduate Medical Journal**, Oxford, v. 91, n. 1080, p. 565-571, 2015.

OTRI, A. M. et al. Profile of sight-threatening infectious keratitis: a prospective study. **Acta Ophthalmologica**, Copenhagen, v. 91, n. 7, p. 643–651, 2013.

PANDA, A. et al. Demographic pattern, predisposing factors and management of ulcerative keratitis: evaluation of one thousand unilateral cases at a tertiary care centre. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, Carlton, v. 35, n. 1, p. 44-50, 2007.

PANDITA, A.; MURPHY, C. Microbial keratitis in Waikato, New Zealand. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, Carlton, v. 39, n. 5, p. 393–397, 2011.

QVARNSTROM, Y. et al. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 44, n. 10, p. 3589-3595, 2006.

RAPUANO, C. J.; LUCHS J. I.; KIM, T. **Anterior segment: the requisites in ophthalmology**. St. Louis: Mosby, 2000. p. 116 e 118.

SAMPAIO, J.L.M. et al. An Outbreak of Keratitis Caused by *Mycobacterium immunogenum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 44, n. 9, p. 3201-3207, 2006.

THOMPSON, P. P. et al. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *acanthamoeba* keratitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 10, p. 3232–3236, 2008.

TURNER, L.; STINSON, I. *Mycobacterium fortuitum*; as a cause of corneal ulcer. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 60, p. 329-331, 1965.

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**, New York, v. 27, n. 5, p. 539–544, 2008.

VITAL, M. C. et al. Classifying the severity of corneal ulcers by using the “1, 2, 3” rule. **Cornea**, New York, v. 26, n. 1, p. 16–20, 2007.

WHITCHER, J. P.; SRINIVASANM.; UPADHYAY, M. P. Corneal blindness: a global perspective. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 79, n. 3, p. 214–221, 2001.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1 – FICHA CLÍNICA DO ESTUDO

### FICHA CLINICA ESTUDO DIAGNÓSTICO CERATITES INFECCIOSAS

NOME: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_

HISTÓRIA: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

ESTA EM USO DE COLÍRIOS? ( ) NÃO ( ) SIM, QUAIS? \_\_\_\_\_

SE ANTIBIÓTICO, SUSPENDEU 12 HORAS ANTES DA COLETA? ( ) SIM; NÃO ( )

QUANTAS HORAS DE SUSPENSÃO: \_\_\_\_\_

USUÁRIO DE LC? ( ) NÃO ( ) SIM, *gelatinosa* ( ) *rígida* ( )

HÁBITOS DE USO DE LC: ( ) usa soro fisiológico ( ) dorme com a LC

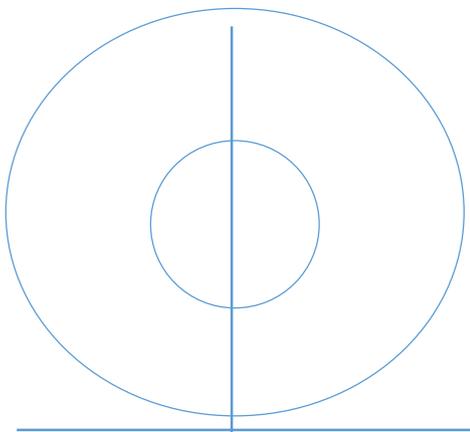
( ) outro \_\_\_\_\_

COMORBIDADE OCULAR? ( ) GLAUCOMA ( ) CIRURGIA OCULAR

( ) CERATOPATIA ( ) OLHO SECO ( ) OUTRA, QUAL? \_\_\_\_\_

TRAUMA OCULAR? ( ) NÃO ( ) SIM \_\_\_\_\_

#### EXAME OFTALMOLÓGICO:



TAMANHO DA ULCERA:
TAMANHO DO INFILTRADO:
RCA:
DISTÂNCIA DO EIXO VISUAL:
DESCRIÇÃO:

**SUSPEITA DIAGNÓSTICA:**HERPES: EPITELIAL DENDRÍTICA ( )

EPITELIAL GEOGRÁFICA ( ) ESTROMAL( ) OUTRA ( )

