

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Fernando Pagnussato

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS CÓRNEAS CONSERVADAS POR BANCOS  
DE TECIDOS OCULARES HUMANOS QUANTO À PRESENÇA DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES**

Porto Alegre

2016

Fernando Pagnussato

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS CÓRNEAS CONSERVADAS POR BANCOS  
DE TECIDOS OCULARES HUMANOS QUANTO À PRESENÇA DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Mercedes Passos Geimba  
Co-orientadora: Profa. Dra. Diane Ruschel Marinho

Porto Alegre

2016

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

### CIP - Catalogação na Publicação

Pagnussato, Fernando

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS CÓRNEAS CONSERVADAS POR  
BANCOS DE TECIDOS OCULARES HUMANOS QUANTO À PRESENÇA  
DE FUNGOS LEVEDURIFORMES / Fernando Pagnussato. --  
2016.

36 f.

Orientadora: Mercedes Passos Geimba.

Coorientadora: Diane Ruschel Marinho.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Banco de tecidos . 2. Doador de córneas . 3.  
Transplante de córnea. 4. Fungo. 5. Contaminação  
microbiana. I. Geimba, Mercedes Passos , orient. II.  
Marinho, Diane Ruschel, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fernando Pagnussato

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS CÓRNEAS CONSERVADAS POR BANCOS  
DE TECIDOS OCULARES HUMANOS QUANTO À PRESENÇA DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Karla Cusinato Hermann – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

---

Karine Lena Meneghetti – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Mercedes Passos Geimba – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Sensibilidade antifúngica e resistência padrão dos isolados.....	17
---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO COMPREENSIVA .....</b>	<b>6</b>
1.1	JUSTIFICATIVA .....	9
1.2	OBJETIVOS .....	10
1.2.1	Objetivo geral.....	10
1.2.2	Objetivos específicos.....	10
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>21</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELL AND TISSUE BANKING .....</b>	<b>25</b>

## 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

### BANCO DE TECIDOS OCULARES HUMANOS

O uso de tecidos homólogos para transplante, obtidos a partir da doação autorizada por familiares cujos pacientes tiveram morte cerebral ou parada cardiorrespiratória, aumentou expressivamente nos últimos anos. A capacitação das equipes, o aumento de profissionais envolvidos, a implantação de rotinas para a localização de potenciais doadores e entrevistas dos familiares, aliados ao desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e protocolos avançados tem facilitado o uso de vários tecidos para transplante em pacientes como é o caso, por exemplo, dos tecidos oculares (ABTO, 2015).

Os bancos de tecidos oculares são definidos como estabelecimentos de saúde que, com infraestrutura física, equipamentos, técnicas e recursos humanos, têm como competências a busca de doadores, entrevista familiar, triagem clínica, social, física e laboratorial de doadores. São responsáveis também pela retirada, identificação, transporte para o banco, avaliação, processamento, acondicionamento, armazenamento e disponibilização de tecidos oculares de origem humana para uso terapêutico. Os bancos podem ainda fornecer tecidos para pesquisa, ensino, treinamento, controle de qualidade ou validação de processos (BRASIL, 2015).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, em 2015 o Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS) possuía apenas 47 bancos de tecidos oculares distribuídos em todo o território nacional, autorizados a funcionar e responsáveis pela cobertura universal e integral dos 204 milhões de habitantes (ANVISA, 2015; IBGE, 2015).

A obtenção e o processamento dos tecidos oculares são realizados com materiais e instrumentais estéreis. As técnicas são executadas de forma asséptica, buscando prevenir ou minimizar a contaminação microbiana e preservar as condições dos tecidos (BRASIL, 2015).

Quanto aos meios de preservação, os mais utilizados pelos bancos para a conservação da córnea após o processamento do tecido possuem gentamicina (efetiva principalmente contra Gram negativos) e estreptomicina em sua formulação. Não fazem parte das formulações qualquer tipo de agente antifúngico, sejam eles polienos, azóis, pirimidinas ou equinocandinas (MULLER, 2013). Estes meios são comerciais, registrados na ANVISA e podem conservar os tecidos por até 14 dias (BAER, 1988).

Neste contexto, segundo a legislação brasileira, os bancos devem implementar ações de controle de qualidade com o objetivo de contribuir para que os tecidos sejam liberados e

disponibilizados depois que todos os parâmetros relacionados com a segurança e a qualidade do produto, ao longo de todos os processos realizados, tenham sido alcançados e julgados como satisfatórios (BRASIL, 2015). No entanto, nenhum dos 47 bancos de tecidos oculares atualmente em funcionamento realiza triagem microbiológica de seus doadores ou de seus processos.

## A CÓRNEA

Córnea é a parte anterior transparente e protetora do olho dos vertebrados. Fica localizada na região polar anterior do globo ocular humano. A córnea, assim como o cristalino, tem a função de focar a luz através da pupila para a retina, como se fosse uma lente fixa. Sua superfície anterior é elíptica, medindo aproximadamente 12,6 mm no meridiano horizontal e, 11,7 mm no vertical. Com uma espessura média de 0,52 mm na região central e de 0,65 mm, ou mais, na região periférica (KRACHMER, 2011).

A córnea é constituída de cinco camadas. Anteriormente é coberta pelo *epitélio* que descansa sobre uma membrana basal que é considerada a primeira barreira ocular contra a penetração de microrganismos. Logo abaixo, encontra-se a *camada de Bowman*, uma membrana basal que é acelular. O *estroma* corneano não contém vasos sanguíneos e linfáticos, um aspecto que contribui não apenas para a transparência da córnea, mas também para a alta taxa de sucesso dos transplantes de córnea. A *membrana de Descemet* serve de suporte para o endotélio. O *endotélio* é a última camada e que está em contato com a parte interna do olho, sendo responsável pela deturgência do estroma, bombeando ativamente fluídos de volta para a câmara anterior do olho (KUMAR, 2015).

