

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL

LUIZA ROCHA VILELA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS CONTRA
Phythium insidiosum e *Phythium periculosum* ISOLADOS DE
CERATITES EM HUMANOS**

BELO HORIZONTE

2023

LUIZA ROCHA VILELA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS CONTRA
Phythium insidiosum e *Phythium periculosum* ISOLADOS DE
CERATITES EM HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Ciências da Saúde. Infectologia e Medicina Tropical. Oftalmologia Tropical

ORIENTADORA: Prof. Dra. Raquel Virginia Rocha Vilela

COORIENTADOR: Prof. Dr. Alberto Leonel Mendoza

BELO HORIZONTE

2023

V699a Vilela, Luiza Rocha.
Avaliação in vitro de fármacos antifúngicos contra *Phythium insidiosum* e *Phythium periculosum* isolados de Ceratites em humanos [recursos eletrônicos]. / Luiza Rocha Vilela. - - Belo Horizonte: 2024.
125f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Raquel Virginia Rocha Vilela.
Coorientador (a): Alberto Leonel Mendoza.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Pythium. 2. Pitiose. 3. Ceratite. 4. Terapêutica. 5. Antifúngicos. 6. Anfotericina B. 7. Dissertação Acadêmica. I. Vilela, Raquel Virginia Rocha. II. Mendoza, Alberto Leonel. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WW 225



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"AVALIAÇÃO IN VITRO DE FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS CONTRA *PHYTHIUM INSIDIOSUM* E
PHYTHIUM PERICULOSUM ISOLADOS DE CERATITE EM HUMANOS"**

LUIZA ROCHA VILELA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 31 de julho de 2023, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

PROFA. CRISTIANE ALVES DA SILVA MENEZES

UFMG

PROFA. ADRIANA OLIVEIRA COSTA

UFMG

PROF. ALBERTO LEONEL MENDOZA – Coorientador

MICHIGAN STATE UNIVERSITY

PROFA. RAQUEL VIRGÍNIA ROCHA VILELA - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Alberto Leonel Mendoza, Usuário Externo**, em 01/08/2023, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 01/08/2023, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 01/08/2023, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Virginia Rocha Vilela, Professora do Magistério Superior**, em 12/08/2023, às 09:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2510743** e o código CRC **E17B05A8**.

Para minhas filhas, meus presentes de Deus,
Àquela que ainda não nasceu e já tem meu coração,
por já ser motivação para ser o melhor exemplo de pessoa e profissional.
Àquela de quatro patas, Dorothy,
pelo amor incondicional e companheirismo incansável.

AGRADECIMENTOS

Ao Bruno, meu amor, por sempre compreender e apoiar minha dedicação profissional, mesmo que isso signifique minha ausência. E por me ajudar com essa dissertação, no desenvolvimento e no apoio emocional. Sem dúvida, te ter ao meu lado possibilitou a realização de um trabalho muito melhor, da maneira mais leve possível.

À professora Raquel, por acreditar e confiar em mim, em todas as fases do processo. Sua ajuda e seu guia foram essenciais para esse trabalho. Mas, principalmente, te agradeço por ser sempre exemplo de profissionalismo, brilhantismo e ser humano. Certeza que se, um dia, eu conseguir ser metade da pessoa que você é, terei alcançado meu objetivo de vida. É um privilégio poder te chamar de mãe e poder contar com você na vida e na academia.

Ao professor Leonel, pela paciência em atender todas as minhas solicitações, responder aos meus questionamentos e instigar o raciocínio científico durante todo o processo. Agradeço a acolhida sincera, sempre, abrindo as portas do seu laboratório, e a generosidade ao compartilhar todo seu vasto conhecimento.

À Maria do Carmo, pela competência, cuidado e ajuda incansáveis que tornaram possível a conclusão desse trabalho com o refinamento e adequação necessários. Agradeço todo tempo dedicado, cada hora na frente do computador com o olhar afiado e todas as correções, sugestões e considerações feitas com tanta dedicação.

À Camila, pelo auxílio e ajuda com a parte prática e na revisão sistemática da parte escrita. Certamente sua contribuição foi essencial para a viabilização desse estudo.

À UFMG por me acolher e permitir a realização do meu mestrado em tão renomada instituição e à MSU por, generosamente, abrir as portas para a realização da parte prática, não medindo esforços para que esse trabalho tivesse toda excelência.

À Deus que me guiou durante todo o caminho, me dando forças e permitindo que eu continuasse. Agradeço pela oportunidade, por me trazer tantas bênçãos e por colocar, em minha vida, todas essas pessoas especiais que estiveram ao meu lado e trabalharam comigo para mais essa realização.

RESUMO

Pythium insidiosum e *Pythium periculosum* são oomicetos pertencentes ao filo Straminopila e família Pythiaceae. São os agentes etiológicos da pitiose em mamíferos e podem causar ceratites progressivas graves que ameaçam a visão, o globo ocular e regiões adjacentes. Clinicamente, microbiologicamente e fenotipicamente, assemelham-se muito às ceratites fúngicas; sendo, portanto, conhecidos como microrganismos “parafungos”. Devido à ausência de protocolos para tratamento da pitiose ocular, ao baixo número de estudos em drogas antifúngicas e à pequena taxa de sucesso em tratamentos medicamentosos, esse estudo se propôs avaliar a ação antifúngica *in vitro*. As drogas – anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol – foram testadas em um total de dez amostras, a saber: *P. insidiosum* (seis amostras) e *P. periculosum* (quatro amostras) isoladas de casos de ceratites. Todas as amostras já tinham sido previamente identificadas por PCR, sequenciamento de DNA e análises filogenéticas. Foram utilizados zoosporos, obtidos por zoosporogênese a partir de colônia obtida de um único zoosporo, garantindo homogeneidade da amostra. E realizados E-tests® com leitura posterior da Concentração Inibitória Mínima (MIC, medida em µg/mL). Os resultados obtidos foram uma suscetibilidade de 100% em todas as concentrações de MIC para a anfotericina B. *In vitro*, os microrganismos não se mostraram susceptíveis a nenhuma das demais drogas estudadas. Baseado nesses resultados, a anfotericina B, medicação já utilizada em tratamentos de ceratites, se torna, então, uma opção viável de tratamento para casos de ceratites por *P. insidiosum* e *P. periculosum*. No entanto, faz-se necessário um estudo mais aprofundado da ação da droga *in vivo* para maior elucidação e definição de protocolos definitivos para tratamento das ceratites causadas por esses oomicetos patogênicos.

Palavras chave: *Pythium*. *Pythium insidiosum*. *Pythium periculosum*. Ceratites. Tratamento. Antifúngico. Anfotericina B.

ABSTRACT

Pythium insidiosum and *Pythium periculorum* are oomycetes in the phylum Straminipila and family Pythiaceae. They are the etiologic agent of a life-threatening infection termed pythiosis. They also have been reported causing severe progressive keratitis threatening the vision, the eyeball, and adjacent anatomical areas. They also have tropism for blood vessels causing deadly systemic infections. Clinically, microbiologically, and phenotypically, they closely resemble fungal keratitis, hence they are also known as “parafungi”. Due to the absence of management protocols for the treatment for ocular pythiosis, the low number of studies on antifungal drugs and the low success rate of drug treatments, this study proposes an *in vitro* evaluation of several antifungal drugs including, amphotericin B, fluconazole, ketoconazole, itraconazole and posaconazole. These drugs were tested in a total of ten isolates of *P. insidiosum* (six isolates) and *P. periculorum* (four isolates) recovered from keratitis cases. All isolates were previously identified by PCR, DNA sequencing and phylogenetic analysis. Zoosporogenesis was induced in all isolates from a colony originated from a single zoospore, ensuring homogeneity of the tested cultures. To obtain the Minimum Inhibitory Concentration (MIC, measured in µg/mL), the above antifungal drugs were evaluated using E-tests®. The recorded results showed a susceptibility of 100% at all concentrations of MIC for amphotericin B. All *P. insidiosum* and *P. periculorum* isolates in this study were resistant to the remaining antifungals drugs. Based on these promising results, amphotericin B, a medication already used in the treatment of keratitis, thus becomes a viable treatment option for cases of keratitis caused by these pathogenic oomycetes. However, it is necessary to perform more antifungal studies about its action *in vivo* to propose a definitive protocol for the diagnosis and management of pythiosis keratitis.

Keywords: *Pythium*. *Pythium insidiosum*. *Pythium periculorum*. Keratitis. Treatment. Antifungal. Amphotericin B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Úlcera de córnea de etiologia bacteriana (<i>Staphylococs aureus</i>).....	23
Figura 2 - Úlcera de córnea de etiologia fúngica.	23
Figura 3 - Ceratite/úlcera de córnea de etiologia bacteriana (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).	24
Figura 4 - Ceratites/úlceras de córnea de etiologia bacteriana.	24
Figura 5 - Ceratites/úlceras de córnea de etiologia fúngica.	25
Figura 6 - Úlcera de córnea de etiologia bacteriana.....	25
Figura 7 - Ceratites/úlceras de córnea de diferentes etiologias.	26
Figura 8 - Evolução de uma úlcera fúngica.	27
Figura 9 - Localização filogenética de <i>Phytium spp.</i> com outros microrganismos eucariontes.	43
Figura 10 - Distribuição geográfica da pitiose.	46
Figura 11 - Ciclo de vida de <i>Pythium insidiosum</i> na natureza.	48
Figura 12- Aspecto morfológico de úlceras corneanas.....	53
Figura 13– Evolução de úlcera de córnea por <i>P. insidiosum</i>	54
Figura 14 – Microscopia confocal: estruturas ramificadas altamente reflexivas que se assemelham a hifas fúngicas.....	56
Figura 15 - Filamentos em córnea infectada - Microscopia confocal.....	57
Figura 16- Diagnóstico Laboratorial - Microbiologia.....	59
Figura 17- Hifas coradas com metanamina prata	60
Figura 18- Coloração com KOH e visualização de zoosporos.	60
Figura 19- Colorações para visualização das hifas de <i>P. insidiosum</i>	61
Figura 20 – Úlcera corneana e meios diagnósticos de sua etiologia.....	61

Figura 21 – Histopatologia da ceratite por <i>P. insidiosum</i>	62
Figura 22 - Morfologia do <i>Pythium insidiosum</i>	64
Figura 23 – Colorações comparativas em hifas fúngicas e de <i>P. insidiosum</i>	65
Figura 24 – Coloração IKI-H ₂ SO ₄ comparando fungos e <i>Pythium</i>	66
Figura 25 – Morfologias de <i>P. insidiosum</i> cultivados.	67
Figura 26- Imagens de cultura de ceratite por <i>Pythium insidiosum</i>	67
Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura dos zoosporos móveis de <i>P. insidiosum</i>	70
Figura 28 – Processo esquemático da indução à zoosporogênese para obtenção de zoosporos de <i>P. insidiosum</i> e <i>P. periculosum</i>	80
Figura 29 – Exemplo de fita de E-test®.....	82
Figura 30 – Foto demonstrativa do posicionamento das fitas do E-test®.	82
Figura 31 – Esquema representando semeadura dos zoosporos, aplicação das fitas do E-test® e leitura da MIC.	84
Figura 32 – Amostra MTPI 74 de <i>P. insidiosum</i>	88
Figura 33 – Amostra MTPI 75 de <i>P. insidiosum</i>	89
Figura 34 – Amostra MTPI 76 de <i>P. insidiosum</i>	90
Figura 35 – Amostra MTPI 77 de <i>P. insidiosum</i>	91
Figura 36– Amostra MTPI 79 de <i>P. insidiosum</i>	92
Figura 37 – Amostra MTPI 81 de <i>P. insidiosum</i>	93
Figura 38 – Amostra MTPI 72 de <i>P. periculosum</i>	94
Figura 39 – Amostra MTPI 80 de <i>P. periculosum</i>	95
Figura 40 – Amostra MTPI 82 de <i>P. periculosum</i>	96
Figura 41 – Amostra MTPI 46 de <i>P. periculosum</i>	87

Figura 42 – Protocolo de tratamento proposto para manejo e tratamento de ceratites causadas por <i>Pythium</i>	103
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela 1 – Sumário das Características Clínicas e Fatores de Risco das Principais Etiologias de Ceratites Infecciosas 52

Tabela 2 – Relação da amostra utilizada com o agente etiológico e seu resultado no E-test®. 87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado

AFM – Ágar farinha de milho

AMB – Anfotericina B

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose 2%

BLD – Laboratório de Diagnóstico Biomédico da Universidade Michigan State

CA – Câmara Anterior

CFG – Caspofungina

CFW – Branco de calcofluor

CI – Ceratites Infecciosas

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

COX – Citocromo C Oxidase

COXII – Citocromo C Oxidase Subunidade II

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ECZ – Econazol

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

ELI025 – Proteína semelhante à elicetina

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FLU – Fluconazol

FCZ – Fluconazol

GMS – Metanamina prata de Grocott-Gomori

HA - Hemaglutinação

H&E – Hematoxilina e eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPE – Exame histopatológico

ICT – Imunocromatografia

ICZ - Itraconazol

ID – Imunodifusão

ITS – Espaçador Interno Transcrito

ITC – Itraconazol

KCZ – Cetoconazol

KE – Cetoconazol

KOH – Hidróxido de potássio

KOH-CFW – Combinação das colorações hidróxido de potássio e branco de calcofluor

LPCB – Lactofenol azul de algodão

MA - Massachusetts

MALDI-TOF – Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser

MCZ - Miconazol

MD – Membrana de Descemet

MFG – Micafungina

MIC – Concentração Inibitória Mínima

MSU – Michigan State University

MTPI – MedTech-*Pythium*

Multiplex PCR – Reação em Cadeia da Polimerase de várias amostras de DNA

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NJ – *New Jersey*

NTM – Natamicina

PAS – Ácido periódico com reativo de Schiff

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCR LAMP – Reação em Cadeia da Polimerase com amplificação isotérmica mediada por *loop*

PCZ – Posaconazol

PDA – Ágar batata dextrose

pH – Potencial hidrogeniônico

POS – Posaconazol

rRNA – Ácido Ribonucléico Ribossomal

RPM – Rotações por minuto

SAR – Super Grupo Straminopiles, Alveolates e Rhizaria

SDB – Caldo de Dextrose Sabouraud 2%

TPK – Ceratoplastia penetrante terapêutica

TSA – Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

VCZ – Voriconazol

5FC – Fluorcitocina ou flucitocina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Ceratites infecciosas.....	20
2.1.1. Sinais e Sintomas das Ceratites Infecciosas	21
2.1.2. Etiologias das Ceratites Infecciosas	28
2.2. Ceratite micótica.....	28
2.2.1. Tratamento	29
2.3. Ceratite por <i>Pythium</i> spp.	41
2.3.1. Classificação taxonômica e Características do <i>P. insidiosum</i> e <i>P. periculosum</i>	41
2.3.2. Epidemiologia e Distribuição Geográfica do <i>P. insidiosum</i> e <i>P. periculosum</i>	45
2.3.3. Considerações Gerais das Ceratites por <i>P. insidiosum</i> e <i>P. periculosum</i>	49
2.3.4. Fatores de Risco para Ceratites por <i>Pythium</i> spp	49
2.3.5. Características Clínicas e Evolução das Ceratites por <i>Pythium</i> spp.	50
2.3.6. Exames Complementares e Diagnóstico Laboratorial	55
2.3.7. Tratamento.....	71
2.4. Pitiose no Brasil	74
3. JUSTIFICATIVA	75
4. OBJETIVOS	77
4.1. Objetivo Geral.....	77
4.2. Objetivos Específicos	77
5. MATERIAIS E MÉTODOS	78
5.1. Seleção das amostras de <i>Pythium insidiosum</i> e <i>Pythium periculosum</i>	78
5.2. Introdução a zoosporogênese	78
5.3. Fármacos antifúngicos	80
5.4. E-test®	80
6. RESULTADOS	86
7. DISCUSSÃO.....	98
8. CONCLUSÃO	104
9. REFERÊNCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

A pitiose humana, doença causada pelos microorganismos pertencentes às espécies *Pythium insidiosum* e *Pythium periculosum*, é grave e ameaça a vida dos pacientes. Pode acometer pele, subcutâneo, olhos ou se apresentar de forma sistêmica. *Pythium* spp. são oomicetos que residem em ambientes aquáticos, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Pertencem ao reino Straminipila, classe Oomycete, filo Oomycota e família Pythiaceae (MENDOZA; VILELA, 2013).

No acometimento oftalmológico, causam ceratite com risco de visão e possuem quadro clínico muito semelhante aos de ceratite fúngica, mimetizam fungos zigomicetos devido à sua ramificação. Por isso, são, também, chamados de “parafungo”. No entanto, não possuem ergosterol na parede celular. O primeiro caso de ceratite foi relatado em 1988; desde então, tem havido inúmeros relatos em todo o mundo (GURNANI *et al.*, 2023).

Mais recentemente, a ceratite por *Pythium* tem atraído atenção devido à alta virulência do microorganismo, falta de modalidades de diagnóstico padrão, atraso no diagnóstico e tratamento e alta taxa de recorrência (AGARWAL *et al.*, 2019). As características clínicas típicas e que mimetizam ceratite fúngica são ruptura epitelial, infiltrado subepitelial, infiltrado estromal tipo algodão, exsudatos endoteliais, lesões satélites, descemetocle, infiltrados anelares, hipópio da câmara anterior, adelgaçamento da córnea, fusão e perfuração (GURNANI *et al.*, 2023).

As características clássicas de *Pythium* são pontos reticulares, tentáculos, bordas hifadas, sulcos e disseminação limbal precoce (PUANGSRICHARN *et al.*, 2021). O diagnóstico laboratorial é feito por exame microbiológico por esfregaço e cultura em ágar e identificação de zoosporos (MITTAL *et al.*, 2017). Diversos autores relataram sobre o tratamento clínico com antifúngicos (natamicina 5%, itraconazol 1% e voriconazol 1%), e ceratoplastia terapêutica (BAGGA *et al.*, 2018; HASHIKA *et al.*, 2019). Contudo, os protocolos de tratamento variam de centro para centro, e a terapia antifúngica específica permanece indeterminada (BAGGA *et al.*, 2018; HASIKA *et al.*, 2019; KALRA *et al.*, 2020;

AHIRWAR *et al.*, 2021; BAGGA *et al.*, 2021; GURNANI *et al.*, 2021; GURNANI *et al.*, 2022)

Atualmente, o diagnóstico e o tratamento ainda representam desafios para o oftalmologista, uma vez que as características clínicas, morfológicas e microbiológicas do *Pythium* se assemelham muito às da ceratite fúngica. O prognóstico da ceratite por *Pythium* spp. depende da prevalência regional da espécie, do tamanho do infiltrado corneano, da localização e da densidade no momento da apresentação inicial. Baseado nesses parâmetros, se deve definir a estratégia de tratamento inicial (GURNANI *et al.*, 2023).

Alguns autores descreveram sucesso na terapia clínica das ceratites por *Pythium* com o antifúngico anfotericina B (SEKHON *et al.*, 1992; HE *et al.*, 2016). Baseado nisso e na experiência de grande parte dos oftalmologistas brasileiros na utilização de drogas antifúngicas (MÜLLER *et al.*, 2013), o presente trabalho foi proposto.

Foram testadas, através do método de E-test®, as drogas anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol em amostras, contendo zoosporos, de *P. insidiosum* e *P. periculosum* provenientes de casos de ceratites humanas.

O objetivo foi determinar a ação *in vitro* desses antifúngicos para auxiliar os oftalmologistas na seleção de drogas mais apropriadas para o tratamento clínico das ceratites por *Pythium*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CERATITES INFECCIOSAS

A ceratite infecciosa (CI) é uma das principais causas de perda visual evitável no mundo (WHITCHER *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2012). A cegueira causada pelas doenças da córnea representa um peso enorme, para o indivíduo acometido e para a comunidade em que está inserido. Essa carga é ainda mais impactante se for considerado que essa doença tende a acometer pessoas em faixas etárias mais jovens, diferentemente do que ocorre ao se avaliar outras causas de cegueira, como o glaucoma e a catarata (BURTON, 2009). A incidência da CI apresenta variação entre os países, de acordo com seu grau de desenvolvimento. Exemplificando, encontra-se altos índices na Índia – 113 por 100.000 pessoas/ano – (GONZALES *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 2012) e baixos índices nos EUA – 11 por 100.000 pessoas/ano – (ERIE *et al.*, 1993). Sob o aspecto agente etiológico das CI, também é possível verificar 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, fato provavelmente associado 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 oftalmológico, principalmente na biomicroscopia óptica, é possível elaborar a hipótese do agente etiológico e, com isso, iniciar o tratamento. No entanto, os sinais clínicos podem ser inespecíficos e confusos o que corrobora para o equívoco na determinação da etiologia. Portanto, o exame laboratorial de cultura do raspado de córnea com isolamento do agente é considerado o padrão-ouro de diagnóstico etiológico (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 referência considerada (ALFONSO, 2004; LASPINA *et al.*, 2004; FEILMEIER *et al.*, 2010; FURLANETTO *et al.*, 2010; IBRAHIM *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2012; MARANGON; OTRI *et al.*, 2013; MILLER; MARUJO *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2015). 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 (DUARTE, 2016). Esses exames, algumas vezes, mantêm os resultados negativos, sendo necessário, portanto, considerar se tratem de outros patógenos, bem como, considerar a execução de outros meios de diagnósticos como PCR (reação em cadeia da polimerase), padrão-ouro para determinação precisa da etiologia dos microrganismos (GURNANI *et al.*, 2022). Essa técnica permite maior rapidez e precisão 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) e outros agentes causadores de CI como, por exemplo, *Pythium insidiosum*, *Pythium periculosum* e *Lagenidium albertoi* (OTRI *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2011; REINPRAYOON *et al.*, 2013).

Os tratamentos com antimicrobianos tópicos e, em casos mais graves, os procedimentos cirúrgicos têm 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 inerente (PANDA *et al.*, 2007). O diagnóstico etiológico precoce e o tratamento adequado, imediato, são fatores determinantes para um bom resultado final com resolução da CI, apresentando melhor prognóstico na preservação da acuidade visual (DART; SAW; KILVINGTON, 2009).