( ) ACANTHAMOEBA

( ) BACTÉRIAS, ALGUMA EM ESPECIAL? \_\_\_\_\_

( ) FUNGOS

( ) SUSPEITA DE LESÃO DE CórNEA NÃO INFECCIOSA

TRATAMENTO PROPOSTO: \_\_\_\_\_

RESULTADO DA MICROSCOPIA: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

RESULTADO DAS CULTURAS : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

HOSPITAL: ( ) HOP ( ) HC ( ) EVANGÉLICO. OUTRO \_\_\_\_\_

MÉDICO DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

NÚMERO PRONTÁRIO: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

REGIÃO RURAL? ( ) SIM ( ) NÃO . DN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

SEXO: ( ) FEM ( ) MASC

FONE: \_\_\_\_\_ OCUPAÇÃO: \_\_\_\_\_

DATA : \_\_\_\_\_

EXAMINADOR/ RESPONSÁVEL PELA COLETA:

## APÊNDICE 2 – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

### INFECTIOUS KERATITIS: FACTORS INFLUENCING CULTURE POSITIVITY

Maria Cecília Barros Duarte \* <sup>(1)</sup>; Guilherme Gubert Muller <sup>(2)</sup>; Felipe Francisco Bondan Tuon <sup>(3,4)</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Rua General Carneiro, 180 - Alto da Glória, Curitiba - PR, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Alameda Augusto Stelfeld, 1908 - Bigorriho, Curitiba – PR, Brazil.

<sup>3</sup>Departament of Internal Medicine, Infectious diseases, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Rua General Carneiro, 180 - Alto da Glória, Curitiba - PR, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Medicine, School of Health and Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba - PR, Brazil.

#### \*Corresponding author:

Maria Cecília Barros Duarte  
Rua Gabriel de Lara 75, Batel, Curitiba-PR, Brazil.  
Zipcode: 80.440-200.  
Telefone:(41) +55 9911-9808  
Email: mceciliabd@gmail.com

#### ABSTRACT

**Purpose:** To determine the rate of positive cultures and evaluate the factors associated with culture positivity in patients with infectious keratitis.

**Design:** Prospective cross-sectional study.

**Methods:** Patients with suspected infectious keratitis presenting to two hospitals in Curitiba, PR, Brazil, between June 2014 and April 2016, were recruited for the study. Seventy-five eyes of 75 patients were included. Demographic data and past and current medical history were obtained, and eye examination, corneal scraping and microbiological tests were performed. The main outcome measures were rate of positive cultures and factors associated with culture positivity.

**Results:** The culture positivity rate was 41.3%. The most frequent microorganisms identified were bacteria (54%), followed by fungi (32%) and *Acanthamoeba sp.* (16%). Two factors were significantly associated with positive cultures: previous treatment with corticosteroid drops ( $p=0.006$ ) and ulcer size larger than 3.62 mm<sup>2</sup> ( $p=0.016$ ).

Patients on topical antibiotics before corneal scraping were more likely to be culture negative [OR: 3.65 (IC95%: 1.32 – 10.07)].

**Conclusions:** Topical treatment before corneal scraping may interfere with culture results. The use of antibiotics is associated with negative cultures, while the use of corticosteroids is associated with positive cultures. Clinical characteristics of the infectious keratitis, such as ulcer size, are associated with culture positivity rate.

## INTRODUCTION

Infectious keratitis is a serious disease of the cornea that demands an urgent attention. It is one of the most important causes of preventable unilateral blindness in the world<sup>1</sup>. The prevalence of this condition varies among countries, depending on the degree of development<sup>2,3</sup>. In addition, factors such as climate characteristics, occupational activity, and contact lens wear affect the type of causative agents that are more prevalent in each world region<sup>4</sup>. Treatment with topical antimicrobial agents and surgery successfully resolves the infection and preserves the globe integrity. However, visual acuity decreases in a large percentage of cases due to corneal scars<sup>5</sup>.

Clinical examination is important to determine the causative agent; however, because there are no unequivocal characteristics of a specific pathogen, the isolation of the microorganisms by culture is the gold standard of diagnosis. Cultures have variable positivity rates among published series, and pathogens are usually identified in only half of the cases<sup>6</sup>. Polymerase chain reaction (PCR) tests are becoming more common for pathogen detection, because of the high sensitivity and specificity of the method and the rapidity of results; unfortunately, they are still costly and not available in all hospitals<sup>7</sup>.