Considerando que a superfície da córnea está em permanente contato com o meio externo, existe uma discussão sobre a existência de uma microbiota que pudesse ser considerada como normal na superfície ocular. Willcox et al. publicaram em 2013 uma revisão da literatura na tentativa de caracterizar essa microbiota. Após a revisão, eles identificaram como prevalentes os isolamentos que continham *Estafilococos* coagulase-negativos, *Propionibacterium* sp., *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* sp., bactérias gram-negativas e fungos. No entanto, em função da variabilidade de técnicas utilizadas pelos pesquisadores entre os diversos estudos analisados, os autores recomendaram a realização de estudos transversais e longitudinais para compreender melhor a prevalência dos isolamentos. Neste sentido, estudos como o *The Human Microbiome Project* estão sendo realizados com



objetivo de caracterizar comunidades microbianas encontradas em vários locais do corpo humano e procurar correlações entre as mudanças no microbioma e a saúde humana.

## TRANSPLANTE DE CÓRNEA

O primeiro transplante penetrante de córnea com sucesso permanente foi relatado em 1906 pelo oftalmologista austríaco Eduard Konrad Zirm. Ele operou um paciente de 45 anos que havia perdido a visão devido a uma queimadura química com cal(ZIRM, 1989).

Conceitualmente, o procedimento de transplante de córnea consiste em substituir a porção doente da córnea de um paciente por uma córnea saudável oriunda de um doador. A substituição pode ser total (transplante penetrante) ou parcial (transplante lamelar anterior ou lamelar posterior) (MOREIRA, 2008). Estes procedimentos são agrupados dependendo da finalidade: melhorar a visão (finalidade ótica), corrigir perfurações oculares (transplante tectônicos), terapêutico (para tratamento de infecções não responsivas) ou estético. (HOLLAND, 2015).

As principais patologias que recebem a indicação do transplante de córnea como tratamento são: ceratocone, em 65% dos casos, seguido da ceratopatia bolhosa (21%), leucoma corneano (10%), distrofia de Fuchs (1,9%), distrofia Lattice (0,9%) e síndrome de Steven Johnson (0,9%) (CALIX NETTO, 2006).

No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO, foram realizados 13.861 transplantes de córneas em 2015. O Rio Grande do Sul foi responsável pela realização de 784 transplantes (ABTO, 2015).

Das diversas complicações relatadas como consequentes ao transplante de córnea, a infecção, também chamada de endoftalmite, é a mais preocupante.

## ENDOFTALMITES

Endoftalmite é nome dado à infecção bacteriana ou fúngica no interior do olho, envolvendo estruturas como os humores vítreo e/ou aquoso. Podem ser classificadas como endógenas ou exógenas(DURAND, 2013).

A endoftalmite endógena é causada por microrganismos oriundos do próprio corpo e que foram disseminados pela corrente sanguínea até o olho. Os pacientes geralmente

apresentam os sintomas de sua infecção sistêmica subjacente, mas às vezes podem apresentar apenas sintomas oculares. Os principais microrganismos envolvidos neste caso são o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, Bacilos gram-negativos (por exemplo, *Klebsiella*) (DURAND, 2013).

No entanto, a maioria dos casos de endoftalmite são do tipo exógenas, sendo causadas por microrganismos oriundos do ambiente externo. As principais causas da penetração desses microrganismos no interior do olho são: trauma; córnea previamente infectada; cirurgia prévia. Os principais microrganismos envolvidos nestes casos, respectivamente, são: *Bacillus cereus* e Estafilococos coagulase-negativos; *Candida* spp. - particularmente *Candida albicans*; *Propionibacterium acnes* (DURAND, 2013).

A incidência de endoftalmite após o transplante penetrante de córnea foi estimada por Taban e colaboradores, a partir de uma revisão sistemática de 66 artigos publicados ao longo de 25 anos, como sendo de 0,382% dos casos (TABAN et al., 2005). Em países como os Estados Unidos a incidência de endoftalmite pós-transplante é de 0,028%, podendo chegar até 0,1%, conforme a região (PARDOS,1982; EDELSTEIN, 2016). Já no Reino Unido, após uma revisão de 11 320 transplantes penetrantes realizados entre 1999 e 2006, a incidência de endoftalmite foi de 0,67% (CHEN, 2015). No Brasil não existem estudos globais relatando a incidência de endoftalmite após o transplante. São encontrados apenas estudos limitados a uma única instituição ou então relatos de caso (BECHARA, 1987; SCHIRMBECK, 2000; GODOY, 2004).

Entre os agentes microbianos frequentemente encontrados em culturas de córneas com endoftalmite, grande parte são fungos principalmente do gênero *Candida* (incluindo as espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata*), *Fusarium* e *Cladosporium* (KLOESS, 1993; KEYHANI, 2005; WILHELMUS, 2007; HASSAN, 2008; LE, 2015). Para o tratamento de endoftalmite fúngica é comum na prática clínica o uso de anfotericina B, voriconazol, ou miconazol intraoculares, muitas vezes combinados com antifúngicos orais, tópicos ou subconjuntivais (WYKOFF, 2008).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Em virtude do aumento do número de doadores de tecidos oculares com diferentes perfis sociais e clínicos e da possibilidade das córneas doadas serem transportadoras de agentes microbianos fúngicos, o que resultaria em endoftalmite exógenas devido à

contaminação do botão coneoescleral, o presente trabalho torna-se de grande relevância uma vez que inexistem estudos brasileiros realizando a análise microbiológica das córneas conservadas por bancos de tecidos oculares humanos, demonstrando a presença de fungos leveduriformes.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Determinar a presença de fungos leveduriformes em córneas conservadas por bancos de tecidos oculares humanos.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar o crescimento de leveduras presentes nos tecidos corneanos;
- Identificar os possíveis gêneros de fungos leveduriformes presentes nos tecidos;
- Identificar as possíveis espécies de fungos leveduriformes presentes nos tecidos.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS CÓRNEAS CONSERVADAS POR BANCOS DE TECIDOS OCULARES HUMANOS QUANTO À PRESENÇA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES

**Fernando Pagnussato**

**Diane Ruschel Marinho - Mercedes Passos Geimba**

F. Pagnussato

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Unidade Banco de Multitecidos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Av. Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brasil - fpagnussato@hcpa.edu.br

D. R. Marinho

Serviço de Oftalmologia, Unidade Banco de Multitecidos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Departamento de Oftalmologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Mercedes P. Geimba