2.1.1. Sinais e Sintomas das Ceratites Infecciosas

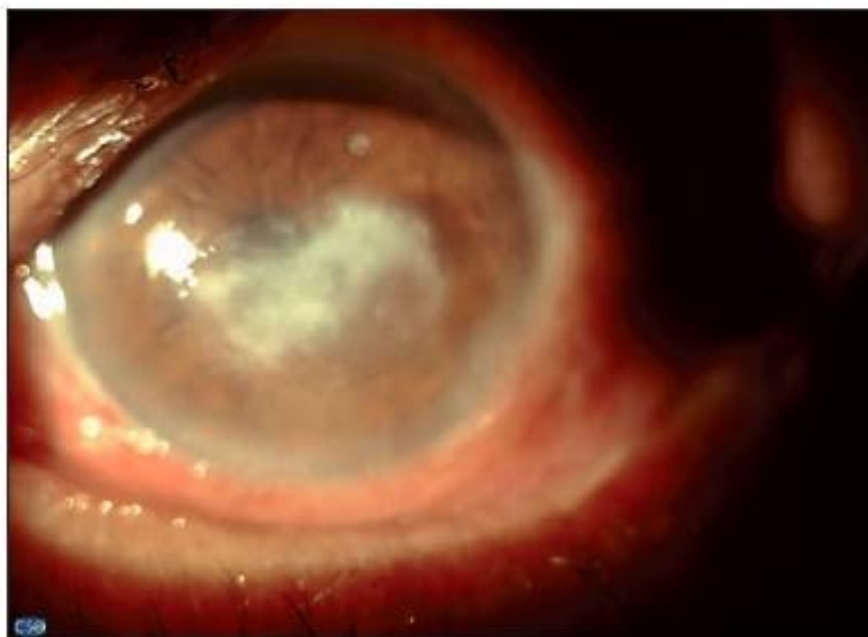
A CI apresenta um conjunto de sinais e sintomas floreado. O sintoma mais específico é dor ocular. A córnea apresenta um rico plexo de inervação sensitiva, localizado abaixo do epitélio. Quando esta encontra-se íntegra, as terminações nervosas se mantêm protegidas. Ao ocorrer ruptura da solução de continuidade epitelial, as terminações nervosas são expostas, o que provoca dor aguda e intensa (HÖFLING-LIMA *et al.*, 2016). Já o sinal mais frequente é a diminuição da acuidade visual que pode se manter sem alterações, em casos iniciais e/ou em casos de acometimento mais periférico, ou pode estar bastante diminuída, quando a lesão acomete a córnea na área

do eixo visual. Outros sintomas e sinais comuns são lacrimejamento, hiperemia ocular, fotofobia e dificuldade de manter o olho aberto, embora esses sejam sintomas inespecíficos que podem ocorrer em uma grande variedade de condições e/ou patologias oculares (DUARTE, 2016).

Ao exame biomicroscópico, se pode observar opacidade corneana localizada apenas no epitélio ou já avançando para nível estromal, com diversos diâmetros e posicionamentos corneanos, a depender da gravidade do caso. Essa opacidade decorre da presença de células inflamatórias que, em circunstâncias normais, não estão presentes no tecido corneano (Figura 1). Pode, ainda, haver presença de infiltrado corneano e ulceração, caracterizada por quebra da solução de continuidade (defeito epitelial) associado a perda de tecido com comprometimento do estroma (Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Em alguns casos ocorre apenas erosões puntiformes do epitélio com infiltrado subjacente. A presença de hiperemia e congestão vascular, reação de câmara anterior ou mesmo hipópio é frequente (Figuras 2, 3, 4 e 6). Outro achado possível, principalmente, nas ceratites fúngicas ou parafúngicas, é a presença de lesões satélite (Figuras 1, 7C e 8). O quadro clínico pode variar dependendo do microrganismo responsável pela infecção (DUARTE, 2016).

A evolução do quadro, mesmo após a instituição do tratamento, 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 e colaboradores 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.

Figura 1 – Úlcera de córnea de etiologia bacteriana (*Staphylococs aureus*). Presença de infiltrado corneano central e área de opacificação adjacente, hiperemia conjuntival, lesão satélite.



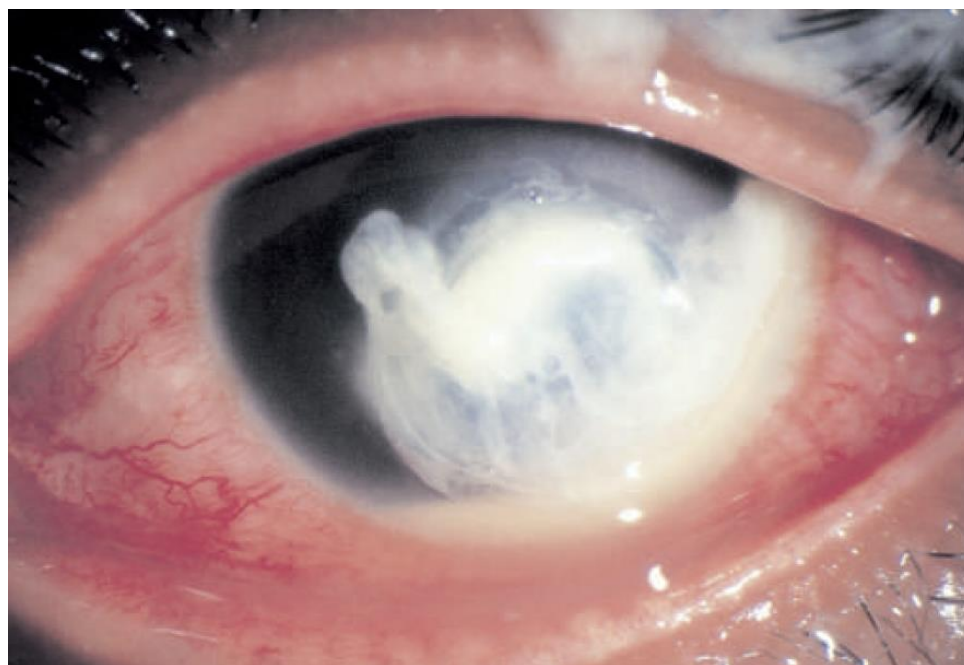
Fonte: Escarião *et al.*, 2013.

Figura 2- Úlcera de córnea de etiologia fúngica. Presença de infiltrado corneano central com afinamento estromal, congestão vascular intensa e hipópio.



Fonte: Escarião *et al.*, 2013.

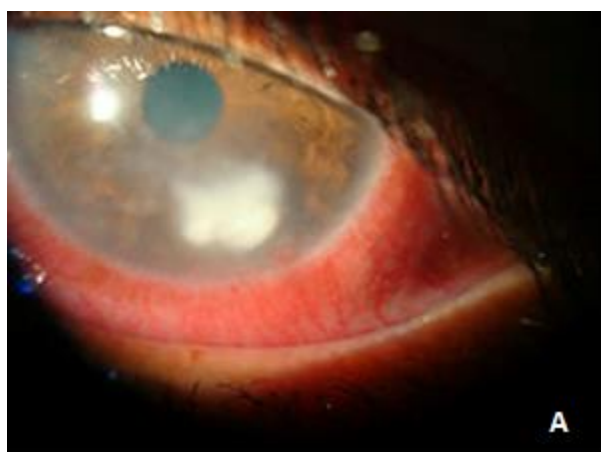
Figura 3- Ceratite/úlceras de córnea de etiologia bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*). Presença de infiltrado corneano acometendo aproximadamente 2/3 da extensão total com afinamento estromal, hiperemia conjuntival difusa e hipóprio.



Fonte: BCSC 2020-2021: External Disease and Cornea, p. 268.

Figura 4- Ceratites/úlceras de córnea de etiologia bacteriana.

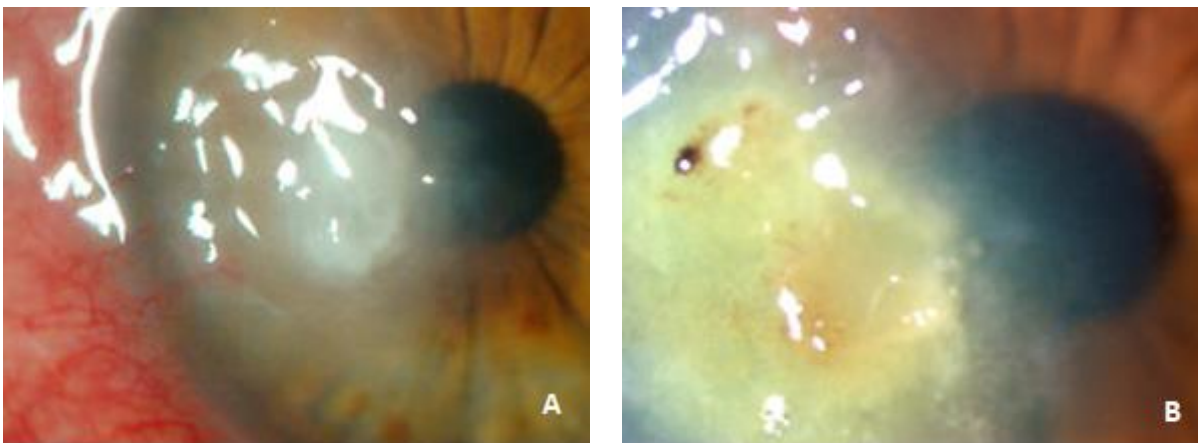
A: infiltrado corneano paracentral acometendo estroma, com opacidades adjacentes e intensa congestão vascular. B: infiltrado ulceroso denso corneano acometendo aproximadamente 2/3 da extensão total com afinamento estromal, hiperemia conjuntival difusa e melt.



Fonte: <https://www.ofthalmosp.com/ceratites> acesso em 14/06/2023 as 11:37.

Figura 5- Ceratites/úlceras de córnea de etiologia fúngica.

A: infiltrado corneano paracentral com melting, vascularização corneana perilesional, necrose estromal, opacidades adjacentes e intensa congestão vascular. B: infiltrado ulceroso denso corneano acometendo parte do eixo visual com afinamento estromal importante.



Fonte: <https://www.ofthalmosp.com/ceratites> acesso em 14/06/2023 as 11:37.

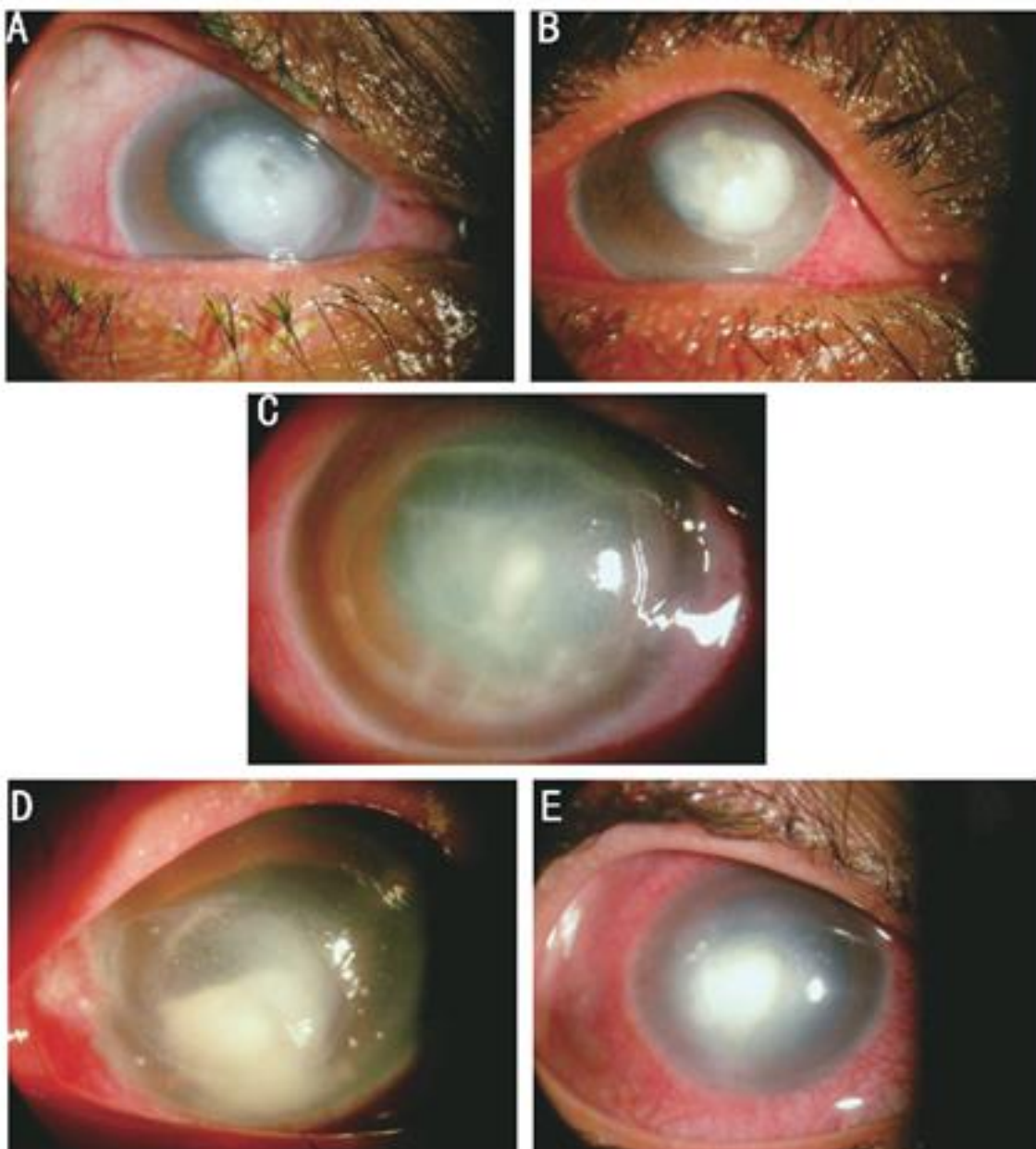
Figura 6- Úlcera de córnea de etiologia bacteriana. Infiltrado corneano paracentral acometendo estroma, com afinamento e intensa congestão vascular.



Fonte: <https://bestpractice.bmj.com/topics/pt-br/561> acesso em 14/06/2023 as 12:10.

Figura 7- Ceratites/úlceras de córnea de diferentes etiologias.

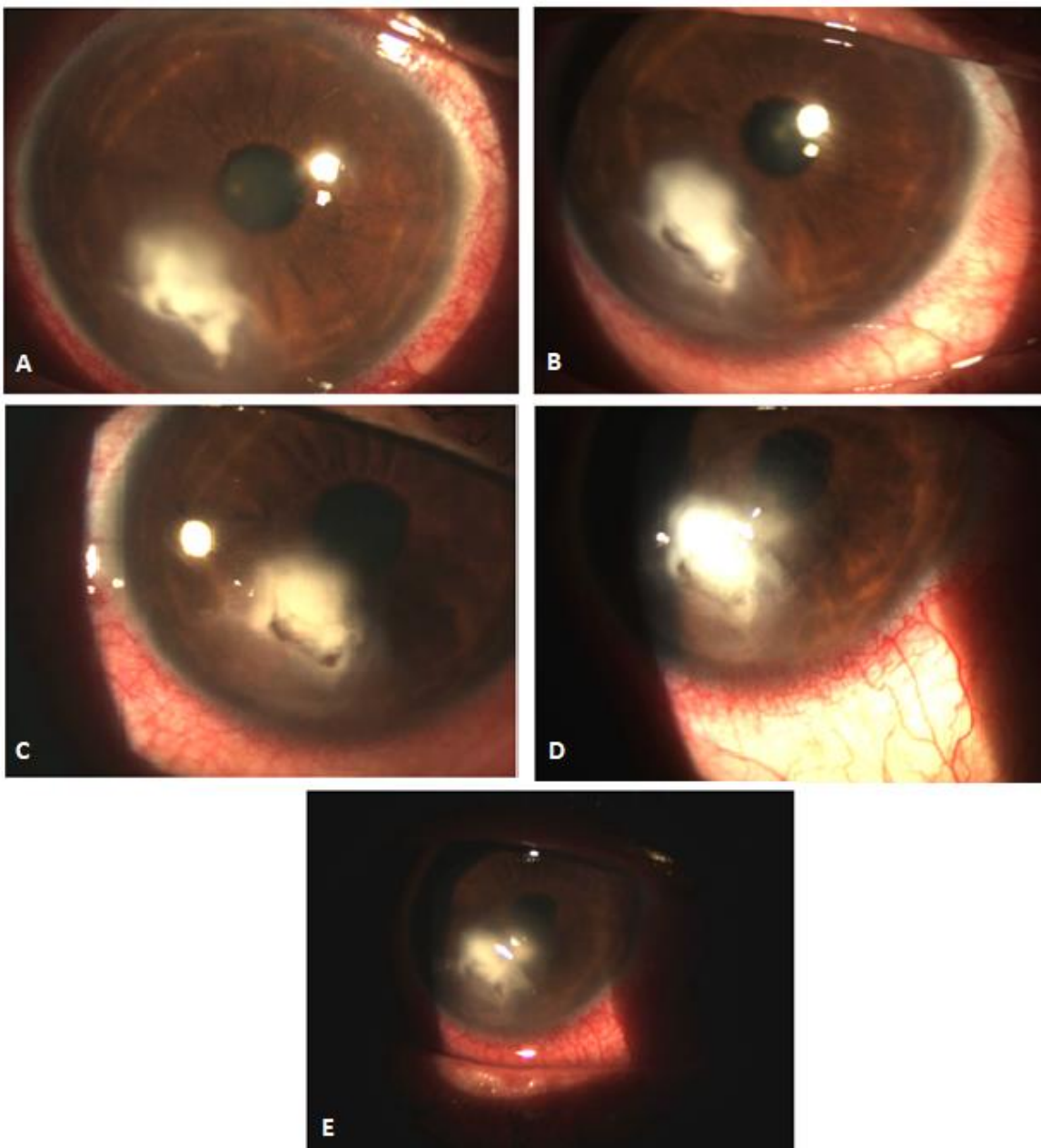
A: *Staphylococcus sp.* – infiltrado corneano central ovalado, com margens bem definidas e edema moderado no restante de córnea não acometida. B: *Pseudomonas sp.* – rápido crescimento periférico e profundo, necrose estromal com superfície irregular, anel ulceral concêntrico com depósito amarelo-esverdeados e hipópio. C: Fungos filamentosos – infiltrado seco, com bordas irregulares e lesões satélites. D: *Candida sp.* – infiltrado focal, elevado e supurativo, simulando úlcera bacteriana. E: *Acanthamoeba* – infiltrado disciforme profundo acometendo porções centro-lateral da córnea.



Fonte: Badawi; Moemen; El-Tantawy, 2017.

Figura 8- Evolução de uma úlcera fúngica.

A: 1º atendimento: lesão ulcerosa em quadrante inferior da córnea apresentando infiltrado infeccioso com bordas irregulares e afinamento corneano; B: 5º dia de evolução: concentração do infiltrado mais em região central, diminuição do halo inflamatório; C: 11º dia de evolução: concentração do infiltrado denso, afinamento da córnea e aparecimento de halo inflamatório infeccioso inferior; D: 20º dia de evolução: formação de halo inflamatório circular em região superior; E: 30º dia de evolução: afinamento corneano inferior a 2/3 da espessura, aparecimento de lesão satélite em região superior do halo inflamatório de aspecto denso.



Fonte: Chang et al., 2011.

2.1.2. Etiologias das Ceratites Infecciosas

A CI é uma patologia decorrente da invasão e proliferação de microrganismos no epitélio e estroma corneano, provocando destruição tecidual e reação inflamatória local. Ela pode ser causada por bactérias, fungos, protozoários ou vírus.

Em relação aos agentes causadores, as bactérias são os microrganismos mais frequentemente encontrados. Dentre elas, as mais prevalentes são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Streptococcus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (GREEN; APEL; STAPLETON, 2008).

Os fungos são responsáveis por 5 a 25% de todas as ceratites infecciosas, sendo o *Aspergillus* sp e o *Fusarium* sp os agentes mais encontrados. Em geral, apresentam quadro clínico semelhante à ceratite bacteriana, mas, embora haja semelhanças, seu diagnóstico deve ser considerado quando o paciente apresenta história de trauma com vegetal e/ou evolução insidiosa (MABON, 1998; CHANG *et al.*, 2011). Ainda considerando o quadro clínico das ceratites fúngicas se observa outras patologias como diagnósticos diferenciais, dentre elas as afecções causadas por *Pythium insidiosum*, *Pythium periculosum* e *Lagenidium albertoi* (MABON, 1998; CHANG *et al.*, 2011; REINPRAYOON *et al.*, 2013).

Outras causas de ceratite são as por infecção por *Acanthamoeba*, apresentando o uso de lentes de contato como principal fator de risco (ALVARENGA *et al.*, 2000), e por vírus, causadas, principalmente, pelos vírus *Herpes simplex* e *Herpes zoster* (FREITAS; ALVARENGA; LIMA, 2001).

2.2. CERATITE MICÓTICA

Frequentemente, as infecções por fungos, *Pythium insidiosum*, *Pythium periculosum* e *Lagenidium albertoi* (os três últimos são conhecidos como agentes parafungos) manifestam-se como alterações corneanas ulcerativas de aspecto supurativo com infiltrados de margens irregulares, coloração branca-acinzentada e a presença de lesões satélites (MABON, 1998; CHANG *et al.*, 2011; REINPRAYOON *et*

al., 2013; MIRAGLIA *et al.*, 2022;). Visto que pode haver o fator de confusão clínica entre as infecções fúngicas, bacterianas e por parafungos, a história clínica é um dos pilares diagnósticos que pode ser muito útil. Relatos como trauma com material vegetal e evolução insidiosa falam a favor de etiologia fúngicas. No entanto, apenas o exame laboratorial pode confirmar a suspeita clínica e como, frequentemente, há um alto índice de culturas falso negativas, o diagnóstico e o tratamento das ceratites fúngicas é desafiador. Esses fatores contribuem para o atraso no início do tratamento correto (KUMAR; CRUZAT; HAMRAH, 2011).

Diferente de outras micoses, não representa uma patologia com risco de vida, porém, certamente é de extremo comprometimento visual e dificuldade terapêutica. Quando é tratada de maneira inadequada, pode levar à acentuada redução da acuidade visual e, em casos mais graves, à cegueira total ou à perda do globo ocular (IMWIDTHAYA, 1994). A conjuntiva ocular apresenta flora fúngica saprófita em sua superfície representando constante ameaça para o olho. Esses microrganismos podem induzir infecções oculares severas, principalmente, em quadros de diminuição da resistência orgânica e uso abusivo de medicações imunossupressoras ou de antibióticos tópicos (SANTOS *et al.*, 2019).

A ruptura da barreira epitelial é o principal fator relacionado com a contaminação exógena. Suas principais causas são os traumas perfurantes com instrumentos cirúrgicos contaminados, as patologias corneanas prévias, o uso prolongado e inadequado de lente de contato, quadros de disfunções palpebrais como triquíase, pequenas abrasões corneanas por corpos estranhos, ceratites, olho seco, ceratopatia em faixa, traumas com vegetais (folhas, galhos de árvore e grãos) ou de origem animal (rabo de vaca ou boi, besouro). Esses eventos estão, supostamente, relacionados ao implante direto dos esporos no estroma corneano ou, indiretamente, à quebra no epitélio da córnea (IMWIDTHAYA, 1994).

2.2.1. Tratamento

A terapia de ceratites infecciosas causadas por fungos apresenta grande desafio na prática oftalmológica. Os principais antifúngicos utilizados, atualmente, pela

oftalmologia brasileira no tratamento de ceratites e endoftalmites fúngicas são os polienos (anfotericina B e natamicina), os azóis (fluconazol, cetoconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, econazol, miconazol), pirimidinas (flucitocina) e equinocandinas (caspofungina, micafungina) (MÜLLER; KARA-JOSÉ; DE CASTRO, 2013). Sendo as duas primeiras classes as mais utilizadas em nosso meio.

POLIENOS

Pertencem a essa classe de antifúngicos a anfotericina B (AMB), a nistatina e a natamicina (NTM). A nistatina deixou de ser utilizada em infecções oculares há algumas décadas devido à sua baixa penetração tecidual, toxicidade e relatos de resistência (REDDY *et al.*, 1982; OLIVEIRA *et al.*, 2001). Entretanto, a AMB e a NTM mantêm-se como as principais drogas no manejo de infecções fúngicas oculares.

Anfotericina B (AMB)

A AMB pertence à família dos antibióticos macrolídeos poliênicos. Foi o primeiro dos antifúngicos de amplo espectro a ser descoberto. Isolada na década de 50, é produto do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Seu uso tornou-se popular, após a aprovação pelo FDA, na década de 60, pela grande eficiência no controle de infecções fúngicas disseminadas (FILIPPIN; SOUZA, 2006; MARTINEZ, 2006; BENNETT, 2007). Em oftalmologia, ainda é a droga de referência.