A good outcome of infectious keratitis, with preservation of visual acuity, is associated with prompt microbiological diagnosis and treatment<sup>6,8</sup>. The success of culture positivity depends on an ideal sample collection on adequate media of culture. Factors associated with positivity have been studied; however, the findings are inconsistent in the literature<sup>9-12</sup>. Considering these aspects, the aim of this study was to determine the rate of positive cultures and evaluate the factors associated with them in patients with infectious keratitis after implementing routine sample collection for culture.

## METHODS

This is a cross-sectional observational study of patients with infectious keratitis approved by the local research ethics committee. The study was performed at two ophthalmology services in Curitiba, Brazil, between June 2014 and April 2016. The inclusion criteria were patients presenting to the emergency service with infectious keratitis, which was defined as a suppurative corneal infiltrate associated with an overlying epithelia defect, ulcer or only punctate epithelial erosions. The exclusion criteria were herpes virus keratitis without the suspicion of *Acanthamoeba sp.*, corneal perforation, neurotrophic ulcers, autoimmune ulcers, and cases in which corneal scraping was not performed according to the protocol. All patients or their guardians signed the informed consent agreement to participate.

Detailed information from each patient was obtained, including age, gender, location, contact lens wear, history of recent trauma, ocular disease, and topical treatment on course. A biomicroscopic eye examination was performed to identify the characteristics of the corneal lesion, including the size of ulcer and the presence of hypopyon. The ulcer size, when present, was calculated by the product of the two longest dimensions of the epithelial defect stained with fluorescein. In cases in which there were only epithelial erosions, an ulcer size zero was assigned.

After the instillation of anesthetic drops, the edges of the ulcer or the epithelium above the stromal infiltrate were scraped with a number 15 blade, and this material was smeared onto glass slides for Gram stain and directly inoculated in blood agar, chocolate agar, tioglicolate broth, Sabourad dextrose agar, and non-nutrient agar plates seeded with *Escherichia coli*, according to the ophthalmologist's discretion. All corneal samples were analyzed in the same microbiology laboratory. A positive culture was defined as the growth of microorganisms along the inoculation streak for bacteria and fungi. For *Acanthamoeba*, non-nutrient agar plates were observed under x10 objective lens for the presence of trophozoite trails along the line of incubation.

Software IBM SPSS Statistics v. 20 was used for statistical analysis of this study. A receiver operating characteristics (ROC) curve was adjusted to determine the cut-off value for the ulcer size associated with culture results. Fisher's exact test was used for the analysis of categorical data. The comparison of the groups defined by culture results was performed using Student's t test or the non-parametric Mann-Whitney test. The 95% CI was determined, and  $P \leq 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

A total of seventy-five eyes of 75 patients were studied. The mean age was 45.1 years (SD=18.7) (3 to 89 years). There were 52 males (69.3%) and 23 females (30.7%) in the study population. Eighteen patients (24.3%) were from a rural area. Ocular comorbidity was found in 20 patients (26.7%) as follows: ocular surface disease (6 cases); penetrating keratoplasty (6 cases); glaucoma (5 cases); allergic keratoconjunctivitis (2 cases); chronic use of topical corticosteroid (1 case); and lagophthalmos (1 case). Of the 75 patients, 25 reported contact lens wear (33.3%), and 18 reported recent ocular trauma (24%).

A total of 68% of the patients were on antibiotics at the time of the study visit; 17% patients were taking corticosteroids, while 8% patients were using a combination of both corticosteroids and antibiotics. Of the 13 patients using corticosteroid drops, five were chronic users because of cornea transplant, amaurotic pain, and bullous keratopathy; three were being treated for stromal herpes and were using acyclovir in addition to corticoids; two had a recent ocular trauma; one because of contact lens intolerance; and two because of keratitis. Hypopyon was present in 20 patients (26.7%). The average size of ulcer was 9.72 mm<sup>2</sup> (range: 0 to 100 mm<sup>2</sup>).

Positive Gram smears were obtained in 25 of 73 cases (34%). Gram-negative *bacilli* were identified in 11 cases; fungi hyphae in eight cases; gram-positive *cocci* in three; amoeba cysts in two and gram-positive bacilli in one case. All the samples were inoculated in blood agar for bacterial isolation; 73 samples were inoculated in Sabourad dextrose agar for fungal isolation; and 43 samples were inoculated in non-nutrient agar plates seeded with *E. coli* for *Acanthamoeba sp.* isolation. The culture recovery rate was 41.3% (31 of 75). The most frequent isolate identified was gram-positive bacteria (32%), followed by fungi (32%), gram-negative bacteria (19%), and *Acanthamoeba sp.* (16%) (table 1).