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

**Resumo** **Objetivos:** Em virtude do aumento do número de doadores de tecidos oculares com diferentes perfis sociais e clínicos e da possibilidade das córneas doadas serem transportadoras de agentes microbianos, principalmente fungos, o que resultaria em endoftalmite exógena devido à contaminação do botão corneoescleral, neste estudo foram analisadas as córneas conservadas por bancos de tecidos oculares humanos, na busca de isolamento de fungos leveduriformes. **Métodos:** Foram analisados 136 botões corneoesclerais processados por 07 bancos. Alíquotas do conservante dos botões corneoesclerais foram cultivadas em duplicata em ágar Sabouraud dextrose e CHROMagar™ Candida. Análises macroscópicas e microscópicas das colônias, assim como testes para a confirmação das espécies de leveduras e para a suscetibilidade aos antifúngicos também foram realizados. **Resultados:** Das 136 amostras cultivadas, 11 (8,08%) apresentaram o crescimento de colônias fúngicas. Na análise macroscópica e microscópica verificou-se a compatibilidade com a morfologia leveduriforme. Das 11 culturas positivas para fungos, após subcultivo em CHROMagar™ Candida foram identificadas presuntivamente 04 (36,36%) espécies de *Candida glabrata*, 03 (27,27%) de *Candida krusei*, 02 (18,18%) de *Candida albicans* e 02 (18,18%) de *Candida tropicalis*. No teste comercial Candifast® foram confirmadas as identificações presuntivas realizadas anteriormente. Quanto a resistência aos antifúngicos, *Candida glabrata* apresentou 75% de resistência a anfotericina B, nistatina, econazol, cetoconazol, miconazol e fluconazol, exceto a flucitosina onde apresentou 50%. *Candida krusei* apresentou 33,3% de resistência para anfotericina B. *Candida albicans* apresentou 50% de resistência a anfotericina B, flucitosina e cetaconazol. Já *Candida tropicalis* apresentou 50% de resistência para anfotericina B. **Conclusão:** A taxa de contaminação por fungos leveduriformes em córneas conservadas pelos bancos é consistente aos relatados na literatura. *Candida glabrata* foi a espécie mais comumente isolada, mas também foram identificadas *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. *Candida glabrata* apresentou maior

resistência aos antifúngicos. Mais estudos precisam ser feitos para elucidar esta questão, como a desinfecção prévia da córnea com iodopovidona, ou a suplementação dos meios de conservação com antifúngicos.

**Palavras-Chave** Banco de tecidos – Doador de córneas – Transplante de córnea – Fungo – Contaminação microbiana

## **Introdução**

O uso de tecidos homólogos para transplante, obtidos a partir da doação autorizada pelos familiares, aumentou expressivamente nos últimos anos. A capacitação das equipes, o aumento de profissionais envolvidos, a implantação de rotinas para a localização de potenciais doadores e entrevistas dos familiares, aliados ao desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e protocolos avançados tem facilitado o uso de vários tecidos. Dentre os diversos tipos de tecidos disponíveis, o mais utilizado em transplantes são os tecidos oculares processados pelos bancos (ABTO 2015).

Os bancos de tecidos oculares (BTO) são definidos como estabelecimentos de saúde que, com infraestrutura física, equipamentos, técnicas e recursos humanos, têm como competências desde a busca de doadores até a disponibilização de tecidos oculares de origem humana processados para o uso terapêutico, pesquisa, ensino, treinamento, controle de qualidade ou validação de processos (Brasil 2015). Embora a legislação brasileira para BTO determine a implementação de ações de controle de qualidade, nenhum dos bancos em funcionamento no Brasil realiza a triagem microbiológica como rotina para a seleção dos seus doadores. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2015 o Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS) possuía apenas 47 BTO distribuídos em todo o território nacional, autorizados a funcionar e responsáveis pela cobertura universal e integral dos 204 milhões de habitantes. Estes 47 bancos foram responsáveis pelo fornecimento de 16.387 tecidos destinados ao transplante de córnea (ANVISA 2015; IBGE 2016).

Conceitualmente, o procedimento de transplante de córnea consiste em substituir a porção doente da córnea de um paciente por uma córnea saudável oriunda de um doador. A substituição pode ser total, transplante penetrante, ou parcial, transplante lamelar anterior ou lamelar posterior (Moreira et al. 2008). No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), foram realizados 13.861 transplantes de córneas em 2015. O Rio Grande do Sul foi responsável pela realização de 784 destes transplantes (ABTO 2015).

Das diversas complicações já relatadas envolvendo o transplante de córnea, a infecção, chamada de endoftalmite, é a mais preocupante.

Endoftalmite é nome dado à infecção bacteriana ou fúngica no interior do olho, envolvendo estruturas como os humores vítreo e/ou aquoso. Podem ser classificadas como endógenas ou exógenas. A maioria dos casos de endoftalmite é do tipo exógena, sendo causada por microrganismos oriundos do ambiente externo. As principais causas da penetração desses microrganismos no interior do olho são: trauma, córnea previamente infectada ou cirurgia prévia. (Durand 2013). A incidência de endoftalmite após o transplante penetrante de córnea foi estimada por Taban e colaboradores 2005, a partir de uma revisão sistemática de 66 artigos publicados ao longo de 25 anos, como sendo de 0,382% dos casos. No Brasil não existem estudo globais relatando a incidência de endoftalmite após o transplante. São encontrados apenas estudos limitados a uma única instituição ou então relatos de caso (Bechara et al. 1987; Schirmbeck et al. 2000; Godoy et al. 2004). Entre os agentes microbianos frequentemente encontrados em culturas de córneas com endoftalmite, grande parte são fungos principalmente do gênero *Candida* (incluindo as espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata*), *Fusarium* e *Cladosporium* (Kloess et al. 1993; Keyhani et al. 2005; Wilhelmus et al. 2007; Hassan et al. 2007; Le et al. 2015).

Em virtude do aumento do número de doadores de tecidos oculares com diferentes perfis sociais e clínicos e da possibilidade das córneas doadas serem transportadoras de agentes microbianos, principalmente do tipo fungo, o que resultaria em endoftalmite exógenas devido à contaminação do botão corneoescleral, este realizou a análise microbiológica de córneas conservadas por bancos de tecidos oculares humanos.

## **Materiais e Métodos**

### **Amostras**

O presente estudo foi realizado na Unidade Banco de Multitecidos (UBMT) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) durante o período de julho a novembro de 2016.