Apresenta mecanismo de ação complexo o que, provavelmente, justifica seus efeitos sobre outros microrganismos não fúngicos como, por exemplo, na *Leshmania*. A AMB interage, especificamente, com o ergosterol, esteróide constituinte exclusivo da parede celular fúngica, levando à formação de poros através de membranas lipídicas (ZYGMENT, 1966; TEERLINK, De KRUIJFF, DEMEL; 1980; BRAJTBURG *et al.*, 1984; BOLARD; JOLY; YENI, 1993). A alteração da permeabilidade celular permite, então, o escape de íons e metabólitos, principalmente, íons potássio, levando eventualmente à morte celular (BOLARD; JOLY; YENI, 1993). Estudos realizados por SOKOL-

ANDERSON, BRAJTBURG e MEDOFF, em 1986, e BEGGS, em 1994, demonstraram que a AMB em baixas concentrações (0,16 a 0,2mM) produzia perda de 98% do conteúdo intracelular de íons potássio em cultura de *Candida albicans*. Outros experimentos indicaram que danos oxidativos produzidos quando da interação de AMB com a membrana celular de eritrócitos (BRAJTBURG *et al.*, 1985), *Candida albicans* (SOKOL-ANDERSON *et al.*, 1988) e em leucócitos polimorfonucleares (PMN) (MARZZULLO; SOUZA; CAMPA, 1997), apresentaram importante papel no mecanismo de ação lítica do antifúngico. A afinidade de AMB, por colesterol, vem sendo há muito estudada, tanto em modelos celulares como em membranas lipossômicas. Assim, embora a AMB possua maior afinidade por ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (WHITE; PETERSON; HARTSEL, 1989; BOLARD; JOLY; YENI, 1993; MORIBE; MARUYAMA; IWATSURU, 1999; HUANG *et al.*, 2002). A ação de AMB sobre as células do sistema imune merece atenção especial, porque esse antifúngico é amplamente empregado na terapia de pacientes imunodeprimidos. Algumas ações sobre estas células têm sido relatadas por alguns autores. Os estudos demonstraram que AMB exerce efeitos moduladores interessantes, interferindo em muitas das propriedades de leucócitos, como inibição da quimiotaxia (BERNAUDIN *et al.*, 1987), na produção de anticorpos (BOGGS; CHANG; GOUNDALKAR, 1991), nas propriedades funcionais dos leucócitos PMN (JULLIEN *et al.*, 1991) e na diminuição significativa da fagocitose (PALLISTER; WARNOCK, 1989). Além disso, observou-se a redução dessa inibição quando se utilizou AMB associada a emulsão lipídica (AMB-emulsão), com composição química similar a quilomícrons naturais da linfa, sugerindo redução na toxicidade frente a leucócitos PMN (MARZZULLO; SOUZA; CAMPA, 1997). O efeito do DOC no metabolismo oxidativo de leucócitos PMN deve ser considerado, pois se relatou a parcial responsabilidade pela inibição da quimiotaxia destas células, quando altas doses de AMB-DOC foram utilizadas (BERNAUDIN *et al.*, 1987). O aumento do *burst* oxidativo foi mostrado em macrófagos por WILSON, THORSON e SPEERT, em 1991, onde sugeriram que AMB ativaria estas células via efeito direto na membrana plasmática, aumentando a capacidade de produção do ânion superóxido. Outros autores, no entanto, propuseram que o acúmulo

intracelular do antifúngico, ainda viável, permitiria sua ação direta sobre o fungo fagocitado (PONCE; PECHÉRE, 1990), fato que auxiliou alguns autores a direcionar o tratamento de infecções fúngicas, cujo agente replicava-se intracelularmente (GRAYBILL; BOCANEGRA, 1995; GARCIA; ADLER-MOORE; PROFFITT, 2000). Finalmente, um estudo *in vivo*, demonstrou que uma única dose de AMB não possuiu efeito imunossupressor sobre linfócitos e neutrófilos, mas após 3 doses em dias consecutivos, alterações quimiotáticas e fagocíticas foram observadas; entretanto, os efeitos eram variáveis e não possuíam um padrão de dose-resposta (DRUMMOND *et al.*, 1995). Entendendo esse complexo mecanismo de ação e observando o efeito da AMB, em organismos não fúngicos, optou-se por incluir essa droga no estudo *in vitro* para teste de suscetibilidade em amostras de *Pythium* e avaliar, assim, seu efeito sobre o microrganismo em questão.

O nome dessa medicação deriva da sua propriedade anfotérica (solúvel em pH extremos, tanto ácidos como básicos). Tem baixa hidrossolubilidade, sendo necessária a diluição em substâncias lipossolúveis (como DOC) para sua administração. Possui, invariavelmente, ação fungistática, com ação fungicida dependente da concentração atingida no tecido alvo (KHOO; BOND; DENNING, 1994).

Possui atividade tanto, contra fungos filamentosos, como leveduras. Apresenta excelente espectro contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium marneffe*, *Cryptococcus* spp. e agentes causadores da mucormicose. Eficaz também, porém, em menor escala, contra as principais espécies de *Fusarium*. Não tem nenhuma ação antibacteriana (BENNETT, 2007).

A AMB apresenta, também, ação imunopotenciadora através da ligação ao colesterol na membrana celular dos linfócitos.

A administração sistêmica da AMB apresenta pouca penetração nos tecidos oculares, não atingindo níveis terapêuticos na córnea, aquoso ou vítreo (GREEN; BENNETT; GOOS, 1965; O'DAY *et al.* 1986; GOLDBLUM *et al.*, 2000; BENNETT, 2007; KAUR; RANA; SINGH, 2008;). Além disso, seus efeitos colaterais desestimulam o uso dessa via.

A administração direta *in situ* acaba sendo a principal forma de tratamento. É uma das poucas drogas que apresenta descrição na literatura do uso subconjuntival, intraestromal, intracameral e intravítreo, além do seu uso tópico.

O uso tópico na concentração de 1,5 a 5mg/mL é comumente a primeira escolha no tratamento das ceratomicoses. Deve ser preparada a partir da formulação endovenosa (Fungizone® - Bristol-Meyers Squibb, New York, NY) diluída em água destilada. Seu uso é feito em intervalos de 1 em 1 hora no início do tratamento, com espaçamento para cada 4 horas após observado resposta terapêutica. A baixa biodisponibilidade ocular de fármacos a partir de uma forma farmacêutica se deve, principalmente, aos fatores de perda pré-corneais, que incluem a dinâmica lacrimal, o curto tempo de permanência da formulação no saco conjuntival e a relativa impermeabilidade da córnea (GEROSKI; EDELHAUSER, 2001; GHATE; EDELHAUSER, 2006). A administração tópica de uma formulação estimula os mecanismos fisiológicos de proteção, como a produção lacrimal. A maior produção lacrimal (que acarreta a diluição da formulação), o reflexo de piscar (acelerando a drenagem pelas vias lacrimais) e a ligação do fármaco a proteínas presentes nas lágrimas (reduzindo a porcentagem de fármaco livre para penetração) reduzem a biodisponibilidade do ativo (KAUR; KANWAR, 2002a). Devido a essas perdas, as soluções oftálmicas contêm, frequentemente, altas concentrações do fármaco para manter, quando administradas topicamente, uma dosagem terapêutica no conteúdo lacrimal ou no sítio de ação. No entanto, o uso frequente de altas concentrações pode levar a efeitos tóxicos indesejáveis e danos às células da superfície ocular (SALMINEN, 1990; URTTI; SALMINEN, 1993; HOLLANDER; ALDAVE, 2004). No uso da AMB, na concentração de 1,5 a 5mg/mL, é recomendado o desbridamento periódico do epitélio corneano durante o tratamento, pois, o grande tamanho da molécula, além dos fatores já discutidos, dificulta a penetração na córnea com epitélio íntegro. Em coelhos, a concentração de AMB após a administração tópica, com remoção do epitélio, conseguiu atingir níveis terapêuticos no estroma corneano. Já, em córneas, com o epitélio íntegro, a penetração foi baixa ou não foi possível detectar o fármaco (O'DAY *et al.*, 1984; O'DAY *et al.*, 1986; PLEYER *et al.*, 1995; QU; LI; XIE, 2010). O uso de AMB, tanto na forma de

colírios, como na forma em pomada, demonstram boa tolerabilidade e eficiência (WOOD; WILLIFORD, 1976; HIROSE *et al.*, 1997).

A administração subconjuntival pode ser realizada em pacientes com baixa aderência ao tratamento, porém, seu uso é limitado devido aos relatos de necrose conjuntival, esclerite e afinamento escleral (O'DAY, 1987; O'Day *et al.*, 1991).

O uso intracorneano ou intraestromal de AMB, por outro lado, apresenta melhores resultados. Com poucos relatos de complicações, essa via de administração consegue atingir níveis terapêuticos corneanos superiores e, por mais tempo que o uso tópico ou intracameral. Diversos casos de ceratites não responsivas ao tratamento tópico demonstram sucesso após a administração intraestromal (GARCIA-VALENZUELA; SONG, 2005; QU; LI; XIE, 2010), e, na prática clínica, é possível observar a efetividade dessa via; porém, estudos controlados ainda são necessários. Sugere-se AMB via intraestromal na concentração de 5 a 10µg em infecções acometendo o estroma profundo que não respondam bem ao tratamento tópico (ALFONSO; GALLOR; MILLER, 2011). O intervalo entre as aplicações deve ser de pelo menos sete dias, preferencialmente, sob bloqueio peribulbar, devido à intensa dor causada pela aplicação. Doses acima de 15 a 20µg podem acarretar perda endotelial e edema corneano persistente (QU; LI; XIE, 2010).

A injeção intracameral de AMB, também, pode ser realizada com concentração variando de 5 a 10 µg/0,1mL. Deve ser administrada em intervalos de pelo menos um dia, pois o escoamento da droga ocorre rapidamente, e não há perda endotelial significativa. É indicada em infecções profundas que penetram a membrana de Descemet e acometem a câmara anterior e/ou cristalino. Há relatos de catarata após as aplicações e aumento transitório da reação de câmara nas 24 horas subsequentes, devido ao caráter imunopotenciador da AMB. Outros efeitos colaterais, como irite e edema corneano, podem ocorrer, entretanto, são reversíveis (KERMANI; AGGARWAL, 2000; KAUSHIK *et al.*, 2001; KURIAKOSE *et al.*, 2002; YILMAZ; TURE; MADEN, 2007; YOON *et al.*, 2007).

Natamicina (NTM)

Assim como a AMB, a NTM ou pimaricina é um antifúngico polieno usado na medicina apenas no tratamento de ceratites fúngicas. Além disso, é utilizado como agrotóxico e na indústria alimentícia como conservante (MATTIA; CERNIGLIA; BAINES, 2002; JONES, 2004). Possui molécula longa com baixa solubilidade em água. Disponível em forma de suspensão, a NTM necessita ser agitada antes de sua aplicação. É a única droga aprovada pelo *Food and Drug Administration* – FDA para o tratamento de ceratomicoses. Alguns países possuem a droga em apresentação comercial (Natacyn® - Alcon Laboratories, Fort Worth, TX). No Brasil necessita ser manipulada (JONES, 2004; KAUR; RANA; SINGH, 2008). Utilizada na concentração de 5% (50mg/mL), apresenta boa estabilidade e tolerabilidade no uso tópico.

Devido ao seu alto peso molecular, a NTM tem baixa penetração corneana e é indicada em esquema monoterápico, apenas, no tratamento de infecções superficiais (TU *et al.*, 2007; KAUR; RANA; SINGH, 2008). Nos casos de infecções profundas ou com acometimento de estruturas intraoculares, o seu uso deve ser associado a antifúngico por outra via de administração (ROSA; MILLER; ALFONSO, 1994; PANDA *et al.*, 1997; ALFONSO *et al.*, 2011). Devido à baixa penetração corneana, o sucesso terapêutico com NTM requer seu uso por tempo prolongado – média de 39 dias (JONES; SEXTON; REBELL, 1970). Recomenda-se o desbridamento do epitélio como terapia adjuvante para obter maiores concentrações estromais da NTM. Tal conduta permite maior aderência da droga à superfície desepitelizada (JONES, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Prajna e colaboradores (2003) discordam dessa conduta em seu estudo que não revelou benefício da raspagem epitelial, no tempo de cicatrização da lesão. De fato, nesse estudo, a raspagem esteve associada a pior acuidade visual após a cicatrização (PRAJNA *et al.*, 2011). O intervalo de aplicação é semelhante ao da AMB, havendo espaçamento das doses na melhora dos sintomas. Algumas infecções exigem a manutenção da terapia por períodos prolongados, o uso a cada 4 horas mantém concentrações terapêuticas na córnea com boa tolerabilidade em longo prazo (PRAJNA *et al.*, 2003).

A aplicação subconjuntival deve ser desencorajada por sérias complicações, como necrose conjuntival e esclerite (O'DAY, 1987; DURSUN *et al.*, 2003; JONES, 2004).

Não há relatos do uso da NTM por outras vias (intracameral, intravítrea, intraestromal ou sistêmica).

AZÓIS

Introduzidos na prática médica na década de 70, os azóis representaram um importante avanço na terapia antifúngica. Comparados à AMB, possuem amplo espectro de ação e menores efeitos adversos. Seu uso se difundiu rapidamente, principalmente, no tratamento de infecções de pele e mucosas (MARTINEZ, 2006). Atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a síntese de ergosterol na membrana plasmática, inibindo, assim, o crescimento dos fungos. Divididos em duas grandes classes, os imidazóis foram os primeiros a surgir, seguidos pelos triazóis, ambos apresentam espectro antifúngico semelhante, com vantagem dos triazóis serem metabolizados mais lentamente e exercerem menor influência no metabolismo dos esteroides humanos (MARTINEZ, 2006; BENNETT, 2007).

Entre os principais imidazóis utilizados em oftalmologia estão o miconazol (MCZ), o econazol (ECZ) e o cetoconazol (KCZ). Dentre os triazóis de primeira geração, os mais utilizados são o itraconazol (ICZ) e o fluconazol. Introduzidos na prática clínica na última década estão os triazóis de segunda geração, entre eles o voriconazol e o posaconazol (PCZ).

Alguns autores buscam formas diferenciadas de liberação dos azóis para aumentar a biodisponibilidade corneana dessas drogas, visto que as concentrações das mesmas com essa via de administração são muito inferiores às necessárias para função terapêutica. Em seu estudo realizado em 2010, Gratieri encontrou que a atividade *in situ* do gel termorreversível desenvolvido e caracterizado em seu trabalho, bem como, a iontoforese, representam sistemas promissores para a liberação ocular tópica do

fluconazol. O primeiro possui características promotoras de permeação, prolongado tempo de retenção e facilidade de obtenção e administração, e o segundo é capaz de promover maior retenção do fármaco na córnea (ANUMOLU *et al.*, 2009; GRATIERI, 2010).

Cetoconazol (KCZ)

Atualmente pouco utilizado em medicina interna, o KCZ, foi o primeiro imidazol utilizado sistemicamente com sucesso. Sua substituição pelo ICZ deu-se pela menor influência deste no metabolismo dos glicocorticóides com espectro antifúngico ampliado (BENNETT, 2007). Utilizado na dose de 100 a 400mg a cada 12 horas, tem sua absorção por via oral dependente do pH gástrico (inferior a 3), devendo ser tomado em jejum e não associado a protetores gástricos. Pode levar a intolerância gástrica, hepatotoxicidade, ginecomastia e alterações menstruais (MARTINEZ, 2006; KAUR; RANA; SINGH, 2008). Embora sua penetração no líquido e na urina seja baixa, quando utilizado sistemicamente, a penetração no tecido ocular é significativa. Inúmeros são os relatos de sucesso do KCZ por via oral, associado ou não à NTM ou AMB tópicos, no tratamento de ceratomicoses. Alguns autores sugerem sua introdução na rotina de todos os casos de ceratites fúngicas (ISHIBASHI, 1983; ISHIBASHI, 1986; THOMAS *et al.*, 1987), porém faltam estudos controlados que os apoiem.

Há descrição de casos tratados exclusivamente com KCZ tópico (10 a 50mg/mL), porém, outras drogas demonstraram superioridade em estudos comparativos. KOMADINA e colaboradores, bem como, SINGH e colaboradores ao compararem o uso tópico e oral de KCZ à NTM, demonstraram superioridade desta última droga. Obtiveram, ainda, resposta parcial ao uso oral isolado, com efeito aditivo quando associado à NTM tópica (KOMADINA *et al.*, 1985; SINGH *et al.*, 1989).

Atualmente, o uso sistêmico do KCZ é indicado no tratamento adjuvante de ceratomicoses profundas (MÜLLER; KARA-JOSÉ; DE CASTRO, 2013).

Itraconazol (ICZ)

Mais comumente utilizado, na prática geral que o KCZ, o ICZ apresenta menores efeitos colaterais em seu uso sistêmico. Administrado por via oral, porém, apresenta baixa biodisponibilidade, solubilidade e penetração nos tecidos oculares se comparado aos demais azóis (THOMAS *et al.*, 1987; ABAD; FOSTER, 1996; JONES, 2004; KAUR; RANA; SINGH, 2008). Assim como o KCZ, sua absorção gástrica é dependente de baixo pH.

Seu uso sistêmico na dose de 400mg/dia mostrou-se eficaz no tratamento de infecções por *Candida* spp. (KLOTZ *et al.*, 1996). No entanto, em infecções por *Fusarium* spp. alguns estudos sugerem ineficácia do ICZ. Seu uso tópico na concentração de 10mg/mL não foi efetivo como a NTM 5% no controle da infecção (KALAVATHY *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* demonstram MIC maior para inibição de crescimento fúngico do ICZ em comparação à AMB e NTM (THOMAS *et al.*, 1987; LI *et al.*, 2008); alguns obtiveram inclusive resistência à droga por todas as cepas analisadas (LALITHA *et al.*, 2007). Contra *Aspergillus* spp. o ICZ mostrou-se eficaz, porém, inferior ao KCZ (MARANGON *et al.*, 2004). Seu uso sistêmico deve restringir-se apenas ao tratamento adjuvante de infecções oculares por leveduras.

Fluconazol (FCZ)

Diferentemente do ICZ e do KCZ, o FCZ apresenta excelente absorção pelo trato gastrointestinal sem sofrer influência da acidez gástrica. Suas concentrações plasmáticas, após o uso oral, atingem praticamente os mesmos níveis que por via parenteral. Com eficaz penetração nos tecidos oculares, atinge concentrações no humor aquoso semelhante às do plasma (O'DAY *et al.*, 1990; BENNETT, 2007).

Seu uso por via oral na dose de 200 a 400mg, por dia, mostrou-se eficaz no tratamento de infecções oculares, associado ou não à NTM tópica (THAKAR, 1994; URBAK; DEGN, 1994). Quando utilizado via subconjuntival, em associação à AMB tópica, houve aumento do espectro antifúngico com menor toxicidade que no uso isolado

da AMB (MAHDY *et al.*, 2010). Yilmaz e Maden (2006) conseguiram tratar 60% dos casos de ceratomicoses com o uso isolado da injeção subconjuntival de FCZ (YILMAZ; MADEN, 2006). Sugere-se o uso por essa via na dose de 2mg em 1mL administrado diariamente por 10 dias seguidos, após; devem ser realizadas aplicações a cada 48 horas até melhora (MAHDY; NADA; WAGEH, 2010).

Administrado como colírio em coelhos, o FCZ apresentou níveis terapêuticos intracorneanos contra cepas de *Aspergillus fumigatus*. Utilizado na concentração de 2mg/mL, sua penetração foi maior após remoção do epitélio (YEE *et al.*, 1997; AVUNDUK *et al.*, 2003).

Embora com penetração ocular superior ao KCZ, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram menor espectro antifúngico do FCZ. Em diversos trabalhos que avaliaram a suscetibilidade de agentes isolados de ceratites ou endoftalmite fúngicas, apenas espécies de *Candida* foram sensíveis ao FCZ, com marcada resistência pelos fungos filamentosos (*Aspergillus* e *Fusarium* spp.) (LI *et al.*, 1998; MASCARO *et al.*, 2003; MARANGON; MILLER; ALFONSO, 2004; HARIPRASAD *et al.*, 2008).

Posaconazol (PCZ)

O PCZ é um triazol de segunda geração, recentemente, introduzido na prática médica. Resultado do aperfeiçoamento da molécula do ICZ, sua principal indicação está no tratamento de infecções fúngicas invasivas em pacientes onco-hematológicos.

Disponível apenas em solução oral (Noxafil®- Schering-Plough, Kenilworth, NJ), deve ser administrado na dose de 200mg, 4 vezes ao dia, ou 400mg, duas vezes ao dia. A apresentação parenteral encontra-se em desenvolvimento. Queixas gastrointestinais foram os únicos efeitos adversos relatados até o momento (ULLMANN *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram amplo espectro contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. entre outros. Foi eficaz contra a maioria dos agentes resistentes ao ICZ e FCZ (TORRES *et al.*, 2005; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2006), apresentando, juntamente com o voriconazol (VCZ), as

menores MIC's contra diversos agentes (LALITHA *et al.*, 2007). Sua experiência em infecções oculares ainda é restrita, entretanto, com resultados animadores. Em uma série de três casos de ceratite por *Fusarium*, evoluindo com endoftalmite não responsiva ao tratamento oral e tópico com VCZ, houve rápida resposta terapêutica ao PCZ (JONES *et al.*, 1970). Sponzel e colaboradores (2002), também, descrevem um caso de ceratite por *Fusarium solani* resistente à AMB e NTM, tratado com sucesso após introdução de PCZ 200mg, 4 vezes ao dia, via oral, associado ao uso tópico (100mg/mL preparado a partir da solução oral) (SPONSEL *et al.*, 2002). Porém, faltam estudos controlados e comparativos com drogas antifúngicas de primeira linha.

PIRIMIDINAS (5FC)

Representada pela 5-fluorocitocina (5FC) ou flucitocina, é a única droga antifúngica com ação intracelular. Quando absorvida pelo fungo é convertida em 5-fluoracila, potente antimetabólico, que atua inibindo a síntese do DNA (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000).

Seu uso em infecções oculares é restrito devido ao seu estreito espectro antifúngico e baixa penetração nos tecidos oculares (O'DAY *et al.*, 1985).

EQUINOCANDINAS

Equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos que inibem a síntese de glucana na parede celular do fungo, através da inibição não competitiva da enzima 1,3- β -glucano sintase, causando desequilíbrio osmótico e lise celular (MARTINEZ *et al.*, 2006; MORRIS; VILLMANN, 2006). São representantes dessa classe de medicamentos a caspofungina (CFG) e a micafungina (MFG).

Utilizado em infecções por leveduras, tem rápida ação fungicida contra a maioria das espécies de *Candida*, inclusive cepas resistentes ao FCZ, mas não contra *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* (BACHMANN *et al.*, 2002). Fungistática

contra alguns fungos filamentosos como *Aspergillus*, mas sem atuação sobre *Fusarium* e *Rhizopus* (WAGNER *et al.*, 2006; LALITHA *et al.*, 2007).

Utilizada topicamente na concentração 1,5 a 5mg/mL, a CFG mostrou eficácia semelhante à AMB no tratamento de úlcera corneana por *Candida albicans* em modelo animal (GOLDBLUM *et al.*, 2005). Outros dois estudos envolvendo o uso tópico do MFG 1mg/mL mostraram eficácia comparável ou superior a do FCZ no tratamento de ceratites por *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (MATSUMOTO *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2011).