Table 2 shows the rates of culture positivity in subgroups of patients with infectious keratitis. The average age of patients with positive cultures was 48.1 years (SD=17.7). The average age in the group of patients with negative cultures was 43 years (SD=19.3), with no statistical difference between the two groups (p=0.245). No significant difference was found in culture positivity between male and female patients: 44.2% of positive cultures versus 34.8%, respectively (p=0.612). Patients from rural areas had

55.6% of positive cultures versus 35.7% in patients from urban areas, with no significant difference ( $p=0.172$ ).

The rate of culture positivity in patients with ocular comorbidity was 50% versus 38.2% in the group without comorbidity, with no significant difference ( $p=0.430$ ). Despite this finding, when we analyzed only bacterial cultures, we observed a positive association between comorbidity and bacterial culture positivity rate (50% of positive bacterial cultures in the group with comorbidity vs. 12.7% in the group without comorbidity,  $p=0.001$ ). Contact lens wear and ocular trauma were not found to be associated with the culture positivity rate ( $p=1$  and  $p=0.584$ , respectively). However, when we analyze only fungal cultures, we observed a positive association between ocular trauma and fungal culture positivity rate (33.3% of positive fungal culture in the group with trauma vs. 7.4% in the group without trauma;  $p=0.012$ ).

Patients on topical antibiotics before corneal scraping were more likely to be culture negative [OR: 3.65 (IC95%: 1.32 – 10.07)]. Of the 51 patients using antibiotic drops, 31.4% had a positive culture result compared with 62.5% of positive culture results in patients who were not using antibiotics ( $p=0.013$ ). Patients on topical corticoids before corneal scraping were more likely to be culture positive [OR: 6.51 (IC95%: 1.62 – 21.21)]. In patients using corticoid drops, 76.9% had positive cultures versus only 33.9% in the group who were not using corticoid drops, with statistical significance ( $p=0.006\%$ ).

The average size of the ulcers was 12.92 mm<sup>2</sup> (range: 0 to 100 mm<sup>2</sup>) in patients with positive cultures, and it was 7.50 mm<sup>2</sup> (range: 0 to 31.5 mm<sup>2</sup>) in patients with negative cultures, without statistical difference ( $p=0.185$ ). By using the ROC curve analysis, we found a cut-off value of 3.62 mm<sup>2</sup> for ulcer size. Patients with ulcers larger than 3.62 mm<sup>2</sup> had 53.3% of positive cultures compared with 23.3% of positive cultures in patients with ulcers smaller or equal 3.62 mm<sup>2</sup> ( $p=0.016$ ). The presence of hypopyon showed a tendency of association with the rate of positivity of bacterial cultures: 40% of positive bacterial cultures were found in patients with hypopyon versus 16.4% of positive bacterial cultures in the group without hypopyon ( $p=0.058$ ).

## **DISCUSSION**

Forty-one percent of the 75 patients with infectious keratitis included in this study were culture positive, which is consistent with the 32% to 64% rate of positive cultures seen

in studies conducted in the US<sup>13-15</sup>, Asia<sup>16</sup>, and Europe<sup>17,18</sup>. The variability of the positive culture rate may be explained by the differences in the methodology used among studies, for instance, culture technique and patient's inclusion criteria. In this study, the most frequent isolated microorganisms were bacteria (54%), followed by fungi (32%) and *Acanthamoeba sp.* (16%). Bacteria are the most common pathogens recovered by culture in the majority of publications, but fungi exceeds bacteria in some studies<sup>2,19</sup>, which is explained by hot climate and the prevalence of agricultural activity<sup>20</sup>. The recovery rate of 16% for *Acanthamoeba sp.* was similar to that reported in the publication of Otri from the UK<sup>17</sup>, but higher than that reported in the majority of the series of infectious keratitis<sup>2,13-15,18,21</sup>. One of the limitations of this study is the high percentage of patients already on topical treatment, and the fact that they are from referral centers, which may result in a disproportionate number of recalcitrant cases that are mostly infectious keratitis caused by fungi, amoeba, and other unusual pathogens.