Foram analisados 136 botões córneoesclerais processados por sete Bancos de Tecidos Oculares Humanos (BTOH) brasileiros e que não puderam ser utilizados no transplante terapêutico devido a alguma contraindicação. As análises foram realizadas após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

Inicialmente, a obtenção, o processamento, bem como a contraindicação do uso dos tecidos ocorreram em conformidade aos protocolos operacionais de cada instituição e segundo a legislação em vigor (Brasil 2009; Brasil 2015).

A conservação dos botões córneoesclerais foi realizada por cada Banco utilizando o meio Optisol GS® (Chiron Ophthalmics, Irvine, CA), registro na ANVISA: 10196150044, contendo dois tipos de antimicrobianos – sulfato de gentamicina (100 µg/ml) e estreptomicina (200 µg/ml), ou o meio EUSOL-C® (Alchimia, Padova, Italy), registrado na ANVISA: 80122640007, contendo um único tipo de antimicrobiano – sulfato de gentamicina (100 µg/ml). Os meios contendo os botões foram armazenados sob refrigeração em temperatura média de 4° C.

Os frascos contendo os botões foram recebidos pelo laboratório da UBMT do HCPA. Foram incubados a 37°C por 24 horas para ambientação. Foi realizada a sonicação a 37°C durante 20 min a 50 Hz (Unique, São Paulo, Brasil).

Foram aliquotados 4 mL do meio de conservação dos botões córneoesclerais, em duplicata, e acondicionados em frascos estéreis. Em seguida, os frascos foram centrifugados a 3.500 RPM e encaminhados ao DMIP/ICBS/UFRGS para o cultivo e identificação dos microorganismos.

#### Isolamento das culturas fúngicas

Após a inoculação de 0,1 mL do meio de conservação precipitado no meio de cultura agar sabouraud dextrose – ASD (Merk, Darmstadt, Germany), as placas foram incubadas a 37°C por 24-72 horas. No prazo de 1-3 dias foi identificado macroscopicamente o crescimento de colônias com consistência cremosa, pastosa ou úmida, de colorações claras, opacas ou brilhantes e morfologia mucoide, lisa ou rugosa, para compatibilizar com os aspectos leveduriformes (Murray et al. 2003).

As colônias isoladas a partir do meio ASD foram então subcultivadas no meio CHROMagar™ Candida (BD, Sparks, USA) e incubadas protegidos da luz a 37°C por 48 horas. A morfologia apenas das colônias pigmentadas foram consideradas na leitura e na

interpretação dos resultados (Odds et al. 1994; Pfaller et al. 1996; Beighton et al. 1995; Jabr-rizk et al 2001; Bauters et al. 2001). Todas as análises foram feitas em duplicatas.

#### Identificação presuntiva das culturas fúngicas

A partir da identificação presuntiva em meio CHROMagar™ Candida, as colônias foram subcultivadas novamente no meio ASD e incubadas a 37°C por 24-72 horas. As colônias crescidas em 1-3 dias foram testadas para a identificação das leveduras e para suscetibilidade à anfotericina B (AB), nistatina (NY) flucitosina (FCT) econazol (ECZ), cetoconazol (KTZ), miconazol (MCZ) e fluconazol (FCZ), utilizando o kit Candifast® (ElitechMICROBIO, Signes, France).

Foram utilizadas *C. albicans* (ATCC 64548), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. krusei* (ATCC 34135) e *C. tropicalis* (ATCC 1369) como controle em todas as metodologias.

## Resultados

### Isolamento

Das 136 amostras cultivadas no meio ASD, 11 (8,08%) apresentaram o crescimento de colônias fúngicas. Na análise macroscópica verificou-se a presença colônias de coloração clara, cremosas e brilhantes. Na análise microscópica verificou-se a presença de células arredondadas e ovoides. Estas evidências foram compatíveis com a morfologia leveduriformes.

Das 11 culturas positivas no meio ASD, após subcultivo em CHROMagar™ Candida foram identificadas presuntivamente 04 (36,4%) espécies de *Candida glabrata* (por apresentar cor de malva a malva escuro), 03 (27,3%) de *Candida krusei* (cor-de-rosa claro), 02 (18,2%) de *Candida albicans* (cor verde-claro a verde médio) e 02 (18,2%) de *Candida tropicalis* (cor azul acinzentado a azul esverdeado ou azul metalizado).

### Identificação presuntiva das culturas fúngicas

A partir dos testes utilizando o kit comercial Candifast® foram confirmadas as 11 identificações presuntivas realizadas anteriormente. 04 (36,36%) espécies de *Candida glabrata* assimilaram glicose e trealose. Três (27,27%) espécies de *Candida krusei* assimilaram apenas glicose. Duas (18,18%) espécies de *Candida albicans* assimilaram



glicose, galactose e maltose. Duas (18,18%) espécies de *Candida tropicalis* assimilaram glicose, galactose, trealose e maltose.

Quanto ao perfil de resistência, a Tabela 1 apresenta o padrão de susceptibilidade antifúngica dos isolados para AB, NY, FCT, ECZ, KTZ, MCZ e FCZ:

## Discussão

Na presente pesquisa realizou-se uma análise microbiológica das córneas conservadas por bancos de tecidos oculares humanos quanto à presença de fungos leveduriformes.

Verificou-se que a taxa de contaminação por fungos leveduriformes foi de 8,08% do total das 11 amostras analisadas. Este valor é consistente quando comparado com o resultado obtido por Khouani *et al*, onde relatou a taxa de contaminação de 5,5% das córneas que foram processadas por um banco de olhos francês (Khouani et al. 2014).

Das 11 culturas positivas, *Candida glabrata* foi a espécie mais comumente isolada, correspondendo a uma positividade total de 36,4%. Em seguida, a espécie *Candida krusei* correspondeu a 27,3%, *Candida albicans* a 18,2% e *Candida tropicalis* a 18,2%. Corroborando com estes resultados, Le *et al* 2015 e Weng *et al* 2014 relataram a presença de *C. glabrata* na córnea de receptores e nos botões corneoesclerais. Assim como Garg *et al* 2013, Merchant *et al* 2001 e Cameron *et al* 1991 atribuíram a contaminação do doador a infecção ocular causada por *Candida albicans* após o transplante de córnea em um receptor. Um único caso de endoftalmite por *Candida tropicalis* consequente a um transplante de córnea foi relatado por Behrens-Baumann e colaboradores 1991.