2.3. CERATITES POR *Pythium* spp.

2.3.1. Classificação taxonômica e Características do *P. insidiosum* e *P. periculosum*

A pitiose é uma doença insidiosa, podendo levar à morte se não tratada, tendo como agente etiológico em mamíferos, o *Pythium insidiosum* (MENDOZA; VILELA, 2013) e o *Pythium periculosum* (MIRAGLIA *et al.*, 2022). O agente da pitiose foi isolado pela primeira vez a partir de granulomas subcutâneos em equinos na Indonésia (DE HAAN; HOOBKAMER, 1901), sendo classificado como um fungo. Em 1961, recebeu o nome *Hyphomyces destruens* acreditando-se ser um zigomiceto, provavelmente *Mortierella* (BRIDGES; EMMONS, 1961). AUSTWICK e COPLAND (1974) observaram o desenvolvimento de zoósporos quando culturas em ágar Sabouraud dextrose eram transferidas para um meio aquoso, concluindo que *H. destruens* pertencia aos oomicetos do gênero *Pythium*. O nome pitiose foi proposto para a doença por CHANDLER e colaboradores, em 1980. E o oomiceto foi descrito como *Pythium insidiosum* quando DE COCK e colaboradores, em 1987, observaram a sua reprodução sexuada (esporulação).

Esta doença é considerada não transmissível, encontrada nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (DE COCK *et al.*, 1987; MENDOZA; VILELA, 1993; MENDOZA, 2005). Possivelmente a modificação do ambiente, como a irrigação para a

produção de arroz, poderia justificar o aparecimento da pitiose em regiões não tropicais, como observado na Califórnia e Arizona (BERRYSSA *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2008). No Brasil, na região do Pantanal, a maioria dos casos acontece entre os meses de fevereiro e maio, quando ocorre formação de banhados e temperatura propícia para o desenvolvimento dos zoosporos (LEAL *et al.*, 2001).

Pythium insidiosum e *Pythium periculosum* são patógenos de mamíferos pertencentes ao Reino Straminopila, Filo Oomycota, Classe Oomycetos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Esses patógenos foram, recentemente, reclassificados dentro do super-grupo SAR (Straminopiles, Alveolates e Rhizaria) (ADL *et al.*, 2012). O grupo Straminopilos, especialmente os Oomycetos, se encontram em ambientes aquáticos e precisam de substratos orgânicos para manutenção dos seus ciclos de vida (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). Alguns requerem temperaturas entre 30 e 40°C para sua reprodução ambiental (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995). Possuem filamentos ramificados, esparsamente septados ou asseptados, que podem ser confundidos com hifas fúngicas (RATHI *et al.*, 2018). Os oomicetos têm uma parede celular constituída por compostos de celulose e glicanos e não por quitina ou ergosterol em sua membrana citoplasmática, características estas que os diferenciam dos fungos (AGARWAL *et al.*, 2019). Além da diferença na parede celular, nos últimos anos, tem sido geradas fortes evidências filogenéticas indicando que os Stramenopila não são fungos, mas sim microrganismos protistas estreitamente relacionados às algas e plantas (BAULDAUF *et al.*, 2000; GAASTRA *et al.*, 2010; VILELA *et al.*, 2018). A localização filogenética de *Pythium* spp. está esquematizada na Figura 9.

principalmente doenças em cavalos, cães e humanos (GAASTRA *et al.*, 2010, MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014). A pitiose humana manifesta-se como infecções cutâneas, vasculares, gastrointestinais, sistêmicas, que podem ser potencialmente letais. A doença pode ocorrer, ainda, na região ocular acometendo córnea, bulbo ocular e órbitas (GURNANI *et al.*, 2021). A infecção por *Pythium* está associada à alta morbidade e mortalidade, e seu diagnóstico, bem como, o tratamento precoce são importantes para auxiliarem na possível terapia antifúngica (MITTAL *et al.*, 2017).

A análise filogenética inicial de *P. insidiosum* mostrou a presença de um complexo formado por três grupos monofiléticos. Dois destes incluem isolados que foram recuperados de casos de pitiose nas Américas (*Cluster I*) e na Ásia (*Cluster II*). O terceiro *cluster* enquanto incluiu quatro isolados divergentes dos primeiros, três deles provenientes de humanos na Tailândia e nos EUA e o outro isolado de um urso de óculos dos EUA (*Cluster III*) (SCHURKO; MENDOZA; LÉVESQUE, 2003). Desde então, diversas análises filogenéticas confirmaram a presença de, pelo menos, três *clusters* monofiléticos, com a maioria dos isolados colocados nos *clusters I* e *II*. Análises filogenéticas posteriores usando isolados de fontes ambientais e de casos humanos na Índia, Espanha, Tailândia e cães nos EUA, no entanto, mostrou a presença de dois grupos monofiléticos cada um contendo dois sub-*clusters* (PRESSER; GOSS, 2015; VILELA *et al.*, 2018). Esses estudos revelaram que *P. insidiosum* possui padrões filogenéticos diferentes daqueles descritos pelos primeiros investigadores. Em um trabalho recente, utilizando análises filogenéticas, genéticas populacionais e de proteínas MALDI-TOF de isolados de *P. insidiosum* mostraram que os membros do agrupamento proposto III e IV são filogeneticamente diferentes daqueles dos agrupamentos I e II. As análises mostraram esse novo grupo filogenético contendo dois sub-*clusters*, o *Cluster III* (com isolados provenientes dos EUA) e o *Cluster IV* (com outros isolados provenientes de diferentes regiões do mundo). Os dados encontrados relevaram que, na realidade, os *Clusters III* e *IV*, originalmente classificados como *P. insidiosum* compõem uma nova espécie, agora identificadas como *P. periculosum* (MIRAGLIA *et al.*, 2022).

Microscopicamente, *Pythium* spp. desenvolve micélios, como os fungos. No entanto, como já destacado, não são fungos verdadeiros, uma vez que sua parede celular não contém quitina, mas compostos de celulose e glicanos. Além disso, sua membrana citoplasmática não possui ergosterol, composto presente nas células fúngicas (GAASTRA *et al.*, 2010; AGARWAL *et al.*, 2018).

O microrganismo se apresenta de duas formas distintas. Na forma de hifas caracterizadas por ramificação em ângulo reto; e na forma de vesículas contendo zoosporos biflagelados móveis em ambientes aquáticos (AGARWAL *et al.*, 2018). Essa última é estimulada pela presença de íons e possuem quimiotaxia por matéria vegetal e tecidos animais (GAASTRA *et al.*, 2010).

2.3.2. Epidemiologia e Distribuição Geográfica do *P. insidiosum* e *P. periculosum*

A patologia conhecida por pitiose está associada aos climas tropical, subtropical e temperado e há relatos em praticamente todo o mundo. A infecção já foi reportada em regiões do Sudeste asiático (Índia, Indonésia, Japão, Nova Guiné, Tailândia), na Costa Leste da Austrália e Nova Zelândia, América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Venezuela), América Central e Ilhas do Caribe (Costa Rica, Guatemala, Haiti, Panamá e Nicarágua) e na América do Norte (México e Estados Unidos) (MENDOZA; NEWTON, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010). Existem alguns relatos em regiões da Europa próximas ao mediterrâneo, mais especificamente no Egito, Grécia e Israel (CHAFFIN *et al.*, 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; MENDOZA e NEWTON, 2005; TANHEHCO *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2012).

A localização geográfica e o clima tropical da África parecem ser ideais para a pitiose, entretanto, o primeiro caso foi descrito no continente apenas em 2005 (MENDOZA, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010).

Encontra-se na literatura diversas descrições de pitiose em animais e humanos no Brasil (SANTOS; LONDERO, 1974; SANTURIO *et al.*, 1998; LEAL *et al.*, 2001; HEADLEY; ARRUDA JR, 2004; TABOSA *et al.*, 2004; BOSCO *et al.*, 2005) e considera-se que o Pantanal brasileiro seja o local com a maior frequência de pitiose no mundo (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Baseado no fato de que se trata da maior área alagada de água doce do mundo, o Pantanal, talvez, tenha as maiores taxas de incidência e prevalência de pitiose equina do planeta, mas não há estudos sistemáticos que corroborem essa impressão (MENDOZA, 2005; GAASTRA *et al.*, 2010). A Figura 10 mostra a distribuição geográfica da pitiose atualmente conhecida no mundo.

Figura 10- Distribuição geográfica da pitiose nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas.



Fonte: Mendoza, 1996.

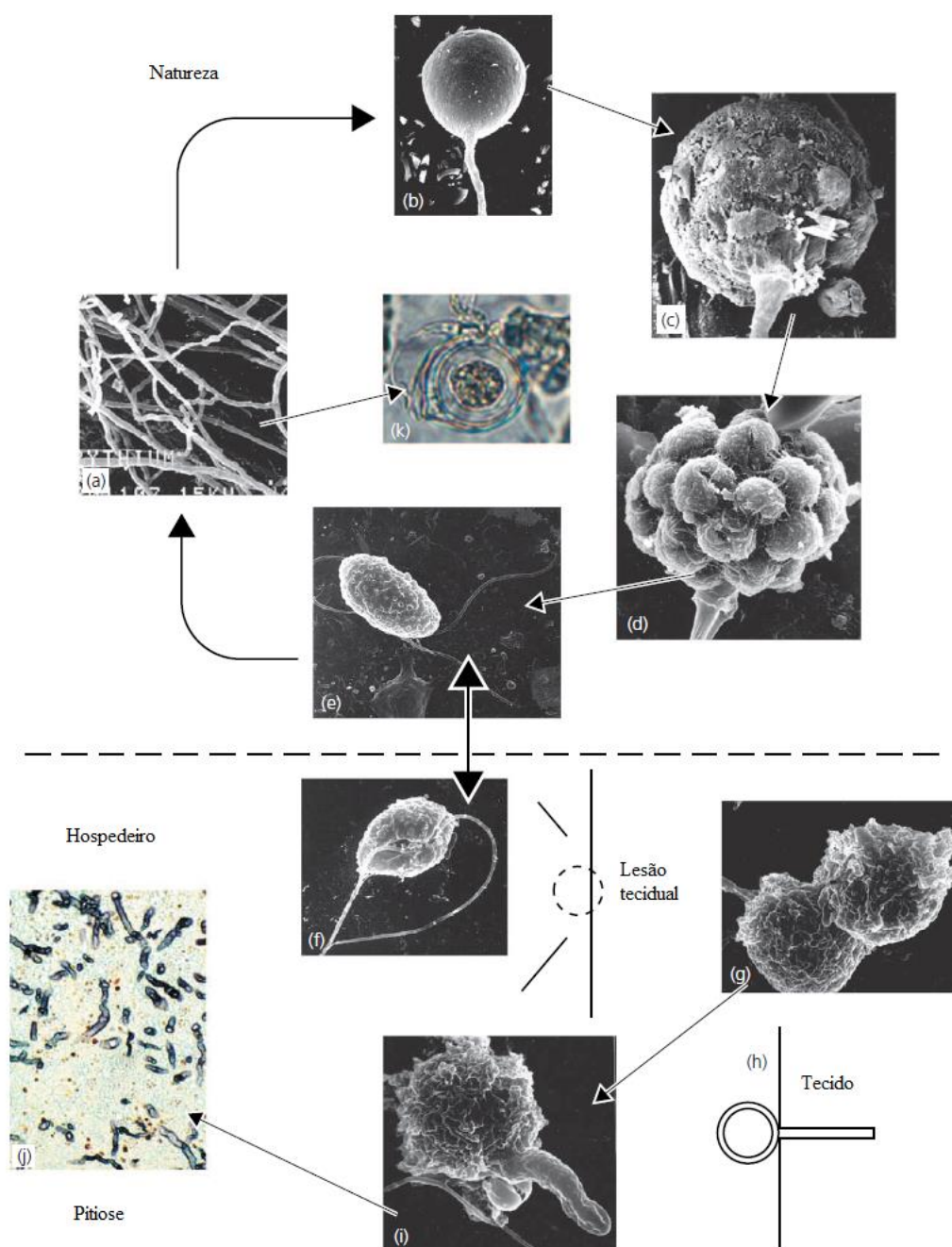
A infecção pelos oomicetos *P. insidiosum* e *P. periculosum* está associada ao contato de mamíferos com águas contaminadas, onde há ocorrência dos zoosporos biflagelados (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995), não havendo, por isso, predisposição de raça, sexo e idade (SANTOS *et al.*, 1987). Os zoosporos livres na água são atraídos por pelos ou tecido epitelial danificado. Uma vez fixados na ferida, se encistam e produzem o tubo germinativo que inicia a lesão (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993).

O acesso dos animais a fontes de água e ambientes externos é descrito em quase todas as espécies, sendo que boa parte dos animais permanece, algum tempo, submerso nela (IMWIDTHAYA, 1994, 1995; MENDOZA *et al.*, 1996; CAMUS; GROOTERS; AQUILAR, 2004; TABOSA *et al.*, 2004; BUERGELT; POWE; WHITE, 2006; BERRYESSA *et al.*, 2008; GRECCO *et al.*, 2009; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014).

Desde o século passado, a presença de água e ambientes úmidos têm sido relacionados à casos de doenças granulomatosas em equinos. Há relatos de que cavalos frequentemente desenvolviam pitioses após pastarem por longos períodos, em águas paradas. A pitiose já foi descrita como câncer do pântano em algumas áreas do mundo, e sua relação com ambientes úmidos tem sido suspeitada desde as descrições iniciais da doença (MENDOZA, 2005). A infecção pelo oomiceto *Pythium* spp. está fortemente associada ao contato dos animais com águas contaminadas, onde ocorre a liberação de zoosporos biflagelados (CHAFFIN; SCHUMACHER; McMULLAN, 1995), não havendo, por isso, predisposição de raça, sexo e idade (SANTOS *et al.*, 1987). Os zoosporos livres na água são atraídos por pelos ou tecido epitelial danificado. Uma vez fixados na ferida, se encistam e produzem o tubo germinativo que inicia a lesão (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO, 1993). A Figura 11 mostra o ciclo de vida do *P. insidiosum* na natureza.

Recentemente, entretanto, casos de pitiose foram observados nos estados norte-americanos da Califórnia e Arizona, regiões em que o clima não se encaixa nessa descrição. Essas observações podem indicar que o nicho ambiental do *Pythium* spp. está se expandindo, provavelmente, em consequência de mudanças ambientais como inundações deliberadas ou desenvolvimento de ambientes irrigados (GAASTRA *et al.*, 2010).

Figura 11 - Ciclo de vida de *Pythium insidiosum* na natureza. Primeiramente, o tecido da planta é colonizado por uma (a) hifa e, posteriormente, (b–d) ocorre diferenciação do esporângio em estágios mais maduros, que levam à (e) liberação de zoosporos. (f) Os zoosporos nadam para encontrar outra planta ou podem ser atraídos por tecido animal lesado. Os zoosporos encistados (g) ligados ao tecido por substância adesiva, germinam (h), invadem o hospedeiro (i), e causam pitiose. (j). A produção de oosporos ocorrem na natureza e podem servir como (k) esporos de resistência



Fonte: Mendoza; Hernandes; Ajello, 1993.

2.3.3. Considerações Gerais das Ceratites por *P. insidiosum* e *P. periculosum*

A infecção ocular por *Pythium insidiosum* é rara, porém, tem alta morbidade e pode evoluir com graves complicações ameaçando o bulbo ocular. Normalmente, o acometimento se manifesta na forma de ceratite que afeta indivíduos saudáveis (AHIRWAR *et al.*, 2021).

As ceratites causadas por *Pythium* spp. têm recebido atenção especial nos últimos 5 anos. Sua importância vem crescendo devido a numerosos casos reportados na Índia e na Tailândia, além da ocorrência de casos esporádicos no resto do mundo, em regiões tropicais e subtropicais (IMWIDTHAYA, 1994, THANATHANEE *et al.*, 2013, RIBEIRO *et al.*, 2017, HASIKA *et al.*, 2019). A maior prevalência ocorre na Tailândia, onde a doença é endêmica devido às condições climáticas. Existem, também, relatos de casos em regiões da Austrália, dos Estados Unidos, de Israel e da China, o que indica que o microrganismo possa estar mais amplamente distribuído e, provavelmente, está sendo subdiagnosticado e subnotificado (MILLER, 1983; SATHAPATAYAVONGS *et al.*, 1989; IMWIDTHAYA, 1994; HE *et al.*, 2016; AGARWAL *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019). Os relatos de casos causados por este oomiceto eram diagnosticados raramente.

2.3.4. Fatores de Risco para Ceratites por *Pythium* spp.

Os principais fatores de risco relacionados com infecção corneana por *Pythium* spp. são a utilização de lentes de contato, trauma ocular (HE *et al.*, 2016), lesões com poeira, contato com água (RATHI, 2018) ou ambientes úmidos (esgoto, campos de plantação de arroz, piscina, água de torneira e rios) (LELIEVRE *et al.*, 2015) e habitação agrícola (LELIEVRE *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019). A maioria dos indivíduos acometidos pela doença são trabalhadores agrícolas (LELIEVRE *et al.*, 2015) ou pescadores (RATHI *et al.*, 2018).

Acredita-se que a combinação de fatores como uso de lentes de contato e contato com água, pode aumentar o risco de ceratite por *Pythium* (LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019).

Há um relato que permite supor que o uso de terapia antifator de necrose tumoral pode contribuir com a infecção ocular inicial ou com a falha do tratamento não cirúrgico empregado (HUNG; LEDDIN, 2014).

Nos pacientes acometidos por pitiose ocular o contato direto com o patógeno é provavelmente o primeiro passo para a instalação da infecção (HUNG; LEDDIN, 2014; LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018). Nos casos até então relatados de ceratite por *Pythium* os pacientes que eram usuários de lentes de contato tiveram contato com água potencialmente contaminada pelos zoosporos do microrganismo (rio, água de torneira e piscina) (LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019).

2.3.5. Características Clínicas e Evolução das Ceratites por *Pythium* spp.

É bem sabido que ceratite por *P. insidiosum* imita as características clínicas da ceratite fúngica e, por isso, é muitas vezes diagnosticada incorretamente com base na avaliação clínica e raspado da córnea. A Tabela 1 lista as principais características clínicas e fatores de risco relacionados às ceratites microbianas.

A ceratite por *Pythium* spp., normalmente, tem diagnóstico tardio e rápida evolução (RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019). A apresentação clínica dessas ceratites se inicia com quadros leves de fotofobia, hiperemia conjuntival, dor e sensação de corpo estranho, seguidos de piora da acuidade visual (HUNG; LEDDIN, 2014; HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018). Os sintomas, normalmente, se iniciam dias a semanas após trauma vegetal (HE *et al.*, 2016) ou contato com água contaminada (LEDDIN, 2014; RATHI *et al.*, 2018; HUNG; LEDDIN, 2014). A progressão ocorre em poucos dias para quadros com úlcera corneana grave e extensa acometendo até o limbo. Por vezes,

acontece o comprometimento inclusive da esclera e da musculatura extraocular (HUNG; LEDDIN, 2014; LELIEVRE *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018). A biomicroscopia mostra injeção conjuntival severa (LELIEVRE *et al.*, 2015), úlcera de córnea com presença de massas densas e acinzentadas e extensão emplumada com bordas hifadas e lesões filamentosas, necrose de toda extensão corneana e afinamento estromal (Figura 12) (LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018) podendo haver formação de placas endoteliais (Figura 13E) (HE *et al.*, 2016). O exame da câmara anterior, usualmente, demonstra intensa reação inflamatória e hipópio (LELIEVRE *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018;). Os pacientes podem referir dor excruciante e, também, podem apresentar achados como ceratoneurite radial (Figura 13B) (HE *et al.*, 2016) e anel estromal imune (LELIEVRE *et al.*, 2015). A infecção pode se estender para todo o segmento anterior (HUNG; LEDDIN, 2014; LELIEVRE *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018), posterior (RATHI *et al.*, 2018) ou, até mesmo, comprometimento orbitário (HUNG; LEDDIN, 2014; AGARWAL *et al.*, 2019).

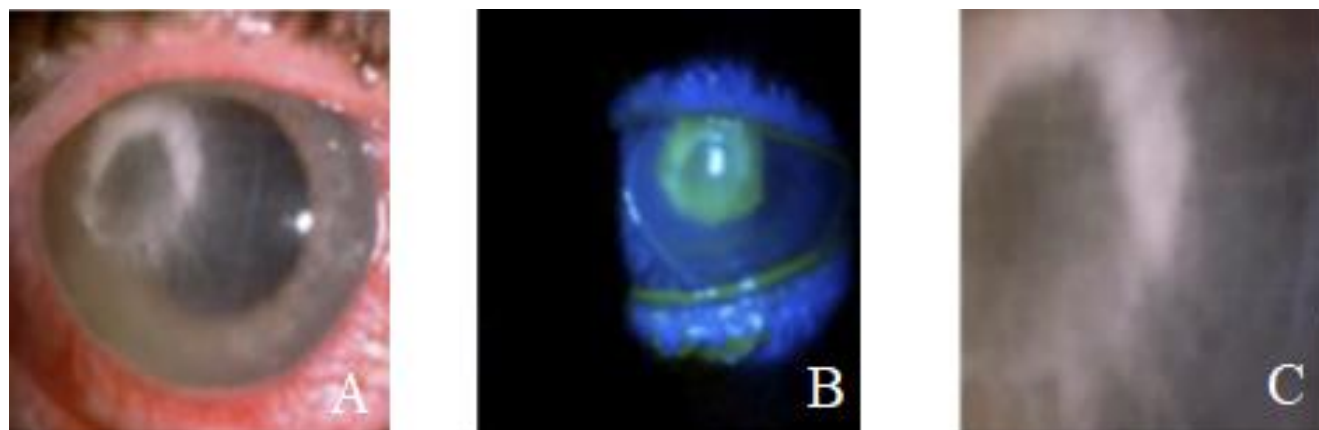
A acuidade visual inicial na apresentação pode variar de 20/120 a 20/400 (RATHI *et al.*, 2018) e evolui com deterioração rápida para até percepção de luz (LELIEVRE *et al.*, 2015; RATHI *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Sumário das Características Clínicas e Fatores de Risco das Principais Etiologias de Ceratites Infecciosas.

PATÓGENO	FATORES DE RISCO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
Ceratite por <i>Pythium insidiosum</i>	Queda de poeira, água de lagoa, piscina, lesão por bastão, lesão por argila, trauma vegetativo, lente de contato	Lesões do tamanho de cabeça de alfinete, infiltrados de pontos reticulares, infiltrados estromais com bordas hifadas, tentáculos, infiltrado multifocal, sulcos periféricos, goteira, disseminação limbal precoce e rápido derretimento da córnea. *Pode apresentar demais características clínicas encontradas em todos os outros ceratites.
Ceratite bacteriana (Gram-positiva e negativa)	Queda de insetos, exposição devido a lagofalmo, trauma contuso, esteroides, lentes de contato.	Secreção purulenta, cílios unidos, defeito epitelial, infiltrado estromal, derretimento da córnea, supuração espessa e branca, abscesso da córnea, endo-exsudatos, hipópio e perfuração.
Ceratite fúngica (filamentosos e não-filamentosos)	Lesão por material vegetal, esteróides, lesão por areia, trauma cirúrgico.	Defeito epitelial, infiltrado subepitelial, estromal ou de espessura total com margens emplumadas, abscesso corneano, infiltrado anelar, lesões satélites, endo-exsudatos, hipópio, perfuração, envolvimento gradual do limbo.
Ceratite microbacteriana atípica	Pós-cirurgia refrativa, trauma accidental, induzido por esteroides, lente de contato.	Defeito epitelial, edema e infiltrado estromal branco-acinzentado seco, dobras de Descemet, aparência de pára-brisa rachado.
Ceratite por Acanthameba	Lente de contato, banho em água de lagoa e água contaminada.	Lesões satélites, infiltrados focais do tamanho de uma cabeça de alfinete, infiltrados anelares, infiltrados estromais, ceratoneurite radial.
Ceratite ulcerativa periférica	Doença do tecido conjuntivo, idiopática.	Adelgaçamento periférico e goteira, infiltrado estromal em forma de crescente, reação celular estromal e edema, fusão estromal, perfuração da córnea.