The association between infiltrate size and culture positivity was investigated by Bhadange et al<sup>9</sup>, and they found that the infiltrate size was 26.7 mm<sup>2</sup> in the culture-positive group, and 22.4 mm<sup>2</sup> in the culture-negative group, with no significant difference (p=0.42). Otri et al compared clinical characteristics such as infiltrate size, localization, and depth with culture positivity and found no association between them<sup>17</sup>. We used the epithelial defect stained with fluorescein to measure the ulcer instead of the infiltrate size. We found that ulcers larger than 3.62 mm<sup>2</sup> are associated with positive cultures (p=0.016). There is a relationship between ulcer size and severity of infectious keratitis<sup>16,18,22</sup>; hence, the recommendation for corneal scraping for microbiological work up is that large ulcers should always be scraped for culture<sup>23</sup>. Considering that 68% of patients were already being treated at the time of the study, large ulcers may represent cases with an active infection, a larger load of microorganisms, and, thus, a higher propensity to be recovered in culture. Moreover, smaller ulcers may represent cases already in remission, with few microorganisms and less prone to growth on culture.

In this study, patients on topical antibiotics before corneal scraping were more likely to be culture negative [OR: 3,65 (IC95%: 1,32 – 10,07)]. The same finding was reported by Van der Meulen et al.<sup>11</sup> and Dahlgreen et al.<sup>24</sup>. Yet, Maragon et al found that patients on antibiotics were only slightly more likely to be culture negative but significantly more likely to have a delay in pathogen recovery<sup>10</sup>. McDonnell et al found

no difference in the rates of negative cultures between patients who were treated with antibiotics before culture and those who were not<sup>12</sup>. Other publications reported the same findings<sup>9,15,17,25</sup>. Although the inclusion criteria for infectious keratitis established in these studies were intended to avoid other causes of acute keratitis, some cases may not be infectious, and this may confound the association between antibiotics and culture positivity. Furthermore, the small size of the sample analyzed in this and the other studies is a limitation.

Patients on topical corticosteroids before corneal scraping were more likely to be culture positive [OR: 6,51 (IC95%: 1,62 – 21,21)]. Chronic use of corticosteroids is a well-known risk factor for infectious keratitis<sup>11</sup>. Of the 10 patients with positive cultures who were using corticosteroids, five were chronic users. Furthermore, of the five patients with positive culture for *Acanthamoeba*, four were being treated for herpes keratitis, and three (60%) were on corticosteroids. Herpes keratitis is a differential diagnosis for *Acanthamoeba* keratitis, and corticosteroids are used to treat some presentations of herpes keratitis. Corticosteroids promote local immunosuppression, impairment of phagocytosis, and enhancement of pathogen growth. It is crucial to exclude *Acanthamoeba* infection before starting corticosteroid treatment, especially in contact lens wearers with a clinical diagnosis of herpes keratitis.

In conclusion, topical treatment before corneal scraping may interfere with culture results. The use of antibiotics is associated with negative cultures, while the use of corticosteroids is associated with positive cultures. Clinical characteristics of infectious keratitis, such as ulcer size, can predict higher culture positivity rate.

## Tables and Legends

Table 1. Microbial isolates from 31 cultures.

Causative organisms	Number of eyes out of 31	%
Gram-positive bacteria	10	(32%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	
<i>Staphylococcus coagulase-negative</i>	3	
<i>Streptococcus viridans</i>	1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	
Gram-positive bacillus	1	
Polibacterial growth	1	
Gram-negative bacteria	6	(19%)
<i>Pseudomonas sp.</i>	3	
<i>Serratia marcescens</i>	2	
<i>Moraxella sp.</i>	1	
Fungi	10	(32%)
<i>Fusarium sp.</i>	3	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	
<i>Aspergillus niger</i>	2	
<i>Cladosporium sp.</i>	1	
<i>Acremonium sp.</i>	1	
<i>Phoma sp.</i>	1	
Non identified yeast	1	
Mixed	1	(3%)
<i>GP bacillus and Aspergillus niger</i>	1	
Amoeba	5	(16%)

Table 2. Percentage of positive cultures and negative cultures in various subgroups of patients with infectious keratitis