Todas as 4 espécies de *Candida* isoladas foram testadas quanto à susceptibilidade aos antifúngicos. *Candida glabrata* apresentou 75% de resistência a todos os antifúngicos testados, exceto a flucitosina onde apresentou 50% de resistência. *Candida krusei* apresentou 33,3% de resistência apenas para anfotericina B. *Candida albicans* apresentou 50% de resistência a anfotericina B, flucitosina e cetaconazol. Já *Candida tropicalis* apresentou 50% de resistência apenas para a anfotericina B. Em revisão a literatura, algumas espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* têm-se mostrado intrinsecamente resistentes ao fluconazol, enquanto *C. lusitaniae* tem sido relatada como resistente à anfotericina B (Carrillo-Muñoz et al. 2001; García-Martos et al. 1998; Safdar et al. 2001). Mais recentemente espécies chamadas de Não

*Candida albicans* (NAC) foram descritas com resistência variável aos azólicos (Vijaya et al. 2011; Agarwal et al. 2011). Neste sentido, faz-se necessária uma identificação rápida e precisa dessas leveduras para que se estabeleça uma terapia antifúngica breve e adequada, reduzindo a morbidade de pacientes com infecções por *Candida* (Godoy et al. 2001).

Tabela 1: sensibilidade antifúngica e resistência padrão dos isolados

Espécies de <i>Candida</i> (11)	Anfotericina B				Nistatina				Flucitosina				Econazol			
	Sensível		Resistente		Sensível		Resistente		Sensível		Resistente		Sensível		Resistente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Candida glabrata</i> (04)	1	25,0	3	75,0	1	25,0	3	75,0	2	50,0	2	50,0	1	25,0	3	75,0
<i>Candida krusei</i> (03)	2	66,7	1	33,3	3	100	0	0	3	100	0	0	3	100	0	0
<i>Candida albicans</i> (02)	1	50,0	1	50,0	2	100	0	0	1	50,0	1	50,0	2	100	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (02)	1	50,0	1	50,0	2	100	0	0	2	100	0	0	2	100	0	0

Espécies de <i>Candida</i> (11)	Cetoconazol				Miconazol				Fluconazol			
	Sensível		Resistente		Sensível		Resistente		Sensível		Resistente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Candida glabrata</i> (04)	1	25,0	3	75,0	1	25,0	3	75,0	1	25,0	3	75,0
<i>Candida krusei</i> (03)	3	100	0	0	3	100	0	0	3	100	0	0
<i>Candida albicans</i> (02)	1	50,0	1	50,0	2	100	0	0	2	100	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (02)	2	100	0	0	2	100	0	0	2	100	0	0

Em um recente estudo publicado pela Associação Americana de Bancos de Olhos (EBAA), foram revisadas as notificações de efeitos adversos ao transplante de córneas realizados entre 2007 a 2014. Os pesquisadores identificaram 99 casos de endoftalmite decorrentes da cirurgia, sendo que em 65% dos isolamentos foram identificadas espécies de *Candida* (Edelstein et al. 2016). Embora a pesquisa não relacione diretamente os casos de endoftalmite a existência de uma contaminação prévia dos tecidos oculares processados, existe um forte indício de que a presença de fungos nas córneas processadas pelos bancos estaria relacionada à microbiota existente na superfície ocular do doador. Em uma revisão da literatura, Willcox 2013 relatou o isolamento de fungos da conjuntiva ocular tida como normal. Considerando esta possibilidade, a Academia Americana de Oftalmologia e a Associação Americana de Bancos de Olhos (EBAA) recomendam aos BTO a utilização de solução à base de iodopovidona na superfície de qualquer tecido ocular destinado a transplantação, pelo menos uma vez entre o momento da morte do doador e a preservação do tecido. No entanto, não define a concentração, o volume nem o tempo de duração da exposição da superfície ocular à solução (EBAA 2016). No Brasil esta recomendação não está padronizada e tão pouco é exigido pelas regulamentações atuais (Brasil 2015; Brasil 2009).

## Conclusão

A taxa de contaminação por fungos leveduriformes em córneas conservadas por bancos de tecidos oculares humanos é consistente aos relatado na literatura. *Candida glabrata* foi a espécie mais comumente isolada, mas também foi identificado positividade para *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. As culturas positivas já apresentam resistência aos antifúngicos, principalmente a espécie *Candida glabrata*. Mais estudos precisam ser feitos para elucidar esta questão, como a comparação do cultivo de córneas processadas com e sem desinfecção prévia com iodopovidona, ou até mesmo o efeito de antifúngicos suplementados aos meios de conservação no seguimento de transplantados.

## Referências

- 1- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 55, de 11 de dezembro de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2015. Seção 1, p. 55-72.
- 2- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Relatório de avaliação dos dados de produção dos bancos de tecidos humanos** - 2015. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2860283/Relat%C3%B3rio+de+Avalia%C3%A7%C3%A3o+dos+Dados+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+dos+Bancos+de+Tecidos+%E2%80%93+Ano+2015.pdf/a3d26106-f4bb-4015-b972-83ad39546e9c>>. Acesso em 29 nov. 2016.
- 3- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estimativas da população residente no Brasil**. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas\\_de\\_Populacao/Estimativas\\_2015/estimativa\\_dou\\_2015\\_20150915.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2015/estimativa_dou_2015_20150915.pdf). Acesso em 29 nov. 2016.
- 4- MOREIRA, H. et al. **Banco de olhos, transplante de córnea**. 1ª edição. Brasil: Cultura Médica, 2008.
- 5- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS - ABTO. **Registro Brasileiro de Transplantes de Órgãos** – 2015. São Paulo: ABTO, 2015.
- 6- DURAND, M.L. Endophthalmitis. **Clin Microbiol Infect**, v.19, n. 13, p. 227-234, 2013.
- 7- TABAN, M et al. Incidence of acute endophthalmitis following penetrating keratoplasty: a systematic review. **Arch Ophthalmol**, v. 123, n. 5, p. 605-609, 2005.
- 8- BECHARA, S. J. et al. Incidence and prophylaxis of postoperative endophthalmitis in cases or penetrating keratoplasties. **Rev Bras Oftalmol**, v.46, n.6, p.303-307, 1987.
- 9- SCHIRMBECK, T et al. Endophthalmitis: an analysis of 58 cases. **Arq. Bras. Oftalmol**, v.63, n.1, p. 39-44, 2000.
- 10- GODOY, G. et al. *Candida albicans* endophthalmitis following penetrating corneal graft - Case report. **Arq Bras Oftalmol**, v.67, p.349-52, 2004.
- 11- KLOESS, P. M. et al. Bacterial and fungal endophthalmitis after penetrating keratoplasty. **Am J Ophthalmol**, v.115, n.3, p.309-316, 1993. Erratum in: **Am J Ophthalmol**, v.115, n.4, p.548, 1993.
- 12- KEYHANI, K. et al. The incidence of fungal keratitis and endophthalmitis following penetrating keratoplasty. **Cornea**, v.24, n.3, p.288-291, 2005.