Fonte: Adaptado de Gurnani *et al*, 2022.

Figura 12– Aspecto morfológico de úlceras corneanas. A) úlcera corneana paracentral com denso infiltrado estromal. (B) coloração com fluoresceína em úlcera de córnea paracentral. (C) maior aumento mostra infiltrado estromal de padrão reticulado.



Fonte: Lelievre *et al.*, 2015.

O quadro evolui com piora, mesmo após instituição de tratamento clínico, frequentemente evoluindo com descemetocel (Figura 13E) (HE *et al.*, 2016), perfuração ocular (Figura 13F) (HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018) e prolapso uveal-lenticular-vítreo (RATHI *et al.*, 2018). Após tratamento cirúrgico, com ceratoplastia lamelar ou penetrante, as córneas apresentam opacidade difusa com neovascularização e conjuntivalização (Figura 13G e H) (LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016). Nas formas mais graves, quando não há controle da infecção com a ceratoplastia, a pitiose ocular pode envolver a órbita e levar a panoftalmite, que geralmente requer tratamento cirúrgico radical, como evisceração ou enucleação do bulbo ocular (LELIEVRE *et al.*, 2015), sempre visando o controle do processo infeccioso. Entretanto, há relatos de pacientes que, mesmo após a abordagem cirúrgica mais agressiva, evoluíram com tromboflebite do seio cavernoso refratária ao tratamento clínico e cirúrgico, seguida de óbito (RATHI *et al.*, 2018; AGARWAL *et al.*, 2019).

Figura 13– Evolução de úlcera de córnea por *P. insidiosum*. (A) Úlcera estromal em periferia nasal da córnea cercada por infiltrado estromal difuso. (B) Ceratoneurite radial. (C) Necrose estromal e infiltrado de aspecto flocular. (D) Infiltrados numulares e ramificados. (E) Melting corneano com formação de descemetocel e placas endoteliais. (F) Perfuração corneana com prolapso da íris. (G) Câmara anterior com exsudato brancacento após ceratoplastia penetrante e lavagem de câmara anterior. (H) Aspecto da córnea 3 meses após ceratoplastia penetrante. Conjuntivalização e neovascularização extensos.



Fonte: HE *et al.*, 2016.

2.3.6. Exames Complementares e Diagnóstico Laboratorial

A diferenciação entre ceratites fúngicas e ceratites por *Pythium* spp. é pouco precisa. Muitas vezes, dados como história médica, sinais e sintomas clínicos, biomorfologia no raspado úmido, cultura microbiológica, coloração histoquímica e microscopia confocal apresentam-se de maneiras muito semelhantes entre as infecções das duas etiologias (HE *et al.*, 2016).

Considerado padrão-ouro, a ferramenta molecular PCR (GURNANI *et al.*, 2022), bem como, as técnicas de avaliação genética são os principais métodos utilizados para a identificação do patógeno. Os genes amplificados e sequenciados por PCR, para identificação de *Pythium* spp. são, principalmente ITS1, ITS2 e 5.8 S rRNA. Além desses, o gene $\text{exo-1,3-}\beta\text{-glucanase}$ tem apresentado resultados promissores na identificação do agente em questão (HE *et al.*, 2016).

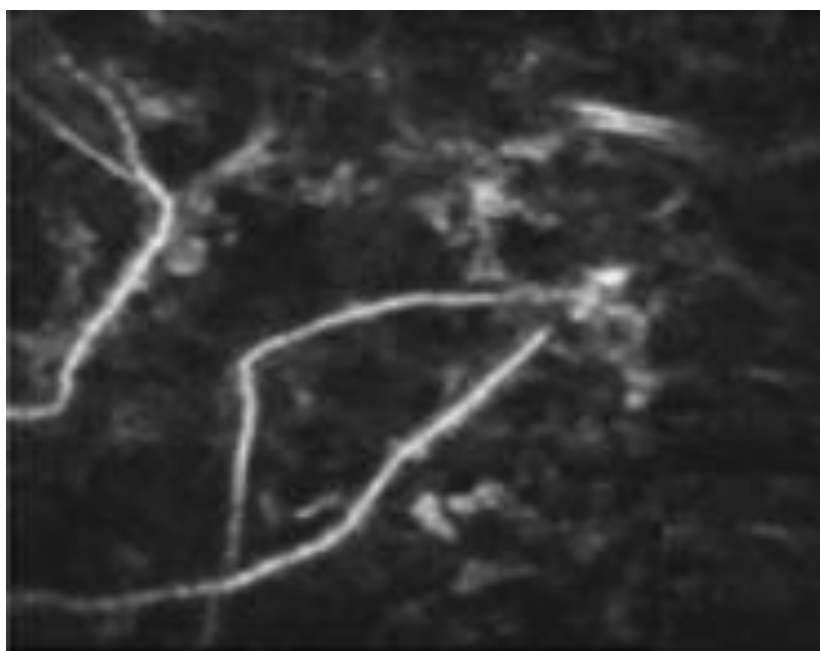
Foi analisado, no sul da Índia, o perfil microbiológico das ceratites, abrangendo uma década (1991-2000), que demonstrou que 10 a 13% dos fungos isolados não foram identificados por morfologia devido à esporulação insuficiente. Essa situação levanta a suspeita de que as ceratites, em questão, poderiam ter como agente etiológico o *Pythium* spp. (RATHI *et al.*, 2018). Nesses casos, o diagnóstico é, frequentemente, definido de maneira errônea como ceratite fúngica, mas poderia ter a etiologia devidamente comprovada após a realização de PCR (LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018).

EXAMES COMPLEMENTARES

A ultrassonografia ocular pode indicar pequena quantidade de exsudato vítreo (RATHI *et al.*, 2018). No entanto, se trata de um achado inespecífico que pode ser encontrado em diversas outras patologias que envolvam inflamação do segmento anterior do olho.

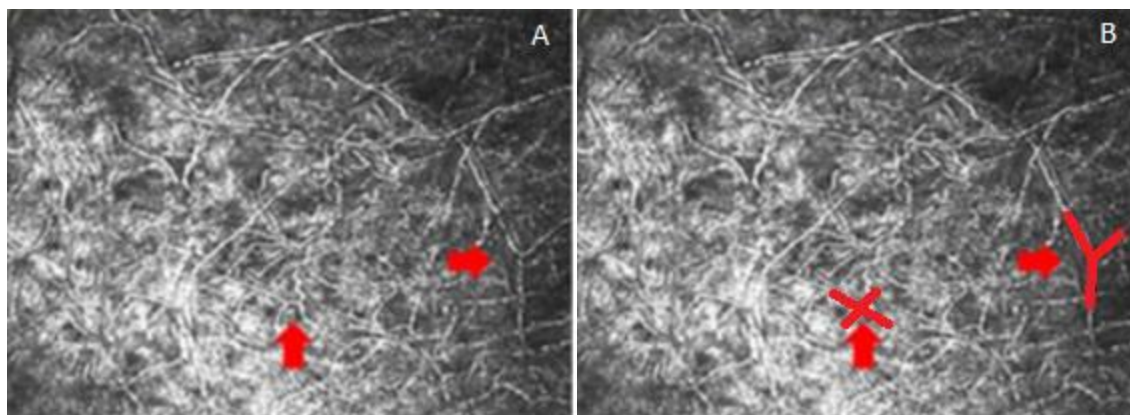
Um exame propedêutico útil, como auxílio no diagnóstico, é a microscopia confocal. Através dele é possível observar hifas ramificadas (LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; RATHI *et al.*, 2018), numerosos filamentos com alta refringência espalhados, envolvendo toda a espessura corneana (Figura 14), organizados de maneira sinuosa e padrão de ramificação irregular formando formatos em “X”, “Y” e “S” (Figuras 15 e 16d). Os filamentos corneanos, usualmente, estão organizados irregularmente com medidas de 3-5µm de largura e 200–400µm de comprimento (alguns maiores que 400µm) (HE *et al.*, 2016). Comparativamente com hifas fúngicas, o *Pythium* spp. exibe padrões mais flexíveis, sendo que algumas não possuem ramificações. No entanto, a maioria é ramificada em ângulos retos, mostrando um padrão em “Y”. É possível, também, em casos menos frequentes encontrar padrões em “X” (HE *et al.*, 2016).

Figura 14 – Microscopia confocal: estruturas ramificadas altamente reflexivas que se assemelham a hifas fúngicas



Fonte: Levievre *et al.*, 2015.

Figura 15 - filamentos em córnea infectada - Microscopia confocal. A: Morfologia dos filamentos em córnea infectada no exame de microscopia confocal in vivo. Os filamentos irregulares se distribuem em padrões diversos. As setas vermelhas mostram os filamentos em formatos de “X” e “Y” – a foto B demonstra de forma didática, para melhor visualização, as estruturas em seus respectivos formatos.



Fonte: Adaptado de HE *et al.*, 2016.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICROBIOLÓGICO

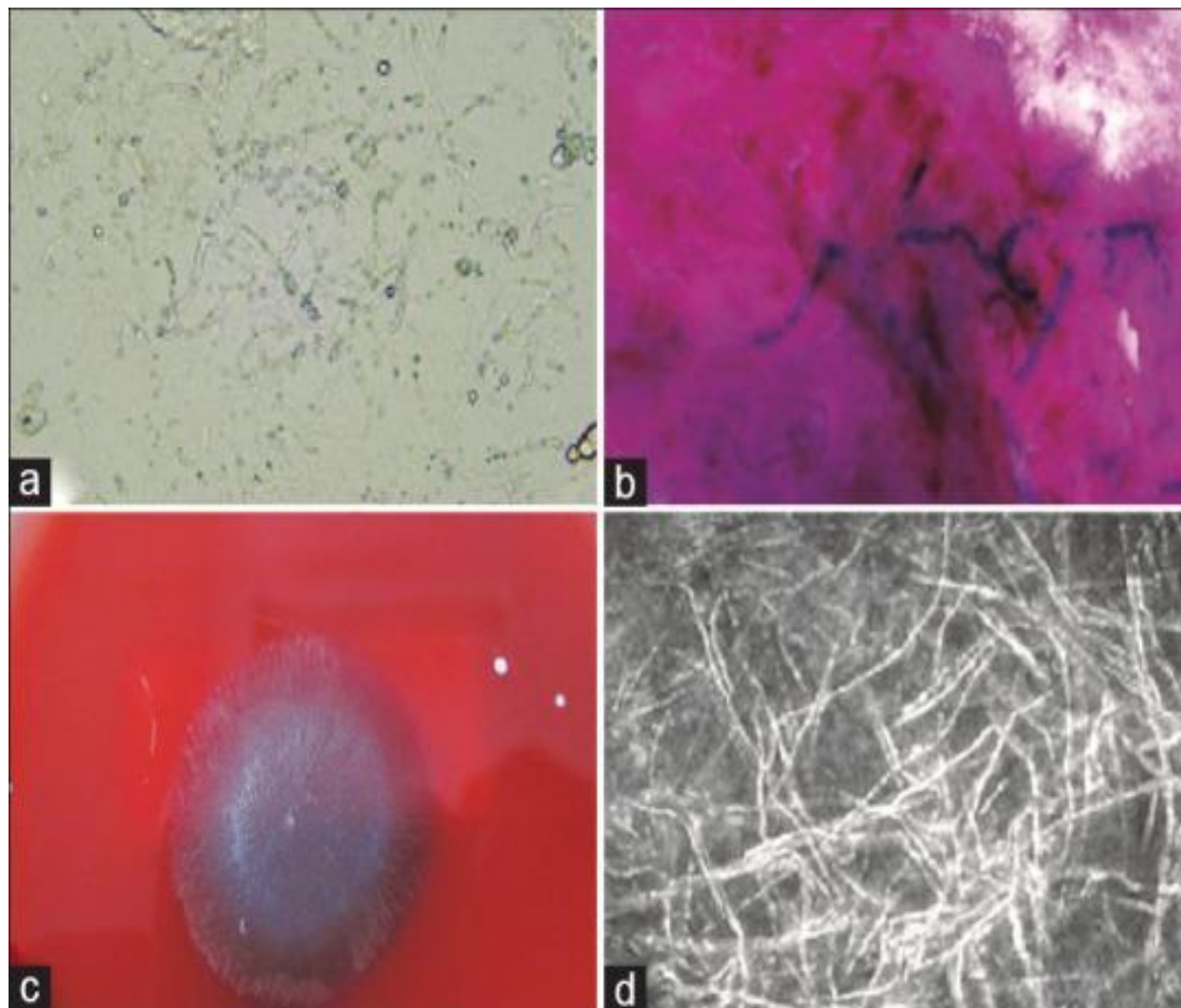
Abordagem geral para o diagnóstico laboratorial

A ceratite por *Pythium* spp. é relativamente rara. Ainda assim, clínicos e microbiologistas devem sempre ter um alto índice de suspeita sempre que lidarem com ceratite microbiana atípica, pois, o diagnóstico tardio, geralmente, está relacionado a resultados piores (LELIEVRE *et al.*, 2015). Não se deve descartar o diagnóstico de *Pythium* spp. com base em apenas um teste laboratorial isolado até se atingir um desfecho clínico satisfatório, visto que podem ser necessários vários e/ou diferentes tipos de amostras, desde uma raspagem da córnea, biópsia da córnea, botão da córnea até tecido eviscerado para se estabelecer o diagnóstico (HASIKA *et al.*, 2019; CHITASOMBAT *et al.*, 2020). Em geral, qualquer espécime que requeira teste para crescimento de *Pythium* deve ser armazenado entre 28 e 37°C. A positividade da cultura com indução de zoosporos fornece um diagnóstico definitivo, mas ainda assim, a PCR (reação em cadeia da polimerase) é o padrão-ouro devido à alta sensibilidade e especificidade. Também é vital entender todos os modos existentes e em evolução de diagnóstico laboratorial (GURNANI *et al.*, 2022).

Coloração Direta

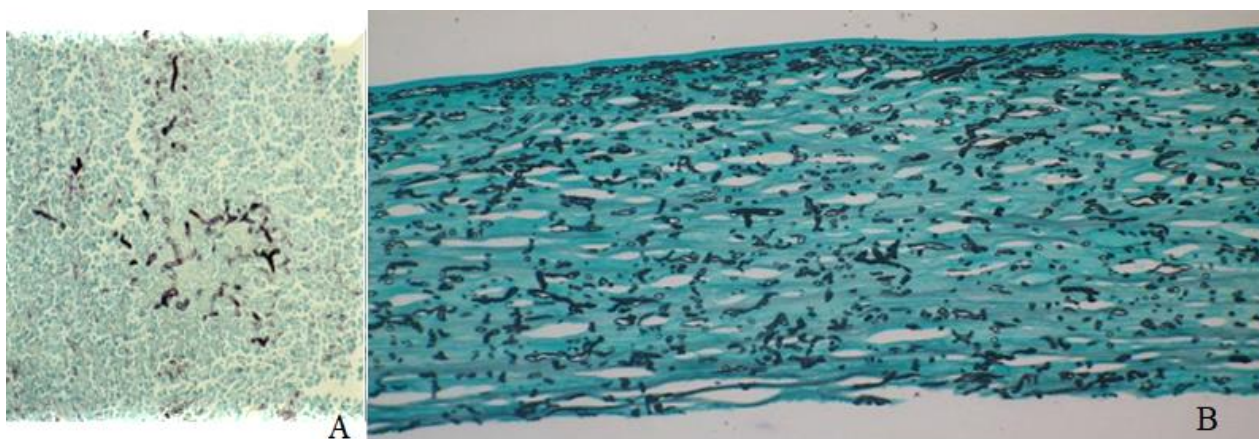
Os raspados da córnea coletados, sob condições assépticas adequadas, podem ser diretamente corados e estudados ao microscópio. O achado típico de *Pythium* spp. é a presença de amplos filamentos hialinos esparsamente septados semelhantes a fitas de fungos (GURNANI *et al.*, 2022). Podem ser, também, encontradas paredes colapsadas e expansão vesicular (HE *et al.*, 2016). Em contraste, as hifas fúngicas são largas, escassamente septadas, com ramificações em vários ângulos. Embora seja, geralmente, considerado difícil diferenciar *Pythium* spp. de filamentos fúngicos, parâmetros mais recentes estão ajudando a melhorar a capacidade diagnóstica dessa técnica. Vários corantes foram relatados em diferentes estudos, incluindo Gram (Figuras 16b e 24B), 10% de hidróxido de potássio (KOH) (Figuras 16a e 18), branco de calcofluor (CFW) (HE *et al.*, 2016), laranja de acridina (RATHI *et al.*, 2021) (Figura 19A), lactofenol azul de algodão (LPCB) (Figuras 19B e 20), azul de tripano, metanamina prata de Grocott-Gomori (GMS) (Figuras 17, 21D, 22A e E, e 23A e B), ácido periódico com reativo de Schiff (PAS) (Figura 21F) e iodo-iodeto de potássio-ácido sulfúrico (IKI-H₂SO₄) (Figuras 23C e E e 24A, D e F) (MITTAL *et al.*, 2017).

Figura 16- Diagnóstico Laboratorial – Microbiologia. (a) Mostra uma montagem úmida de KOH a 10% demonstrando a presença de hifas hialinas longas e escassamente septadas. (b) Mostra a imagem da coloração de Gram representando a parede celular espessa, alguns padrões septados e dobrados em forma de fita de hifas fúngicas. (c) Mostra uma cultura de 5 dias de idade de *P. insidiosum* a 37°C cultivada em ágar de sangue de ovelha a 5%. (d) Mostra uma imagem de microscopia confocal representando estruturas finas, hiperrefletivas, ocasionalmente ramificadas com ângulos variados.



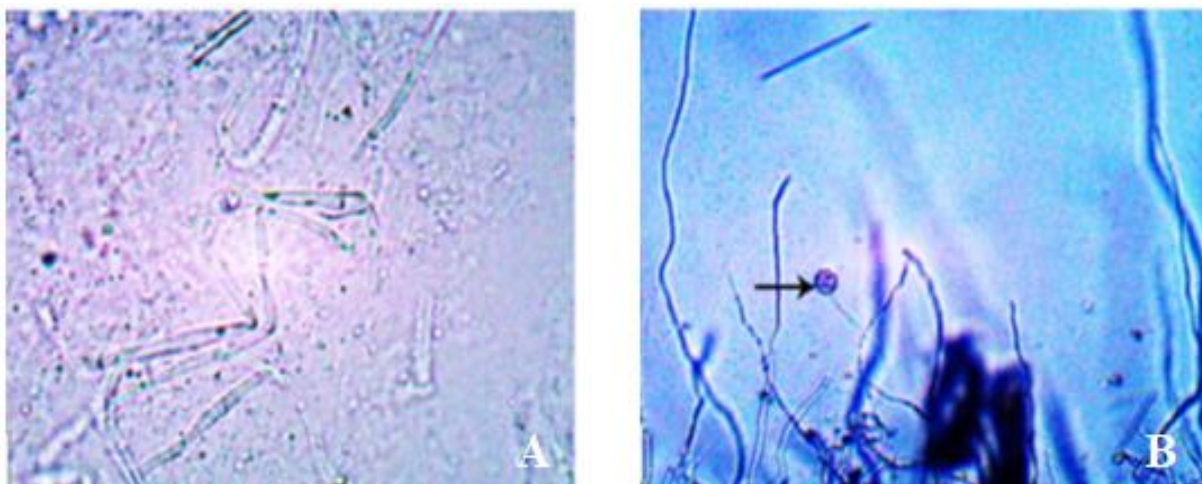
Fonte: Mittal *et al.*, 2017.

Figura 17- Hifas coradas com metanamina prata. A: Tecido corado com metanamina prata evidenciando hifas coradas dispersas no estroma. B: Fragmento de córnea corada com metamina prata evidenciando hifas coradas acometendo toda extensão corneana.



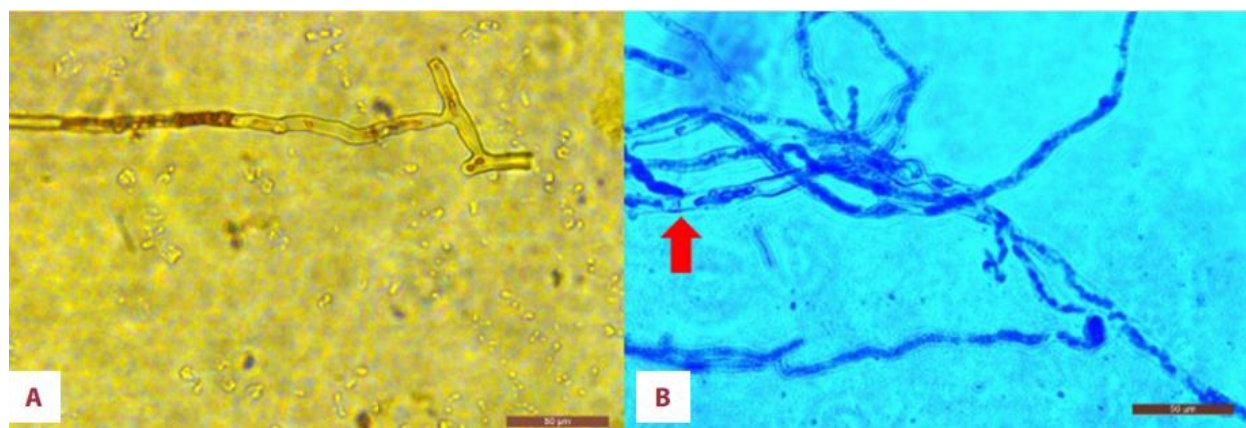
Fonte: Lelievre *et al.*, 2015.

Figura 18- Coloração com KOH e visualização de zoósporos. (A) Raspado de córnea com KOH a 10% mostrando hifas hialinas longas e delgadas de *P. insidiosum* com septações esparsas. Observam-se, ainda, numerosas vesículas dentro das hifas. (B) Vesícula contendo zoósporos.