Characteristics at diagnosis		number	% positive culture (n=31)	% negative culture (n=44)	p value
Gender					
male		52	44%	56%	p=0.612
female		23	35%	65%	
Residence area					
Urban		56	36%	64%	p=0.172
Rural		18	56%	44%	
Ulcer size					
$\leq 3.62\text{mm}^2$		30	23%	77%	*P=0.016
$> 3.62\text{mm}^2$		45	53%	47%	
Hypopyon					
Present		20	55%	45%	p=0.188
Absent		55	36%	64%	
Ocular comorbidity					
Present		20	50%	50%	p=0.430
Absent		55	39%	62%	
Risk factors					
Trauma	Present	18	33%	67%	p=0.584
	Absent	57	44%	56%	
Contact lens	Present	25	40%	60%	p=1
	Absent	50	42%	58%	
Current treatment					
Antibiotics	Present	51	31%	69%	*p=0.013
	Absent	24	62.5%	37.5%	
Corticoids	Present	13	77%	23%	*p=0.006
	Absent	62	34%	66%	

\*Fischer's exact test; p<0,05.

## ACKNOWLEDGMENTS/DISCLOSURE

- a. Funding/Support: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.
- b. Financial Disclosures: No financial disclosures.
- c. Other Acknowledgments: none.
- d. Conflicts of interest: None

## REFERENCES

1. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79(3):214-221.
2. Lin CC, Lalitha P, Srinivasan M, et al. Seasonal trends of microbial keratitis in South India. *Cornea.* 2012;31(10):1123-1127.
3. Erie JC, Nevitt MP, Hodge DO, Ballard DJ. Incidence of ulcerative keratitis in a defined population from 1950 through 1988. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1993;111(12):1665-1671.
4. Laspina F, Samudio M, Cibils D, et al. Epidemiological characteristics of microbiological results on patients with infectious corneal ulcers: a 13-year survey in Paraguay. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2004;242(3):204-209.
5. Panda A, Satpathy G, Nayak N, Kumar S, Kumar A. Demographic pattern, predisposing factors and management of ulcerative keratitis: evaluation of one thousand unilateral cases at a tertiary care centre. *Clin Experiment Ophthalmol.* 35(1):44-50.
6. Kumar RL, Cruzat A, Hamrah P. Current state of in vivo confocal microscopy in management of microbial keratitis. *Semin Ophthalmol.* 2011;25(5-6):166-170.
7. Boggild a. K, Martin DS, Lee TY, Yu B, Low DE. Laboratory Diagnosis of Amoebic Keratitis: Comparison of Four Diagnostic Methods for Different Types of Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1314-1318.
8. Pandita A, Murphy C. Microbial keratitis in Waikato, New Zealand. *Clin Experiment*

- Ophthalmol.* 2011;39(5):393-397.
9. Bhadange Y, Das S, Kasav MK, Sahu SK, Sharma S. Comparison of culture-negative and culture-positive microbial keratitis: cause of culture negativity, clinical features and final outcome. *Br J Ophthalmol.* 2015;99:1498-1502.
  10. Marangon FB, Miller D, Alfonso EC. Impact of prior therapy on the recovery and frequency of corneal pathogens. *Cornea.* 2004;23(2):158-164.
  11. van der Meulen IJ, van Rooij J, Nieuwendaal CP, et al. Age-related risk factors, culture outcomes, and prognosis in patients admitted with infectious keratitis to two Dutch tertiary referral centers. *Cornea.* 2008;27(5):539-544.
  12. McDonnell PJ, Nobe J, Gauderman WJ, Lee P, Aiello A, Trousdale M. Community care of corneal ulcers. *Am J Ophthalmol.* 1992;114(5):531-538.
  13. Varaprasathan G, Miller K, Lietman T, et al. Trends in the etiology of infectious corneal ulcers at the F. I. Proctor Foundation. *Cornea.* 2004;23(4):360-364.
  14. Hernandez-Camarena JC, Graue-Hernandez EO, Ortiz-Casas M, et al. Trends in microbiological and antibiotic sensitivity patterns in infectious keratitis: 10-year experience in Mexico City. *Cornea.* 2015;34(7):778-785.
  15. Ibrahim MM, Vanini R, Ibrahim FM, et al. Epidemiology and medical prediction of microbial keratitis in southeast Brazil. *Arq Bras Oftalmol.* 2011;74(1):7-12.
  16. Ng ALK, To KKW, Choi CCL, et al. Predisposing Factors, Microbial Characteristics, and Clinical Outcome of Microbial Keratitis in a Tertiary Centre in Hong Kong: A 10-Year Experience. *J Ophthalmol.* 2015;2015:1-9.
  17. Otri AM, Fares U, Al-Aqaba M a., et al. Profile of sight-threatening infectious keratitis: a prospective study. *Acta Ophthalmol.* 2013;91(7):643-651.
  18. Ibrahim YW, Boase DL, Cree I a. Epidemiological characteristics, predisposing factors and microbiological profiles of infectious corneal ulcers: the Portsmouth corneal ulcer study. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(10):1319-1324.
  19. Furlanetto RL, Andreo EG V, Finotti IG a, Arcieri ES, Ferreira M a, Rocha FJ. Epidemiology and etiologic diagnosis of infectious keratitis in Uberlandia, Brazil. *Eur J Ophthalmol.* 2010;20(3):498-503.
  20. Müller GG, Kara-José N, De Castro RS. Perfil epidemiológico das ceratomicoses