- 13- WILHELMUS, K. R.; HASSAN, S. S. The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. **Ophthalmology**, v.114, n.3, p.440-445, 2007.
- 14- HASSAN, S. et al. Infectious Disease Risk Factors of Corneal Graft Donors. **Archives of ophthalmology**, v.126, n.2, p.235-239, 2008.
- 15- LE, Q. et al. Early-Onset Candida glabrata Interface Keratitis after Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. **Optometry and Vision Science**, v.92, n. 5, p.93-96, 2015.
- 16- BRASIL. Portaria MS/GM 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 out. 2009. Seção 1, p. 77-118.
- 17- MURRAY, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). **Manual of clinical microbiology**, 8th ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 2003.
- 18- ODDS, F.C., BERNAERTS, R. CHROMagar Candida Medium, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. **J. Clin. Microbiol**, v. 32, p. 1923-1929, 1994.
- 19- PFALLER, M.A., HUSTON, A, COFFMAN, S. Application of CHROMagar Candida Medium for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata. **J. Clin. Microbiol**, v. 34, p. 56-61, 1996.
- 20- BEIGHTON, D. et al. Use of CHROMagar Candida Medium medium for isolation of yeasts from dental samples. **J. Clin. Microbiol**, v. 32, p. 3025-3027, 1995.
- 21- JABRA-RIZK, M.A. et al. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida Medium. **J. Clin. Microbiol**, v. 30, p. 2015-2016, 2001
- 22- BAUTERS, T.G., NELIS, H.J. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four Candida species. **J. Clin. Microbiol**,v.40, p. 1838-1839, 2002.
- 23- KHOUANI, M. et al. Evaluation of Microbial Contamination of Corneal Transplants: One-Year Report From a French Regional Eye Bank. **Cornea**, v. 33, n. 9, p. 899–904, 2014.
- 24- LE, Q. et al. Early-Onset Candida glabrata Interface Keratitis after Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. **Optometry and vision science**, v. 92, n. 5, p. 93-6, 2015.
- 25- WENG, C. Y. et al. Candida glabrata Endophthalmitis Transmitted From Graft to Host After Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. **JAMA Ophthalmology**, v. 132, n. 11, p. 1381-1383, 2014.
- 26- GARG, S. et al. Prevalence of Positive Microbiology Results From Donor Cornea Tissue in Different Methods of Corneal Transplantation. **Cornea**, v.32, n. 2, p. 137–140, 2013.
- 27- MERCHANT, A. et al. Candidal endophthalmitis after keratoplasty. **Cornea**, v. 20, n. 2, p. 226-229, 2001.
- 28- CAMERON, J.A. et al. Endophthalmitis from contaminated donor corneas following penetrating keratoplasty. **Arch Ophthalmol**, v. 109, n. 1, p. 54-59, 1991.
- 29- Behrens-Baumann, W et al. Candida tropicalis endophthalmitis following penetrating keratoplasty. **Br J Ophthalmol**, v. 75, n. 9, p. 565, 1991.
- 30- CARRILLO-MUNÓZ, A. J. et al. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de Candida albicans. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, p. 501-108, 2001.
- 31- GARCÍA-MARTOS, P. et al. Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar Candida. **Rev Iberoam Micol**, v.15, p. 131-135, 1998.
- 32- SAFDAR, A. et al. Prospective study of Candida species in patients at a comprehensive cancer center. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 45, p. 2129-2133, 2001.
- 33- VIJAYA, D., HARSHA, T. R., NAGARATHNAMMA, T. Candida speciation using chrom agar. **J Clin**

**Diagn Res**, v. 2011, n. 5, p. 755-757, 2011

- 34- AGARWAL, S. et al. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. **Indian J Med Microbiol**, v.29, p.172-177, 2011.
- 35- GODOY, P., ALMEIDA, L. P., COLOMBO. A. L. Identificación de Candida albicans utilizando el medio cromogénico Albicans ID. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, p. 197-199, 2001.
- 36- EDELSTEIN, S.L. et al. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on Adverse Reactions Reported From 2007 to 2014. **Cornea**, v. 35, n.7, p.917-26, 2016.
- 37- WILLCOX, M. D. P. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. **Experimental Eye Research**, v. 117, p. 99-105, 2013.
- 38- Eye Bank Association of America (EBAA). **Medical Standards – October 2011**. Washington, 2011. Disponível em: <<http://restoresight.org/wpcontent/uploads/2011/11/Medical-Standards-October-2011.pdf>> Acesso em 30 nov. 2016.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Das 136 amostras analisadas, 11 (8,08%) apresentaram o crescimento de colônias fúngicas. Na análise macroscópica e microscópica verificou-se a compatibilidade com a morfologia leveduriformes. Das 11 culturas positivas para fungos, após subcultivo em CHROMagar™ Candida foram identificadas presuntivamente 04 (36,36%) espécies de *Candida glabrata*, 03 (27,27%) de *Candida krusei*, 02 (18,18%) de *Candida albicans* e 02 (18,18%) de *Candida tropicalis*. No teste utilizando o kit comercial Candifast® foram confirmadas as mesmas identificações presuntivas realizadas anteriormente. Quanto ao perfil de resistência aos antifúngicos, *Candida glabrata* apresentou 75% de resistência a anfotericina B, nistatina, econazol, cetoconazol, miconazol e fluconazol, exceto a flucitosina onde apresentou 50% de resistência. *Candida krusei* apresentou 33,3% de resistência apenas para anfotericina B. *Candida albicans* apresentou 50% de resistência a anfotericina B, flucitosina e cetaconazol. Já *Candida tropicalis* apresentou 50% de resistência apenas para a anfotericina B.