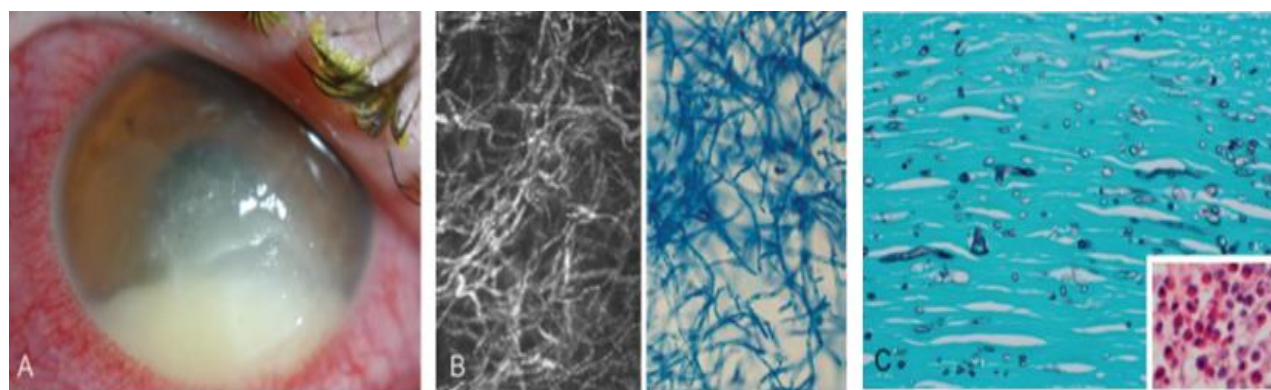
Fonte: Gurnani *et al.*, 2021.

Figura 19- Colorações para visualização das hifas de *P. insidiosum*. (A) O filamento em forma de “T” com um ângulo típico de 90º é positivamente corado por laranja de acridina. (B) Filamentos corados em azul por lactofenol azul são caracterizados por parede celular espessa, alguns septados (seta vermelha).



Fonte: Adaptado de HE *et al.*, 2016.

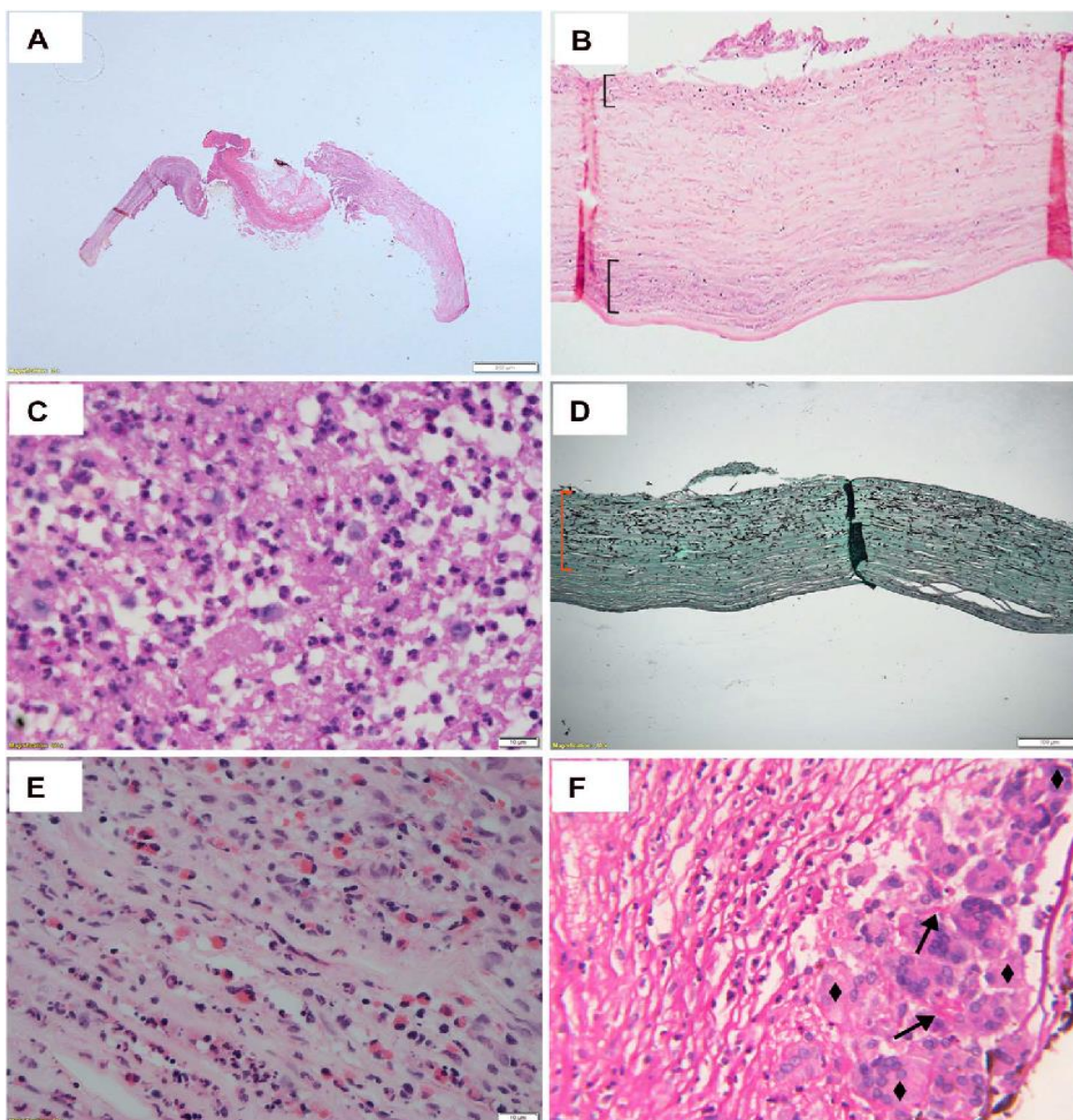
Figura 20 – Úlcera corneana e meios diagnósticos de sua etiologia. (A) Biomicroscopia com aspecto da úlcera de córnea. (B) Microscopia confocal: estruturas hiperrefletivas e ramificadas (esquerda), correlacionando-se a hifas esparsamente septadas e ramificadas vistas à microscopia (direita) - (coloração lactofenol azul). (C) Exame histológico da córnea: hifas amplas e ramificadas em todo o estroma da córnea (coloração metanamina prata e numerosos eosinófilos dentro da câmara anterior (inserção, hematoxilina e eosina).



Fonte: Tanhehco *et al.*, 2011.

Figura 21 – Histopatologia da ceratite por *P. insidiosum*

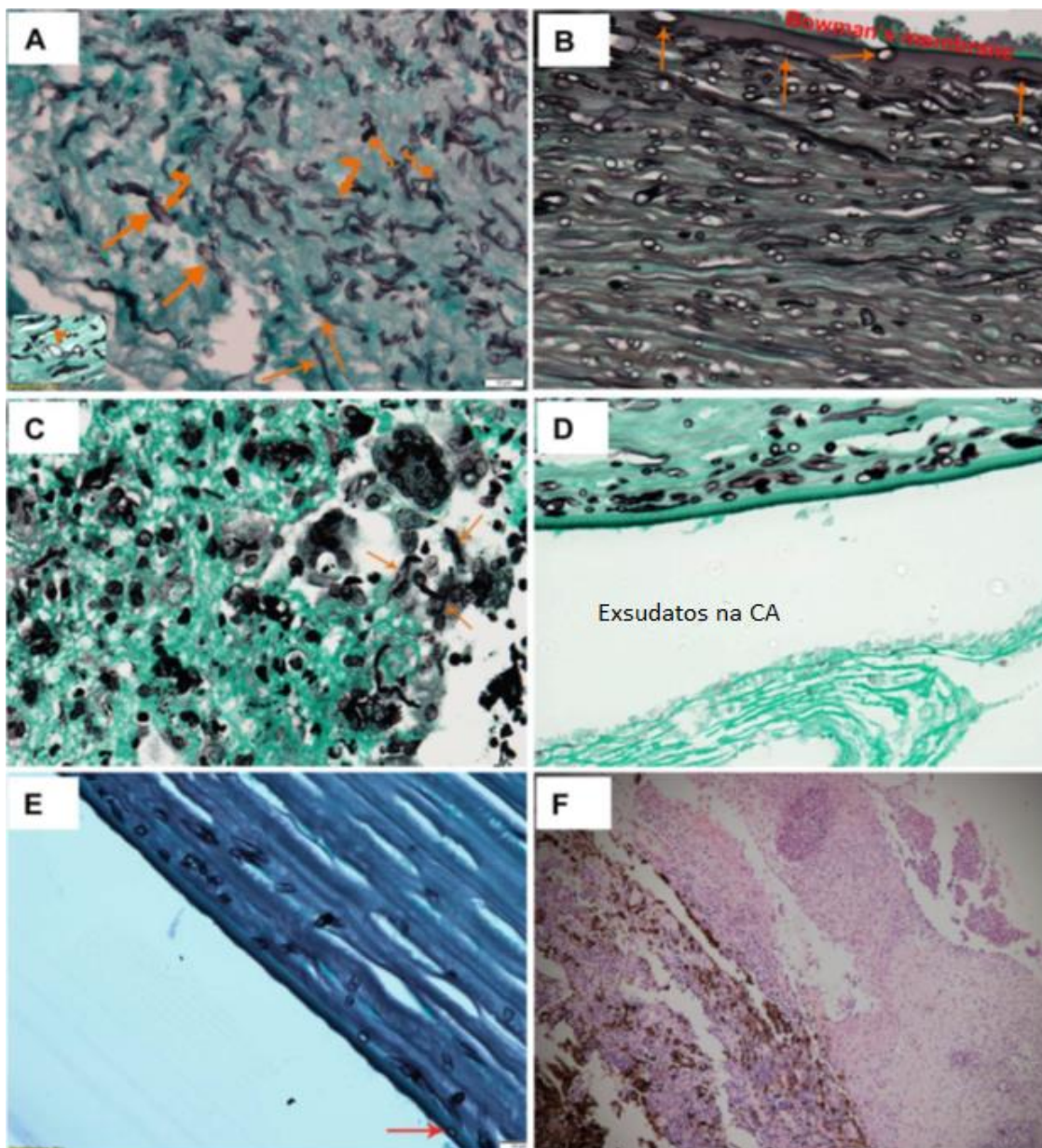
A: córnea perfurada por úlcera com inflamação difusa (hematoxilina-eosina), ampliação original de 20x. B: ulceração superficial com leve grau de inflamação estromal posterior (colchete em aberto) ampliação de 100x. C: leucócitos polimorfonucleares misturados com eosinófilos e restos fibrinosos, aumento de 600x. D: acometimento difuso (colchete laranja em aberto) pelos filamentos de *Pythium* em quase toda espessura corneana (coloração: GMS), ampliação original 100x. E: conjuntiva limbal: predominância de PMNLs e eosinófilos em um estroma frouxo com capilares com paredes finas (coloração: H&E), ampliação de 600x. F: estroma corneano posterior mostra inflamação granulomatosa, com células gigantes multinucleadas (símbolos em formato de diamante) contendo filamento de *Pythium* fantasmagórico (marcado com setas), pode-se observar também membrana de Descemet fragmentada com pigmento uveal (coloração: PAS), ampliação original 600x.



Fonte: MITTAL et al., 2017.

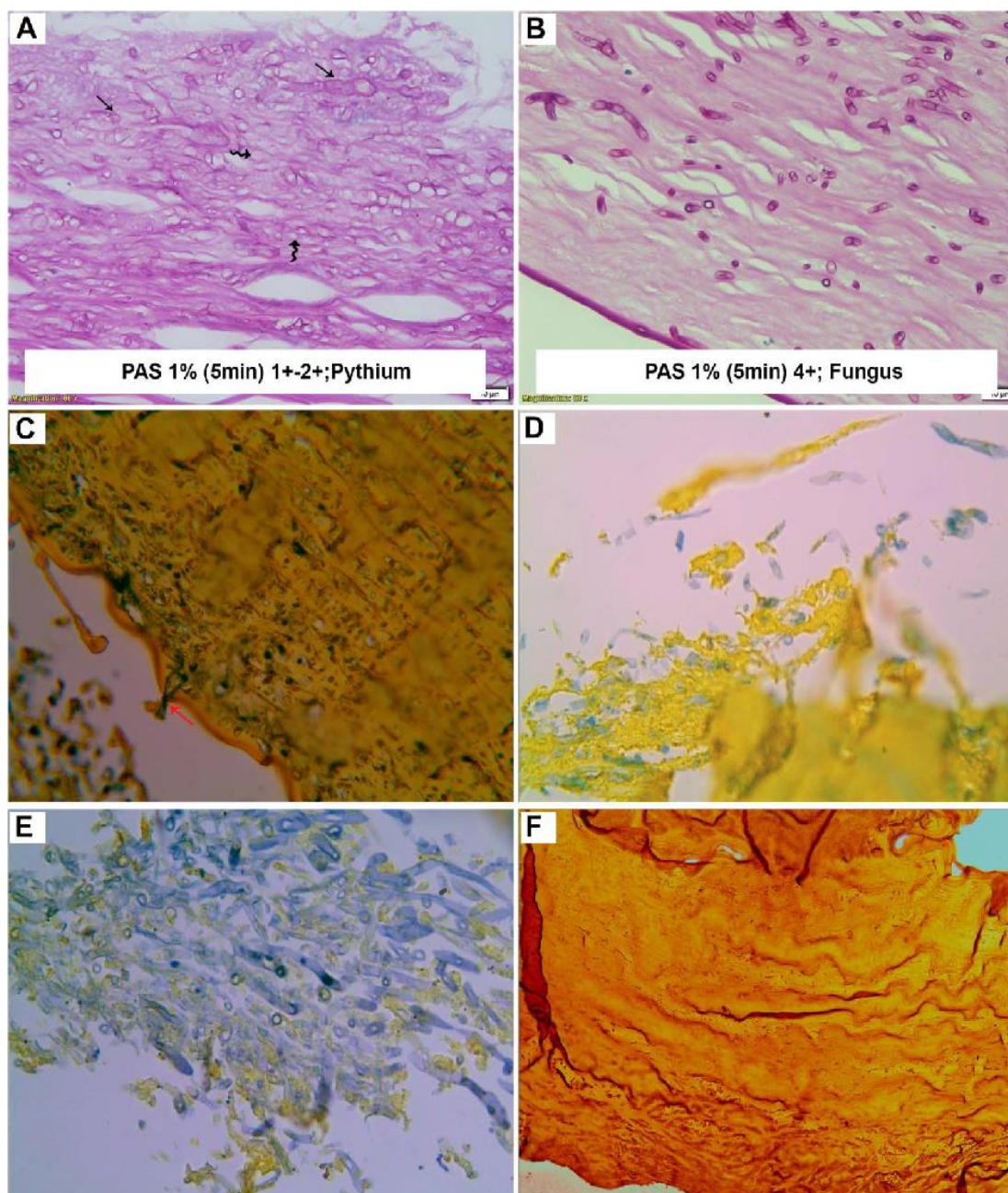
Uma combinação de coloração KOH-CFW a 10% demonstrou ter uma sensibilidade entre 79,3 e 96,5% e mais de 93% de especificidade na detecção de *Pythium* (HE *et al.*, 2016). Isso requer um microscópio de fluorescência e um microbiologista com experiência para estudar as imagens. O azul de tripano é um corante facilmente disponível que pode ser usado por oftalmologistas e estudado diretamente sem qualquer microscópio especial. Esta técnica tem uma sensibilidade de mais de 75% e especificidade de 68% (MITTAL; AGARWAL, 2018; SHARMA *et al.*, 2021). A coloração IKI-H₂SO₄ é uma adição recente que cora especificamente *Pythium*, mas não filamentos fúngicos, e diferentes estudos mostram uma especificidade próxima a 100% (MITTAL *et al.*, 2017; ANUTARAPONGPAN *et al.*, 2018). O IKI-H₂SO₄ pode ser usado como uma coloração muito específica para identificação de oomicetos patogênicos como *Pythium* spp. A recomendação é que todos os raspados de ceratites fúngicas, clinicamente suspeitas, devem ser avaliados pela coloração IKI-H₂SO₄, visto que a mesma pode auxiliar na identificação precoce de *Pythium*. A suspeição de ceratite por *Pythium* deve ocorrer pela morfologia dos filamentos, sua concentração ao longo do estroma posterior com envolvimento incomum de MD, resultados ruins de coloração em PAS. Diante desses achados, deve-se proceder com a coloração IKI-H₂SO₄. Os autores concluem que a coloração IKI-H₂SO₄ deve ser incluída na bateria de corantes utilizada para diagnóstico e diferenciação de infecções fúngicas e “fungos-like” (como os oomicetos) (Figuras 23 e 24). Estas podem passar despercebidas apenas pela coloração PAS (Figura 23) ou serem diagnosticada erroneamente como infecção fúngica com a coloração de GMS (MITTAL *et al.*, 2017).

Figura 22 - Morfologia do *Pythium insidiosum*.. A: filamentos largos (setas grossas), filamentos estreitos (setas finas), septações (seta em forma de cotovelo) e ramificação (setas curvas); (coloração: GMS) ampliação original 600x. B: elevada carga de *Pythium* com envolvimento da membrana de Bowman (setas). C: presença do organismo infeccioso no citoplasma de células gigantes setas) ampliação original de 600x. D: predominância de filamentos no estroma posterior, alcançando a Descemet e indentando-a (no entanto, nenhum filamento é visualizado dentro da Descemet) e presença de exsudatos na câmara anterior (CA), aumento original 600x. E: numerosos filamentos são vistos acima da MD, e visualização de filamentos ocasionais dentro da estrutura de MD (coloração: GMS), ampliação original 600x. F: úlcera corneana perfurada com exsudatos e tecido uveal em CA com um elevado grau de infiltrados inflamatórios (coloração: H&E), aumento de 100x



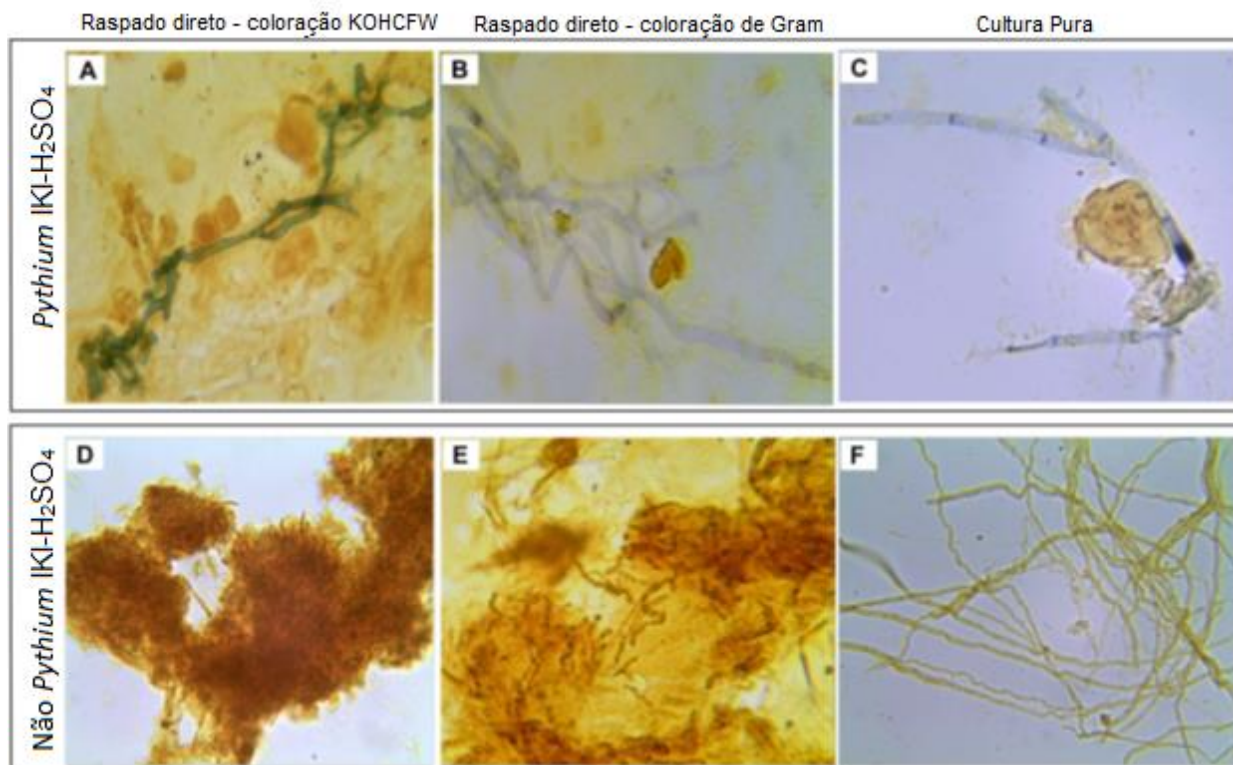
Fonte: Mittal *et al.*, 2017.

Figura 23 – Colorações comparativas em hifas fúngicas e por *P. insidiosum*. A e B: Resultados de coloração PAS (1% PA, 5 min). A: filamentos de *Pythium* com coloração ruim (1+ a 2+), ampliação original 600x. B: coloração efetiva de filamentos fúngicos (4+). C a E: pontos corados são positivos para *Pythium* - os filamentos de *Pythium* são destacadas em coloração azul, pode ser observado um filamento cruzando a de MD para atingir a CA (marcado com seta) (coloração: iodo-iodeto de potássio- ácido sulfúrico (IKI-H₂SO₄), ampliação original 400x. F: coloração para ceratite fúngica: os filamentos fúngicos parecem castanho-amarelados, o estroma da córnea também aparece castanho-amarelado (coloração: IKI-H₂SO₄), ampliação original, 100x.



Fonte: Mittal et al., 2017.

Figura 24 – Coloração por IKI-H₂SO₄ comparando fungos e *Pythium*. Fotomicrografia dos raspados da córnea. A a C: *Pythium* previamente corado com KOH-CFW (A) ou coloração de Gram (B), quando descorados e recoloridos com IKI-H₂SO₄, as estruturas filamentosas variam de azuladas a enegrecidas. Isolado de cultura pura, também, mostram coloração azul dos filamentos (C). D a F: esfregaços de raspagem sem *Pythium*: quando descoloridos e recoloridos com IKI-H₂SO₄ coraram o filamentos fúngicos de tons amarelados a marrom- amarelados (D–E). F: cultura isolada de colônia fúngica também corada de marrom-amarelada, ampliação original de 400x.



Fonte: Adaptado de Mittal *et al.*, 2017.

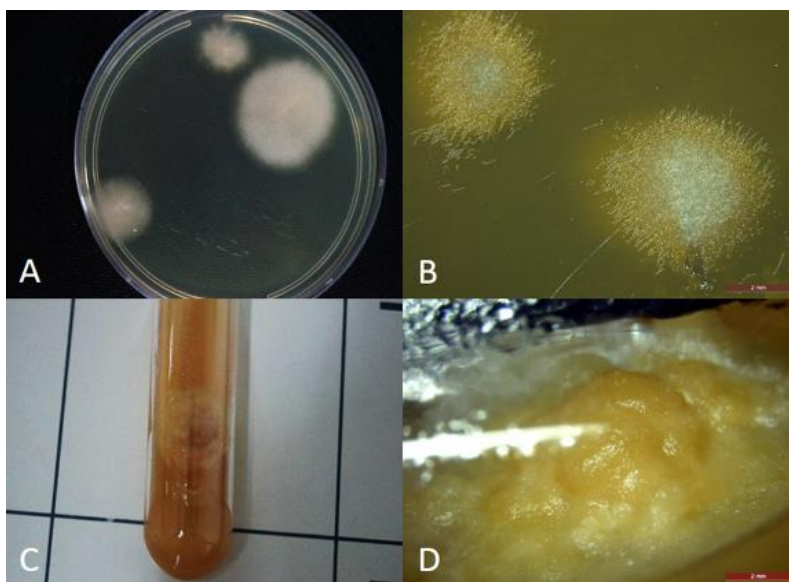
Uma ou diferentes combinações dos corantes acima, juntamente com um olho treinado e suspeita clínica, podem ajudar na detecção precoce de ceratite por *Pythium*. A microscopia confocal *in vivo* demonstra estruturas ramificadas semelhantes a fios de contas hiperrefletivas (MANI *et al.*, 2019; BAGGA *et al.*, 2022).