- atendidas no hc-unicamp. *Arq Bras Oftalmol.* 2012;75(4):247-250.
21. Marujo FI, Hirai FE, Yu MCZ, Hofling-Lima AL, De Freitas D, Sato EH. Distribuição das ceratites infecciosas em hospital terciário no Brasil. *Arq Bras Oftalmol.* 2013;76(6):370-373.
  22. Morlet N, Minassian D, Butcher J. Risk factors for treatment outcome of suspected microbial keratitis. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(9):1027-1031.
  23. Jones DB. Bacterial keratitis. *Arq Bras Oftalmol.* 1979;42(2):71-77.
  24. Dahlgren MA, Lingappan A, Wilhelmus KR. The clinical diagnosis of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(6):940-944.
  25. Nentwich MM, Bordón M, di Martino DS, et al. Clinical and epidemiological characteristics of infectious keratitis in Paraguay. *Int Ophthalmol.* 2015;35(3):341-346.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### PREPARO DE ÁGAR NÃO NUTRIENTE COM CAMADA DE *E. COLI*

#### PESQUISA DE *ACANTHAMOEBA*

#### PREPARO: 1. SOLUÇÃO SALINA DE PAGE PARA AMEBAS (PAS)

Cloreto de Sódio	NaCl	120 mg
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4 mg
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4 mg
Fosfato de Sódio Dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142 mg
Fosfato de Potássio Dibásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mg
Água Destilada		q.s.p 1000 ml

Dissolver todos os sais nesta em ordem em água destilada.

#### 2. PREPARO DO ÁGAR NÃO NUTRIENTE:

Ágar Bacteriológico	15 mg
Solução de Page	100 ml
Água destilada	q.s.p 1000 ml

Dissolver o ágar bacteriológico por calor até dissolução completa. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Aliquotar 20 ml do meio em placas de Petri estéreis. O meio final produzido será um ágar não nutriente 1,5%.

### **3. PREPARO DA SUSPENSÃO DE *E. COLI***

Preparar uma suspensão de *E.coli* ATCC 25922 em fase *log* de crescimento em solução salina de Page. Proceder esterilização da suspensão a 121°C por 15 minutos para morte das bactérias. Pipetar 0,5mL da suspensão de *E. coli* sobre a placa de ágar não nutriente após esta ter sido semeada.

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Dra. Maria Cecília Barros Duarte e Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando os pacientes com infecção de córnea a participar de um estudo intitulado **Avaliação diagnóstica das ceratites infecciosas em três centros de referência no município de Curitiba**. Essa pesquisa é importante pois tem como finalidade identificar quais microrganismos causam infecção na córnea dos moradores de nossa cidade.

O objetivo desta pesquisa é descobrir qual bactéria, fungo ou protozoário está causando a infecção na sua córnea. Descobrimo o agente responsável pela sua doença poderemos tratá-la melhor, com colírios específicos para eliminá-lo. Depois, juntando os dados de todos os pacientes participantes, poderemos saber quais são os agentes mais comuns e isso ajudará a desenvolver meios de prevenção de novos casos de infecção.