A taxa de contaminação por fungos leveduriformes em córneas conservadas por bancos de tecidos oculares humanos é consistente aos relatados na literatura. *Candida glabrata* foi a espécie mais comumente isolada, mas também identificamos positividade para *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. As culturas positivas já apresentam resistência aos antifúngicos, principalmente a espécie *Candida glabrata*. Mais estudos precisam ser feitos para elucidar esta questão, como a comparação do cultivo de córneas processadas com e sem desinfecção prévia com iodopovidona, ou até mesmo o efeito de antifúngicos suplementados aos meios de conservação no seguimento de transplantados.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Relatório de avaliação dos dados de produção dos bancos de tecidos humanos** - 2015. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2860283/Relat%C3%B3rio+de+Avalia%C3%A7%C3%A3o+dos+Dados+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+dos+Bancos+de+Tecidos+%E2%80%93+Ano+2015.pdf/a3d26106-f4bb-4015-b972-83ad39546e9c>>. Acesso em 29 nov. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS - ABTO. **Registro Brasileiro de Transplantes de Órgãos** – 2015. São Paulo: ABTO, 2015.

BAER, J.C.; NIRANKARI, V.S.; GLAROS, D.S. Streptococcal endophthalmitis from contaminated donor corneas after keratoplasty: Clinical and laboratory investigation. **Arch Ophthalmol**, v.106. n.4, p.517-20, 1988.

BECHARA, S. J. et al. Incidence and prophylaxis of postoperative endophthalmitis in cases or penetrating keratoplasties. **Rev Bras Oftalmol**, v.46, n.6, p.303-307, 1987.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 55, de 11 de dezembro de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2015. Seção 1, p. 55-72.

CALIX NETTO, M. J. et al. Principais indicações de transplante penetrante de córnea em um serviço de referência no interior de São Paulo (Sorocaba - SP, Brasil). **Arq. Bras. Oftalmol**, v.69, n.5, p.661-664, 2006.

CHEN, J. Y. et al. Endophthalmitis After Penetrating Keratoplasty. **Ophthalmology**, v. 122, n. 1, p. 25-30, 2015.

DURAND, M.L. Endophthalmitis. **Clin Microbiol Infect**, v.19, n. 13, p. 227-234, 2013.

EDELSTEIN, S. L. et al. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on Adverse Reactions Reported From 2007 to 2014. **Cornea**, v.0, n.0, p. 01-10, 2016.

GENTILE, R. C. et al. Microbiological Spectrum and Antibiotic Sensitivity in Endophthalmitis. **Ophthalmology**, v. 121, n.8, p. 1634-1642.

GODOY, G. et al. Candida albicans endophthalmitis following penetrating corneal graft - Case report. **Arq Bras Oftalmol**, v.67, p.349-52, 2004.

HASSAN, S. et al. Infectious Disease Risk Factors of Corneal Graft Donors. **Archives of ophthalmology**, v.126, n.2, p.235-239, 2008.

HOLLAND, E. J. et al. **Doenças da Superfície Ocular: Córnea, Conjuntiva e Filme Lacrimal**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estimativas da população residente no Brasil**. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas\\_de\\_Populacao/Estimativas\\_2015/estimativa\\_dou\\_2015\\_20150915.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2015/estimativa_dou_2015_20150915.pdf). Acesso em 29 nov. 2016.

KEYHANI, K. et al. The incidence of fungal keratitis and endophthalmitis following penetrating keratoplasty. **Cornea**, v.24, n.3, p.288-291, 2005.

KLOESS, P. M. et al. Bacterial and fungal endophthalmitis after penetrating keratoplasty. **Am J Ophthalmol**, v.115, n.3, p.309-316, 1993. Erratum in: **Am J Ophthalmol**, v.115, n.4, p.548, 1993.

KRACHMER, J. H. et al. **Cornea**. 3th ed. United States: Mosby/Elsevier, 2011.

KUMAR, V.; JON, C. A.; ABBAS, A. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 9ª edição. Brasil: Elsevier, 2015.



LE, Q. et al. Early-Onset *Candida glabrata* Interface Keratitis after Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. **Optometry and Vision Science**, v.92, n. 5, p.93-96, 2015.

MOREIRA, H et al. **Banco de olhos, transplante de córnea**. 1ª edição. Brasil: Cultura Médica, 2008.

MÜLLER, G. G. et al. Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. **Rev Bras Oftalmol**, v.72, n.2, p.132-41, 2013.

OLIVEIRA, P. R. et al . Ceratite fúngica. **Arq. Bras. Oftalmol**, v. 64, n.1, p.75-79, 2001.

PARDOS, G. J.; GALLAGHER, M. A. Microbial contamination of donor eyes. A retrospective study. **Arch. Ophthalmol**, v.100, n.10, p.1611-1613, 1982.

SCHIRMBECK, T et al. Endophthalmitis: an analysis of 58 cases. **Arq. Bras. Oftalmol**, v.63, n.1, p. 39-44, 2000.

TABAN, M et al. Incidence of acute endophthalmitis following penetrating keratoplasty: a systematic review. **Arch Ophthalmol**, v. 123, n. 5, p. 605-609, 2005.

WILHELMUS, K. R.; HASSAN, S. S. The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. **Ophthalmology**, v.114, n.3, p.440-445, 2007.

WILLCOX, M. D. P. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. **Experimental Eye Research**, v. 117, p. 99-105, 2013.

WYKOFF, C. C. et al. Exogenous Fungal Endophthalmitis: Microbiology and Clinical Outcomes. **Ophthalmology**, v. 115, n. 9, p.1501-1507.