Cultura

Assim como outros oomicetos, *Pythium* cresce relativamente bem em uma variedade de meios.

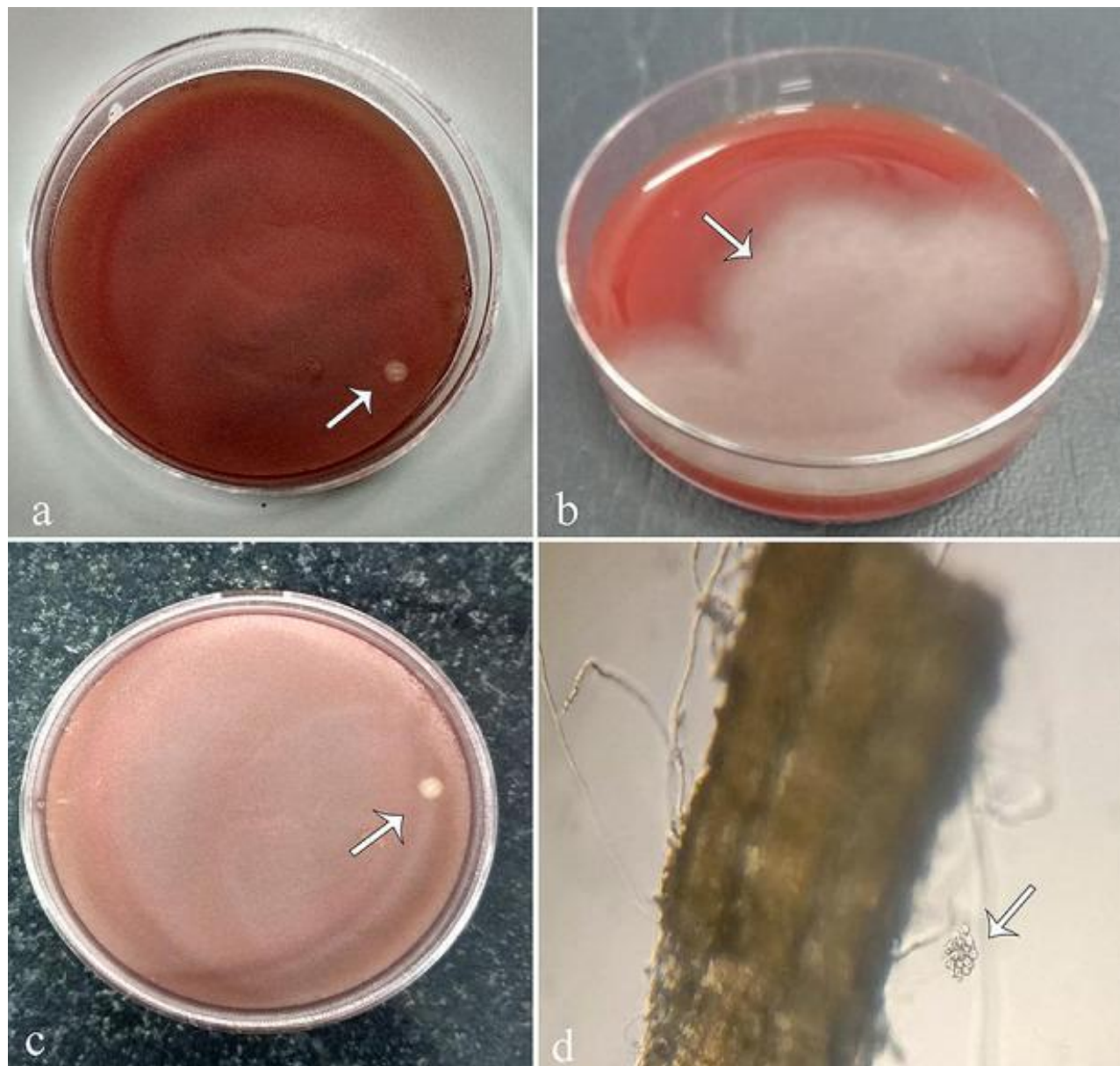
As colônias de *Pythium* são descritas com crescimento rápido a 37°C e a 25°C, de aspecto plano, incolor, amarelo-esbranquiçadas ou marrom claro com finas radiações do centro às bordas (BAGGA *et al.*, 2022; GURNANI *et al.*, 2022) com padrões de crescimento submerso e presença de micélios aderidos ao ágar. Apresentam característica úmida, margens filiformes e aspecto cremoso. Nos cultivos em placa com ágar batata, a colônia se mostra opaca, de coloração branco-amarelada com margens filiformes (Figuras 25A e B) (LELIEVRE *et al.*, 2015; HE *et al.* 2016; RATHI *et al.*, 2018). A cultura pode ser obtida por raspagem ou inoculação do botão da córnea em ágar sangue (Figura 16c), ágar batata dextrose (PDA) ou ágar Sabouraud dextrose (SDA). O *Pythium* spp. crescerá nos ágares bacterianos, fúngicos e amebianos mais comumente usados (Figuras 26 a-c). Foi demonstrado que folhas de grama com cultivo em água induzem a formação de zoosporos (Figura 2d) (BAGGA *et al.*, 2022; GURNANI *et al.*, 2022).

Figura 25 – Morfologias de *P. insidiosum* cultivados em uma placa de Petri (A, B) e em um tubo de ensaio (C, D) contendo ágar batata dextrose. (B) Os crescimentos branco-amarelados na placa apresentam forma plana e filamentosa. (D) *P. insidiosum* no tubo apresenta formas arredondadas e convexas.



Fonte: He *et al.*, 2016.

Figura 26 - *Imagens de cultura de ceratite por Pythium insidiosum*. a: imagem de ágar de sangue de ovelha a 5% representando uma colônia plana e branca acinzentada a 37° (2° dia). b: Colônia densa de cor creme de *Pythium* em ágar sangue de carneiro a 5% a 37° após 5 dias. c: Colônia branca submersa em ágar chocolate após 2 dias. d: Visão ampliada ($\times 10$) de uma pequena vesícula com formação de numerosos zoósporos após 3 h de incubação usando o método de encarnação foliar.



Fonte: Gurnani *et al.*, 2022.

O processo supracitado pode ser demorado (até 11 dias) e atrasar significativamente o início da farmacoterapia apropriada. A espectrometria de massa com ionização por dessorção a *laser* assistida por matriz (MALDI-TOF) é uma nova técnica

que demonstrou identificar rapidamente as espécies de *Pythium* nos estágios iniciais da cultura. Isso pode ser usado para detecção muito precoce de *Pythium* em placas de cultura com precisão (INKOMLUE *et al.*, 2016; MANI *et al.*, 2019).

Exame Histopatológico (HPE)

O HPE de botões corneanos fixados em formalina e embebidos em parafina, excisados durante ceratoplastia terapêutica (TPK) ou espécime eviscerado, é realizado com a utilização de diferentes corantes, como H&E, PAS e GMS (MITTAL *et al.*, 2017; GURNANI *et al.*, 2022). Esse teste, geralmente, é feito em estágios posteriores da doença, mas pode ajudar na confirmação do diagnóstico. A coloração IKI-H₂SO₄, também, é utilizada em HPE. Essa, normalmente, cora *Pythium*, mas não os filamentos fúngicos e tem 100% de especificidade, o que é melhor do que as colorações PAS ou GMS (MITTAL *et al.*, 2017).

Testes baseados em sorologia

Testes baseados em sorologia detectam antígenos ou anticorpos, além de testes como hemaglutinação (HA), ELISA, imunocromatografia (ICT) e imunodifusão (ID) estão disponíveis para a detecção de pitiose. O ensaio de coloração de imunoperoxidase, ELISA e ICT têm alta sensibilidade e especificidade. No geral, eles têm boa utilidade na pitiose sistêmica, mas não na ceratite, pois, geralmente, não há resposta significativa de anticorpos sistêmicos na ceratite (GURNANI *et al.*, 2022).

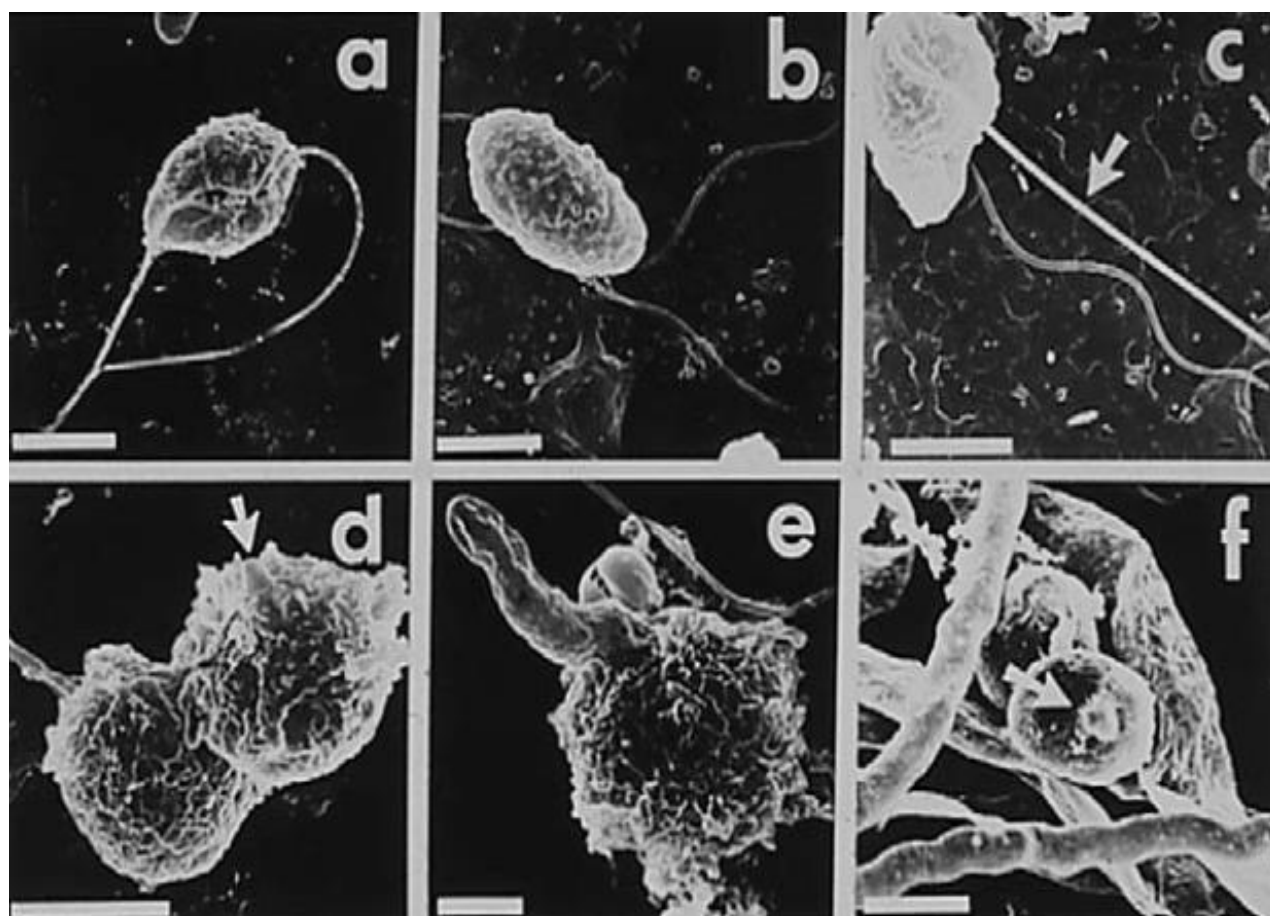
Identificação de Zoosporos

Os zoosporos são significativos para a identificação dos oomicetos patogênicos para mamíferos. Essas estruturas biflageladas não podem ser detectadas em cultura com ágar, mas podem ser encontradas em cultura de meio líquido ou em água contendo grama (HE *et al.*, 2016) ou solução de esporulação (MENDOZA; PRENDAS, 1988). Em

meios líquidos os filamentos formam esporângios contendo zoosporos que são liberados (Figura 27). Essas estruturas podem ser identificadas em microscopia óptica ou microscopia eletrônica. Entretanto, é relevante ressaltar que a formação de zoosporos biflagelados não é específica do *P. insidiosum* e *P. periculosum*, mas se trata, também, de uma característica de outras espécies de oomicetos (DE COCK *et al.*, 1987; MENDOZA *et al.*, 1993; HE *et al.*, 2016).

Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura dos zoosporos móveis de *Pythium insidiosum*

(a–c). Zoosporos encistados são caracterizados pela sua morfologia globosa (d–f). As setas indicam os locais que eram ocupados por flagelos. Uma substância amorfa usada para ligar os zoosporos ao tecido do hospedeiro é evidente na superfície dos zoosporos encistados. Zoosporos que se distanciam das folhas ou tecidos animais não secretam este material amorfo.



Fonte: Reproduzido com permissão de Mendoza; Hernandez; Ajello, 1993.

Testes moleculares (baseados em PCR)

Além da cultura positiva com formação de zoosporos, os testes de PCR são o único padrão-ouro, pois, normalmente, identificam sequências específicas de espécies do DNA (SHARMA *et al.*, 2015; BAGGA *et al.*, 2022). A PCR pode ser realizada como um teste rápido a partir de uma raspagem da córnea ou do crescimento em uma placa de cultura. As regiões de rDNA-ITS (espaçador transcrito interno) são geralmente visadas (KAMMARNJESADAKUL *et al.*, 2011; KOSRIRUKVONGS *et al.*, 2014). A PCR para detecção de *Pythium* evoluiu rapidamente. Inicialmente, teve uma sensibilidade de cerca de 90% com especificidade de 80%. Multiplex PCR visando 18S rRNA e ITS mostrou 100% de especificidade, mas 91% de sensibilidade. A mais recente técnica de PCR LAMP (amplificação isotérmica mediada por *loop*) tem 100% de sensibilidade e 98% de especificidade (GURNANI *et al.*, 2022). A PCR em tempo real visando uma proteína *exo-1*, 3-beta-glucanase é uma nova adição de valor com 100% de sensibilidade e especificidade, além de um tempo de resposta reduzido de 7,5 h (KEERATIJARUT *et al.*, 2015). Embora os alvos acima sejam usados para testes clínicos, PCR para alvos como *cox-II*, *ELI025*, gene *exo-1,3-β-glucanase* e outras técnicas como AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) estão sendo usadas para estudos populacionais de *Pythium* (GURNANI *et al.*, 2022).

2.3.7. Tratamento

ANTIFÚNGICOS

Antifúngicos, como natamicina a 5%, voriconazol a 1% e itraconazol a 1%, foram considerados medicamentos de primeira linha, pois o *Pythium* era erroneamente classificado como uma espécie fúngica (BAGGA *et al.*, 2021). A maioria dos relatos de casos e estudos anteriores mostram sucesso limitado com antifúngicos (HASIKA *et al.*, 2019; BAGGA *et al.*, 2021; GURNANI *et al.*, 2022). Antes dos resultados da cultura, as

hifas de *Pythium* imitam completamente as hifas fúngicas o que torna um desafio decidir sobre a droga de escolha com base apenas no quadro clínico. Portanto, os antifúngicos podem ser iniciados antes dos resultados da cultura e, assim que os resultados da cultura estiverem disponíveis, é possível, se necessário, mudar para o tratamento direcionado. Em casos clinicamente suspeitos com infiltrado de ponto reticular, projeções tentaculares e sulcos periféricos, antes dos resultados da cultura, o médico pode iniciar o tratamento antifúngico (GURNANI *et al.*, 2021). Apesar da alta prevalência de estudos refutando o uso de antifúngicos como opção terapêutica para ceratites por *Pythium*, há relato de susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* a drogas antifúngicas anfotericina B, hamicina, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e miconazol (SEKHON; PADHYE; GARG, 1992; ARGENTA *et al.*, 2007; CAVALHEIRO *et al.*, 2009; LORETO, 2010; THANATHANE *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2016; LERKSRTHIRAT *et al.*, 2017; HASIKA *et al.*, 2019).

TRATAMENTO CIRÚRGICO

Ceratoplastia Terapêutica

Devido à rápida capacidade de proliferação do microrganismo, alta taxa de virulência, resposta limitada aos medicamentos existentes e alta taxa de recorrência, o tratamento clínico da ceratite por *Pythium* pode não ser suficiente para controlar ou erradicar a infecção (GURNANI *et al.*, 2021). Nesses casos, a ceratoplastia terapêutica (TPK) deve ser planejada juntamente com o início do tratamento clínico. Os pacientes com fusão estromal precoce, descemetocle, perfuração da córnea, endoexsudatos não resolvidos e envolvimento escleral devem ser submetidos a TPK precoce dentro de 10 a 14 dias. Ao planejar a ceratoplastia terapêutica, é essencial ter um tamanho de trepanação pelo menos 1,5mm maior que o tamanho do infiltrado corneano (AGARWAL *et al.*, 2018; HASIKA *et al.*, 2019). Existem altos riscos de recorrência de infecção após a ceratoplastia (AGARWAL *et al.* 2018; AGARWAL *et al.*, 2019). O TPK é a base do tratamento para ceratite por *Pythium* (AGARWAL *et al.*, 2018; HASIKA *et al.*, 2019).

Ceratoplastia penetrante óptica (OPK)

Após TPK, quando o paciente estiver livre de infecção e, não houverem sinais de recorrência por 6 a 8 meses sob cobertura de esteróides, o paciente pode ser encaminhado para ceratoplastia penetrante óptica como um procedimento de reabilitação visual (GURNANI *et al.*, 2021).

Enucleação e evisceração

A alta virulência, a rápida proliferação de microrganismos e a tendência à disseminação limbal precoce, são responsáveis, por casos desafiadores no cenário das ceratites por *Pythium*. A evisceração tem sido relatada como uma modalidade de tratamento na endoftalmite secundária à ceratite por *Pythium*. O paciente que desenvolve panofthalmite deve ser submetido a enucleação (PUANGSRICHARN *et al.*, 2021; VISHWAKARMA *et al.*, 2021;).

TRATAMENTOS ADJUVANTES

Crioterapia com etanol

Para evitar a recorrência da infecção, medidas adjuvantes, como crioterapia no leito hospedeiro com etanol, foram tentadas com sucesso moderado. O mecanismo de ação da crioterapia ocorre por desidratação, infarto isquêmico das células e acúmulo de metabólitos tóxicos dentro das paredes celulares, o que as destrói. Já o etanol, promove a apoptose, aumenta a lise celular e reduz a proliferação das células, resultando, assim, em redução da vida celular. Agarwal e colaboradores (2020), em seu estudo, usaram crioterapia com etanol em seis de seus indivíduos com ângulo da câmara anterior e envolvimento escleral. Apenas um paciente apresentou recorrência, dessa maneira, essa modalidade de tratamento foi considerada eficaz (AGARWAL *et al.*, 2020).

Cola de cianoacrilato com bandagem de lente de contato (BLC)

A cola de cianoacrilato possui propriedades antibacterianas. Pode ter um efeito sinérgico em combinação com o tratamento clínico. Gurnani e colaboradores relataram o tratamento bem-sucedido de uma criança de 9 anos com derretimento estromal precoce com cola de cianoacrilato e BLC. Assim, em pacientes com derretimento estromal rápido, pacientes pediátricos com afinamento precoce da córnea, descemetocle e cola de perfuração da córnea com BLC são modalidades de tratamento adjuvante essenciais para resgate anatômico e funcional (GURNANI *et al.*, 2021; VISHWAKARMA *et al.*, 2021).

2.4. PITIOSE NO BRASIL

No Brasil, casos de infecção por *P. insidiosum* foram descritos em animais, especialmente em equinos (SANTURIO *et al.*, 1998; TABOSA *et al.*, 1999; LEAL, 2001; BOSCO *et al.*, 2005). Em humanos, há apenas um caso descrito causando lesões subcutâneas (BOSCO *et al.*, 2005). Casos de ceratite causadas por esse patógeno não foram ainda descritos. Porém, é muito provável que existam casos de ceratite nas zonas endêmicas que tenham sido erroneamente diagnosticados como ceratites causadas por fungos filamentosos. O *Pythium* apresenta diagnóstico desafiador, pois não há características clínicas patognomônicas que permitam diferenciar essa infecção de outras infecções corneanas fúngicas. A PCR (reação em cadeia da polimerase) e o sequenciamento de DNA compõem o principal método diagnóstico. No entanto, para a realidade brasileira, apresentam elevado custo e não está disponível em hospitais gerais (ANUTARATONGPAN *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

A pitiose ocular apresenta um grande desafio diagnóstico, portanto, não é incomum a ceratite por esses oomicetos ser erroneamente diagnosticada como infecção fúngica e, nesse caso, tratada como tal. Isso acontece, não apenas, pelo conhecimento insuficiente por parte dos oftalmologistas e patologistas, mas, também, pela dificuldade de acesso a métodos diagnósticos eficazes, com sensibilidade e especificidade adequadas (KAMOUN, 2003; LAMOUR *et al.*, 2009; GAASTRA *et al.*, 2010; TANHEHCO *et al.*, 2011; ANUTARATONGPAN *et al.*, 2018).

Atualmente, não existem protocolos universais ou tratamento padrão para pitiose. Vários autores relataram suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de várias cepas de *P. insidiosum* a alguns antifúngicos, incluindo os azóis, tanto em monoterapia quanto em combinação (SEKHON; PADHYE; GARG, 1992; SHENEP *et al.*, 1998; HE *et al.*, 2016).

Apesar de existirem vários trabalhos avaliando antimicrobianos e drogas antifúngicas em isolados de *P. insidiosum*, a maioria usaram amostras isoladas de lesões cutâneas ou intestinais recobrados em animais com a doença (SANTOS; LONDERO, 1974; FISCHER *et al.*, 1994; MORAL, *et al.*, 1997; SHENEP, 1998; MONTEIRO, 1999; MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2014; BAGAA *et al.*, 2021). Alguns relatos de estudos *in vitro* e tratamentos *in vivo* para pacientes com quadros de ceratite podem ser encontrados na literatura (ARGENTA *et al.*, 2008; LORETO *et al.*, 2014; BAGGA *et al.*, 2018; MAENO *et al.*, 2019; AGARWAL *et al.*, 2020; WORASILCHAI *et al.*, 2020; GURNANI *et al.* 2021; HOU *et al.*, 2021; SANE *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2022). No entanto, a maior parte aconteceu com testes de antibióticos e aqueles que testaram antifúngicos se restringiram ao uso dos azóis. A anfotericina B foi utilizada com sucesso em estudos que avaliaram da efetividade *in vivo* (THANATHANE *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2016). Devido a quantidade crescente de casos de ceratite por *P. insidiosum* em diferentes regiões do mundo, nos últimos 5 anos, se faz necessário avaliar melhor a suscetibilidade, às drogas antimicrobianas, dos isolamentos provenientes de casos de ceratite. Ademais, não existem testes direcionados para casos de ceratite causados por *P. periculosum*, uma vez que o mesmo foi descrito em estudo recente (MIRAGLIA *et al.*, 2022).