Caso você participe da pesquisa, será necessário:

- 1- ser examinado pelo médico oftalmologista.
- 2- ser submetido a uma raspagem da úlcera da córnea, esse é um procedimento médico. Será realizado com colírio anestésico, mas ainda assim é um pouco desconfortável. Mesmo que você não participe do estudo, ainda assim é necessário fazer a raspagem, para descobrir a bactéria que está causando a infecção e tratá-la com medicação eficaz.
- 3- Usar a medicação corretamente.
- 4- Comparecer as consultas de retorno, que podem ser a cada 2 ou 7 dias, dependendo da gravidade da infecção, até que ocorra a cura do problema.

Para tanto você deverá comparecer no ambulatório em que foi atendido para realizar a consulta e a raspagem da córnea, no mesmo dia ou após 24 horas do diagnóstico da infecção da córnea. Caso não seja possível descobrir qual bactéria está causando a infecção, uma nova raspagem poderá ser realizada, conforme a decisão conjunta do paciente e do seu médico.

É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado a raspagem: dor, queimação, ardência, lacrimejamento.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Participar desse estudo não coloca você em risco. O problema da infecção do olho é preocupante, pois pode prejudicar a visão de forma permanente, mas como esse estudo faz as mesmas coisas que seriam feitas para resolver seu problema caso você não participasse do estudo, não há riscos adicionais.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

- 1- Identificar os microrganismos causadores de infecção de córnea aqui em Curitiba.
  - 2- Avaliar a eficiência da identificação desses microrganismos pelo laboratório.
  - 3- Analisar quais hábitos de vida, ou mesmo acidentes, podem ser os co-responsáveis pela sua infecção.
  - 4- Desenvolver medidas de prevenção de novos casos de infecção da córnea.
- No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico

Os pesquisadores Dra Maria Cecília Barros Duarte, médica oftalmologista, fone (41) 3019-3300, email: [mceciliabd@gmail.com](mailto:mceciliabd@gmail.com) e o Dr. Felipe Tuon, médico infectologista, [flptuon@gmail.com](mailto:flptuon@gmail.com) responsáveis por este estudo poderão ser contatados no seguinte endereço: Rua Gabriel de Lara, 75, Batel, de segunda a sexta-feira para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - CEP do HC/UFPR (fone (41) 3360-1041). O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

Você também, se desejar, poderá optar por tratamento alternativo ao que está sendo proposto. Este tratamento consiste em não realizar a raspagem da úlcera de córnea e usar colírios de antibiótico inespecíficos, ou seja, antibióticos que funcionam para eliminar vários microrganismos, e assim fazer um tratamento por tentativa e erro.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas: seu médico; a Dra Maria Cecília; o Dr Felipe e o microbiologista Guilherme. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.**

As despesas de exames laboratoriais necessária para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

---

Curitiba,

(Nome e Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

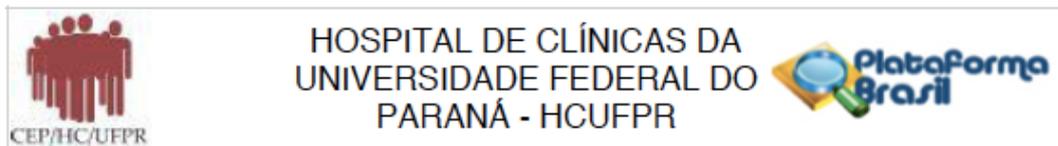
---

Curitiba,

(Nome e Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE)

## ANEXO 3

### PARECER DE APROVAÇÃO DO ESTUDO NO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DAS CERATITES INFECCIOSAS EM TRÊS CENTROS DE REFERÊNCIA DE CURITIBA

**Pesquisador:** FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 24642814.4.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 626.556

**Data da Relatoria:** 24/03/2014

##### **Apresentação do Projeto:**

Conforme já relatado no parecer do CEP numero 544.442 de 27 de janeiro de 2014

##### **Objetivo da Pesquisa:**

Conforme já relatado no parecer do CEP numero 544.442 de 27 de janeiro de 2014

##### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Conforme já relatado no parecer do CEP numero 544.442 de 27 de janeiro de 2014

##### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Conforme já relatado no parecer do CEP numero 544.442 de 27 de janeiro de 2014

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

O pesquisador reapresentou o TCLE corrigido de acordo com as solicitações do parecer , não restando pendências.



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 626.556

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

Pendências atendidas e projeto aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

CURITIBA, 25 de Abril de 2014

---

**Assinador por:**  
**Renato Tambara Filho**  
(Coordenador)