ZIRM, E. K. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). **Refract Corneal Surg**, v. 5, n. 4, p.258-261.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELL AND TISSUE BANKING



### CELL AND TISSUE BANKING

International Journal for Banking, Engineering and Transplantation of Cells and Tissues  
Incorporating Advances in Tissue Banking

Editor-in-Chief: R. von Versen  
ISSN: 1389-9333 (print version)  
ISSN: 1573-6814 (electronic version)  
Journal no. 10561

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

### MANUSCRIPT SUBMISSION

#### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### *Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### TITLE PAGE

#### *Title Page*

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

#### *Abstract*

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

## *Keywords*

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

## *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

## *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

## *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

## *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

## Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article  
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8  
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:  
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- Article by DOI  
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book  
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter  
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document  
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation  
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California  
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- ISSN LTWA  
If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

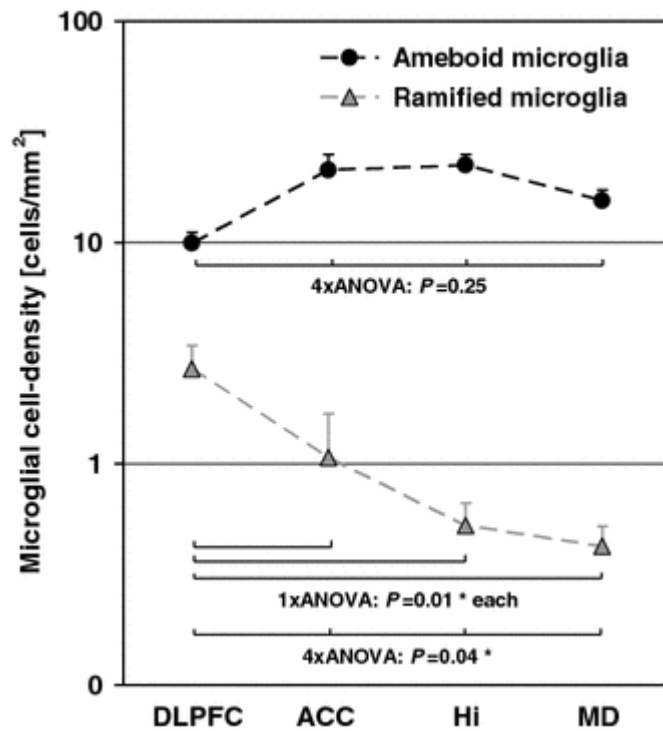
### TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

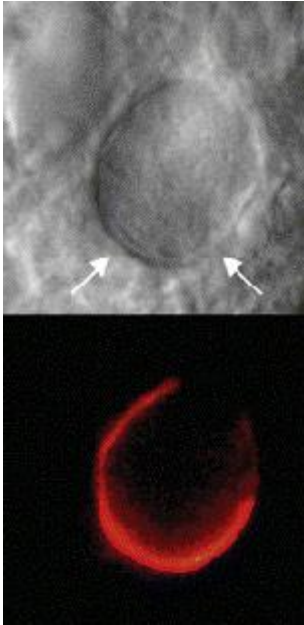
*Electronic Figure Submission*

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

*Line Art*

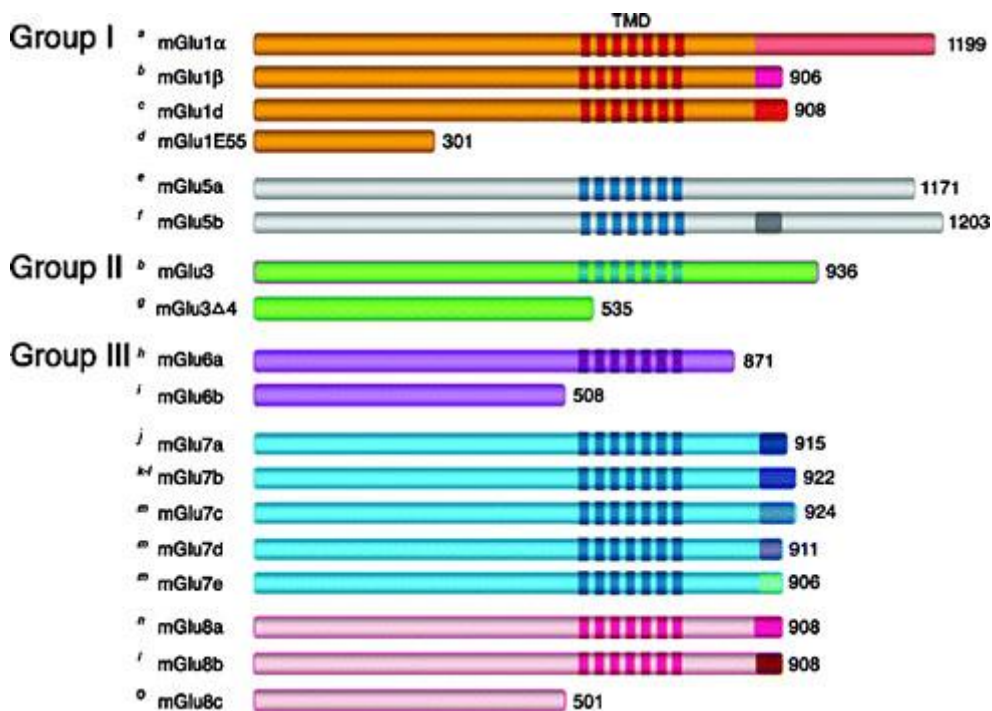
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.

- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### *Figure Lettering*

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### *Figure Numbering*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### *Figure Captions*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### *Figure Placement and Size*

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

#### *Submission*

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### *Audio, Video, and Animations*

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### *Text and Presentations*

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### *Spreadsheets*

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

#### *Specialized Formats*

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### *Collecting Multiple Files*

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### *Numbering*

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

#### *Captions*

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.



### *Processing of supplementary files*

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

#### ENGLISH LANGUAGE SUPPORT

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.
- [English language tutorial](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

#### ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

**Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes in authorship, or in the order of authors, are not accepted **after** the acceptance for publication of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance for publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

#### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

#### DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts

of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):  
The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

#### AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### *Copyright transfer*

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

- [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#)

### *Offprints*

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### *Color illustrations*

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### *Proof reading*

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### *Online First*

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

### OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Open Choice](#)

### *Copyright and license term – CC BY*

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- [Find more about the license agreement](#)