A intenção do presente estudo foi verificar se os isolados de casos de ceratite por *P. insidiosum* e *P. periculosum* apresentam diferentes padrões de suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas. A determinação da ação dessas drogas sobre os microrganismos demonstra importância fundamental para a instituição dos futuros tratamentos de casos de ceratite por este oomiceto no Brasil. É importante notar que esse trabalho é o primeiro a incluir *P. periculosum* na suscetibilidade a diferentes antifúngicos usados contra a pitiose ocular.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade inibitória de vários antifúngicos, a saber, anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol, para uso na terapia antifúngica em cepas de *Pythium insidiosum* e *Pythium periculosum* isoladas em casos de ceratites.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro*, através de testes de suscetibilidade padronizados (E-test®), contra os oomicetos *P. insidiosum* e *P. periculosum*.
- Realizar o primeiro teste de susceptibilidade *in vitro* a antifúngicos na espécie *P. periculosum* recém descrita.
- Definir um possível protocolo de tratamento para uso dos antifúngicos em casos de ceratite por *P. insidiosum* e *P. periculosum*.
- Avaliar a ação antifúngica apenas em casos de ceratite por *P. insidiosum* e *P. periculosum*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada visou a avaliação da ação antifúngica das drogas anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol em amostras de ceratite causadas por *Pythium insidiosum* e *Pythium periculosum*.

5.1. Seleção das amostras de *Pythium insidiosum* e *Pythium periculosum*

Foram selecionadas um total de 10 amostras isoladas de casos de ceratites causadas por *P. insidiosum* (6 isolamentos: MTPI 74, MTPI 75, MTPI 76, MTPI 77, MTPI 79 e MTPI 81. MTPI = **MedTech-Pythium**) e *P. periculosum* (4 isolamentos: MTPI 72, MTPI 80, MTPI 82 e MTPI 46) existentes na coleção da *Biomedical Laboratory Diagnostics* na *Michigan State University* – Michigan – Estados Unidos da América. Todas as amostras já haviam sido previamente identificadas por PCR, sequenciamento de DNA e análise filogenética.

5.2. Indução a zoosporogênese

Inicialmente foi realizada a seleção de uma colônia única, derivada de apenas um zoosporo (garantindo, assim, homogeneidade), nas amostras de *P. insidiosum* e *P. periculosum* contidas no acervo da BLD, em MSU. As colônias foram replantadas em farinha de milho (AFM) (BBL, *Sparks, Maryland*) e incubadas a 25°C por 24 a 72 horas. A partir dessas amostras, foram obtidos zoosporos, induzidos utilizando o protocolo de zoosporogênese de Mendoza e Prendas (1988), seguindo os seguintes passos.

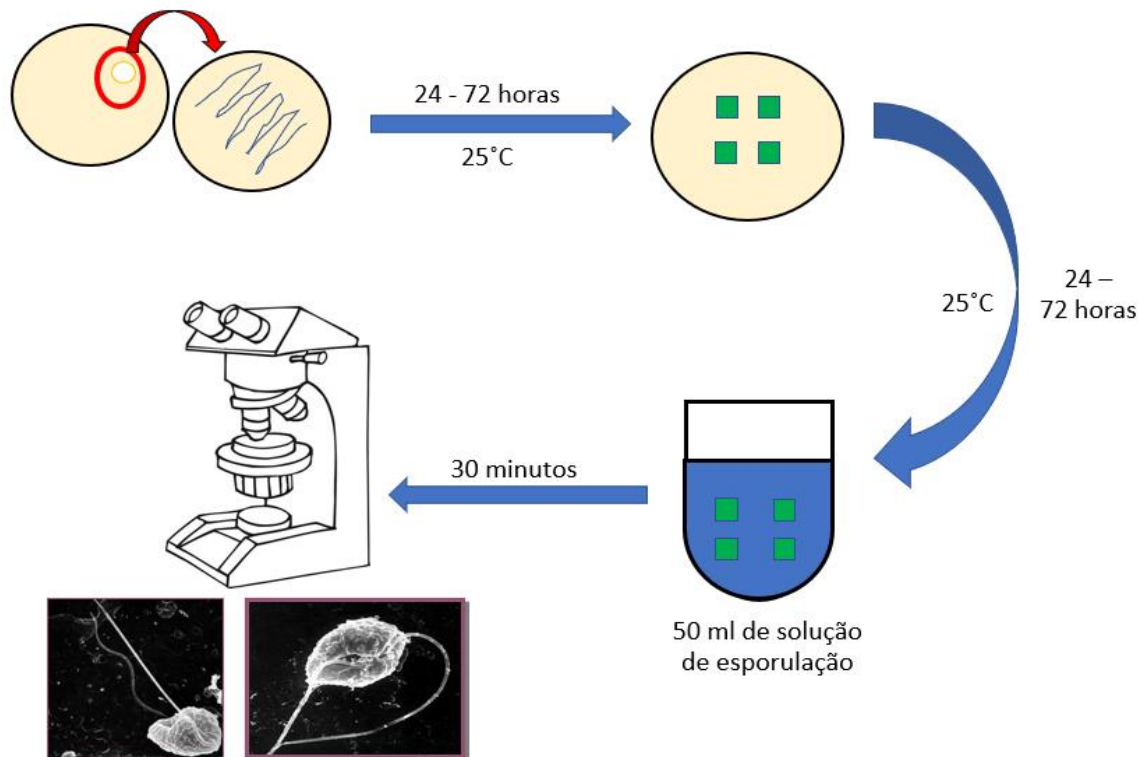
- Após a incubação, fragmentos de grama autoclavados, com aproximadamente 4 x 10mm, foram posicionadas sobre os blocos de ágar e encubados a 25°C por 24-72 horas.
- Então, as lâminas de grama foram colocadas em béqueres contendo 50mL de mistura para esporulação.

- A mistura de esporulação é confeccionada a partir de duas soluções: a primeira contendo 66,04g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 68,05g KH_2PO_4 e 87,09g K_2HPO_4 em 500mL de água; e a segunda contendo 18,38g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 25,42g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 250mL de água.
- As duas soluções são autoclavadas, separadamente, e armazenadas em temperatura ambiente até o uso.
- A mistura final de esporulação é preparada com 0,5mL da primeira solução e 0,1mL da segunda solução em 1L de água destilada estéril.
- Os béqueres contendo 50mL dessa mistura diluída de esporulação e as lâminas de gramas parasitadas foram incubadas a 25°C, por 24 a 72 horas.
- O desenvolvimento dos esporângios e zoosporos foram avaliados microscopicamente a cada 30 minutos de intervalo por 6 ou mais horas.

Rapidamente, 500µL do caldo contendo zoosporos foram adicionadas na superfície de placas de ágar Sabouraud dextrose 2% (ASD) a 25°C por 24 h, para seguimento dos próximos passos com a realização do E-test®.

Os passos descritos para indução da zoosporogênese estão sumarizados esquematicamente na Figura 28.

Figura 28 Processo esquemático da indução à zoosporogênese para obtenção de zoosporos de *P. insidiosum* e *P. periculosum*



Fonte: Arquivo pessoal e adaptado de Mendoza; Hernandez; Ajello, 1993.

5.3. Fármacos antifúngicos

Baseada na facilidade de administração, na disponibilidade de uso tópico, na frequência de utilização nacional, nos tratamentos oftalmológicos e em estudos prévios, as drogas selecionadas para o estudo foram anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol.

5.4. E-test®

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos (TSA) foram padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com o primeiro protocolo aprovado, em 1997, para *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*. Já o protocolo descrito para o TSA de alguns fungos filamentosos foi aprovado, em 2002 (ERNST, 2005). Atualmente,

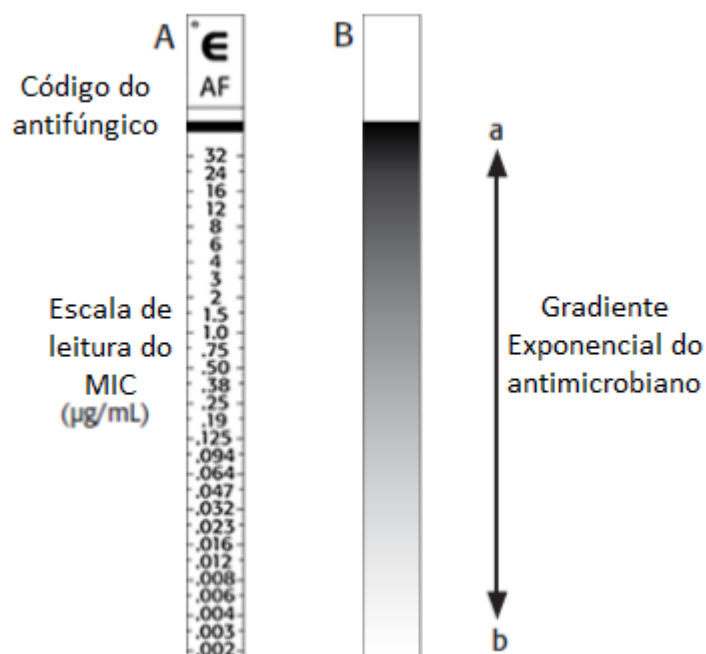
os protocolos aprovados são os testes de disco difusão para leveduras, documento M44-A (Sheehan e *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2004), os testes de macro e microdiluição, documentos M38-A2, para fungos filamentosos (Rex e *Clinical and Laboratory Standards Institute.*, 2008a) e os testes para leveduras, documento M27-A3 (Rex e *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008b).

Outros métodos de TSA incluem o E-test® e métodos colorimétricos comerciais, sendo que suas eficiências estão baseadas em estudos de correlação com os métodos do CLSI (CANTON *et al.*, 2009; NeGri *et al.*, 2009).

O teste de escolha para o presente estudo foi o E-test®, devido a sua praticidade e eficiência na análise dos resultados.

O E-test® (AB Biodisk, Solna, Suécia) é composto por uma fita plástica, não porosa (disponível comercialmente). O sistema compreende um gradiente antifúngico predefinido que é usado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC, em µg/mL) de diferentes agentes antimicrobianos contra microrganismos testados em meio ágar após incubação. Se trata de uma fita que oferece uma escala de leitura MIC em µg/mL em um lado (A) e uma gradiente antifúngico pré-definido do outro lado (B) (Figura 29). O halo formado ao redor da fita, no final do teste, assume a forma elíptica dando origem ao nome do teste, *Episilometer test*.

Figura 29 – Exemplo de fita de E-test®.



Fonte: adaptado do manual do fabricante BioMérieux SA.

As fitas devem ser posicionadas em placas de 90mm com até duas fitas ou placas de 150mm com até 6 fitas, a fim de facilitar a leitura do resultado (Figura 30).

Figura 30 – Foto demonstrativa do posicionamento das fitas do E-test®.



Fonte: adaptado de manual do fabricante BioMérieux SA.

Esse teste baseia-se na difusão do gradiente antimicrobiano, no ágar, para a determinação da sensibilidade da amostra fúngica ao antifúngico testado.

Foram utilizadas fitas correspondentes às drogas anfotericina B (AMB – sigla encontrada na fita de E-test® , não necessariamente corresponde à abreviatura usada

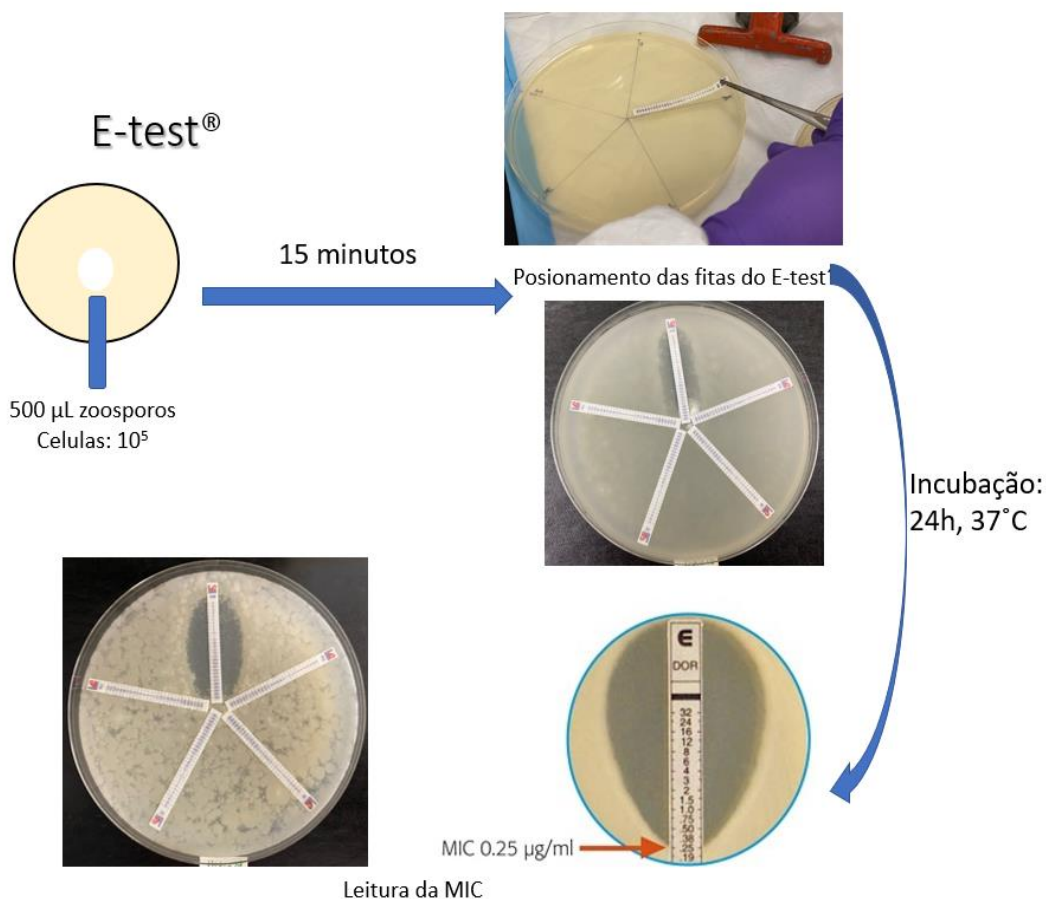
para a droga) com intervalo MIC de 0,002-32 μ g/mL, fluconazol (FLU – sigla encontrada na fita de E-test® , não necessariamente corresponde à abreviatura usada para a droga) com intervalo MIC de 0,016-256 μ g/mL, cetononazol (KE – sigla encontrada na fita de E-test® , não necessariamente corresponde à abreviatura usada para a droga) com intervalo de MIC de 0,002-32 μ g/mL, itraconazol (ITC – sigla encontrada na fita de E-test® , não necessariamente corresponde à abreviatura usada para a droga) com intervalo MIC de 0,002 - 32 μ g/mL e posaconazol (POS – sigla encontrada na fita de E-test® , não necessariamente corresponde à abreviatura usada para a droga) com intervalo MIC de 0,002 - 32 μ g/mL; produzidas pelo fabricante *Diagnostici Liofilchem*.

A realização do E-test® para as amostras de *P. insidiosum* e *P. periculosum* testadas seguiu os passos descritos, a seguir e, esquematizados na Figura 31.

Para a continuação do processo e realização do E-test® os seguintes passos foram cumpridos.

- Com o auxílio de uma espátula descartável, a amostra contendo zoosporos na quantidade 500 μ L foi semeada sobre a superfície da placa de ASD.
- Após 15 minutos, em média, as fitas de E-test® são dispensadas sobre o ágar. Em placas de 150mm de diâmetro, deve-se aplicar no máximo 6 fitas e, em placas de 90 mm, 2 fitas.
- No presente estudo, foram aplicadas as 5 fitas de E-test® correspondentes aos antifúngicos selecionados (anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol) em uma placa de petri de 150mm.
- Após o período de incubação de 24 horas a 37°, a determinação da MIC foi lida como o ponto de intersecção entre a fita de E-test® e a zona de inibição do crescimento do microrganismo.

Figura 31 – Esquema representando semeadura dos zoosporos, aplicação das fitas do E-test® e leitura da MIC.



Fonte: Arquivo pessoal e adaptado de manual do fabricante do E-test® BioMérieux AS.

As fitas devem ser mantidas em *freezer* comum (não *frost-free*) a -20°C por 2 a 5 anos, geralmente. As mesmas devem ser removidas do congelador 20 minutos antes do seu uso, para que atinjam a temperatura ambiente. Deve-se colocar no máximo 6 fitas em placas de 150mm e duas fitas em placas de 90mm. O posicionamento correto das fitas é com a escala numérica na face superior e o gradiente da concentração do antimicrobiano em contato com o ágar. A sigla que identifica o antimicrobiano deve ser mantida próxima à borda da placa e, é importante, ter cuidado para não mover as fitas. Uma vez colocadas, elas não devem ser removidas do lugar, pois a difusão da droga é imediata.

Após a colocação das fitas, foi realizada pressão leve com o auxílio de uma pinça para remoção das bolhas de ar que podiam ter se formado.

Leitura da MIC:

- As placas de ASD contendo as amostras e as fitas foram incubadas a 37°C, por um período de 24h.
- Após a incubação, procedeu-se com a leitura das placas (figura 31).
- A tampa da placa foi removida e o MIC foi determinado, a concentração que se situa no ponto mais inferior de intersecção entre a zona de inibição do crescimento do microrganismo e a fita de E-test®.

Este método é considerado inóculo, independente e pode ser facilmente adaptado a diferentes condições que possam favorecer a expressão da resistência antifúngica.

6. RESULTADOS

As amostras de *P. insidiosum* e *P. periculosum* foram catalogadas e divididas. Para cada amostra foi determinada uma placa de ASD contendo os zoosporos do agente etiológico e a identificação precisa. Em cada placa, de 15cm, foram alocadas as 5 fitas de E-test® correspondentes aos antifúngicos anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ), cetoconazol (KCZ), itraconazol (ICZ) e posaconazol (PCZ).

Para *P. insidiosum* foram avaliadas 6 amostras identificadas como MTPI 74, MTPI 75, MTPI 76, MTPI 77, MTPI 79 e MTPI 81. Todas provenientes de casos de ceratites da Índia.

Para *P. periculosum* foram avaliadas 4 amostras identificadas como MTPI 72, MTPI 80, MTPI 82 e MTPI 46. Sendo as três primeiras provenientes de casos de ceratites da Índia e a última de um caso de ceratite em paciente de Israel, diagnosticado em Boston, MA, EUA (TANHEHCO *et al.*, 2011).

A Tabela 2 relaciona as amostras utilizadas com os microrganismos correspondentes a cada uma delas, o local de origem dos casos de ceratite e os resultados representados pelas leituras de MIC dos E-tests® de cada antifúngico selecionado para o estudo.

Além de todas as amostras de *P. insidiosum* e *P. periculosum* serem sensíveis a anfotericina B, em todas as concentrações, com leituras de E-test® inferiores ao MIC mínimo, outro achado importante foi evidenciado. As amostras correspondentes ao *P. periculosum* foram mais difíceis de manipular, apresentando crescimento mais lento e menos exuberante que aquelas correspondentes ao *P. insidiosum* (figuras 32 a 37). Visualmente, no *P. periculosum*, pode-se observar, nas placas, o crescimento menos intenso, representado por colônias menores e mais esparsas, quando comparadas ao aspecto homogêneo de crescimento do *P. insidiosum* (figuras 38 a 42)

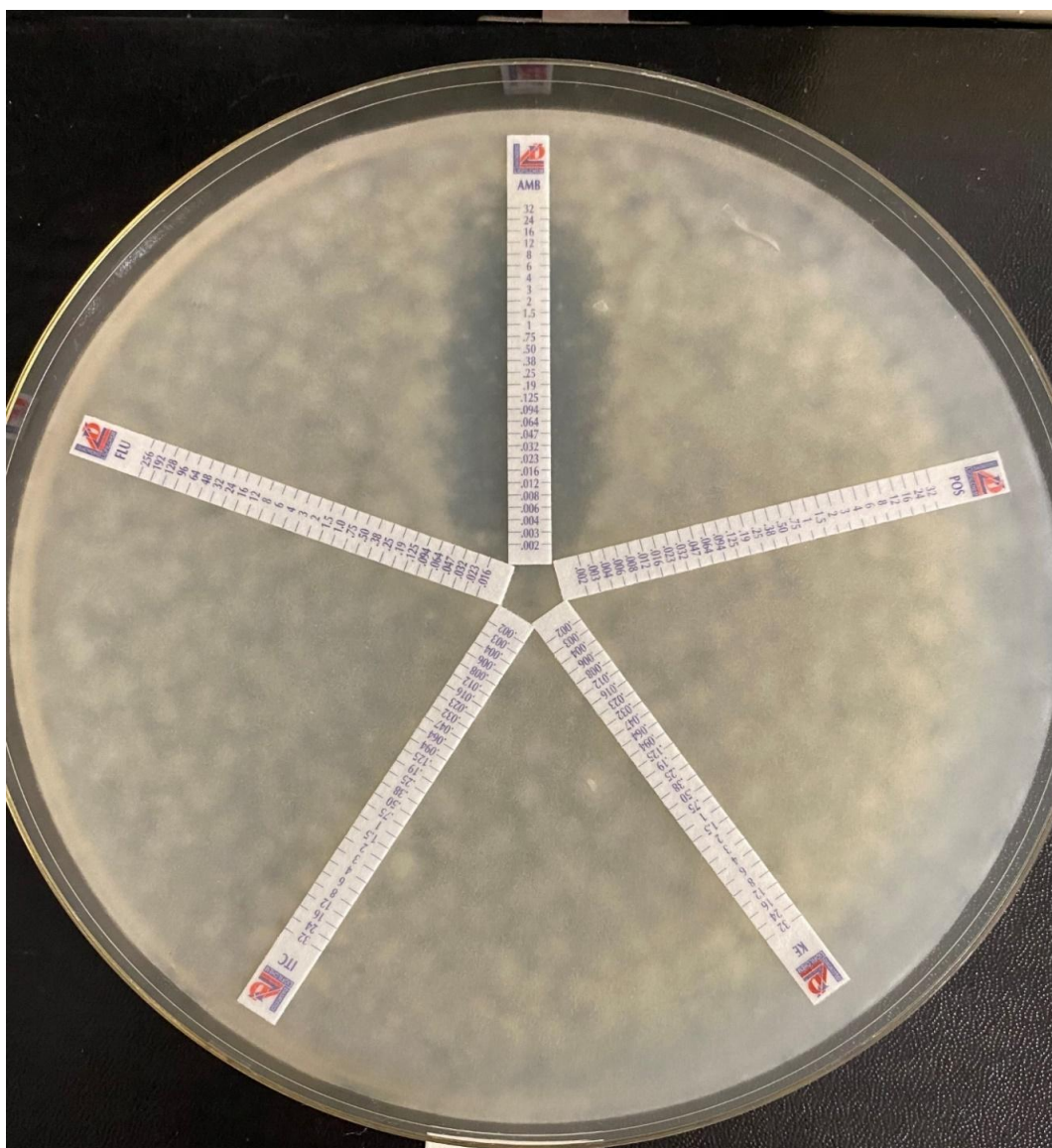
Tabela 2 – Relação da amostra utilizada com o agente etiológico e seu resultado no E-test®.

Amostra	Microrganismo	Origem	Leitura do MIC
MTPI 74	<i>P. insidiosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 75	<i>P. insidiosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 76	<i>P. insidiosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 77	<i>P. insidiosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 79	<i>P. insidiosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 81	<i>P. insidiosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 72	<i>P. periculosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 80	<i>P. periculosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 82	<i>P. periculosum</i>	Índia	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição
MTPI 46	<i>P. periculosum</i>	Israel	AMB: MIC = inferior a 0,002µg/mL FCZ, KCZ, ICZ, PCZ: MIC = ausência de halo de inibição

Fonte: Arquivo pessoal.

A amostra MTPI 74 de *P. insidiosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 32). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. insidiosum*.

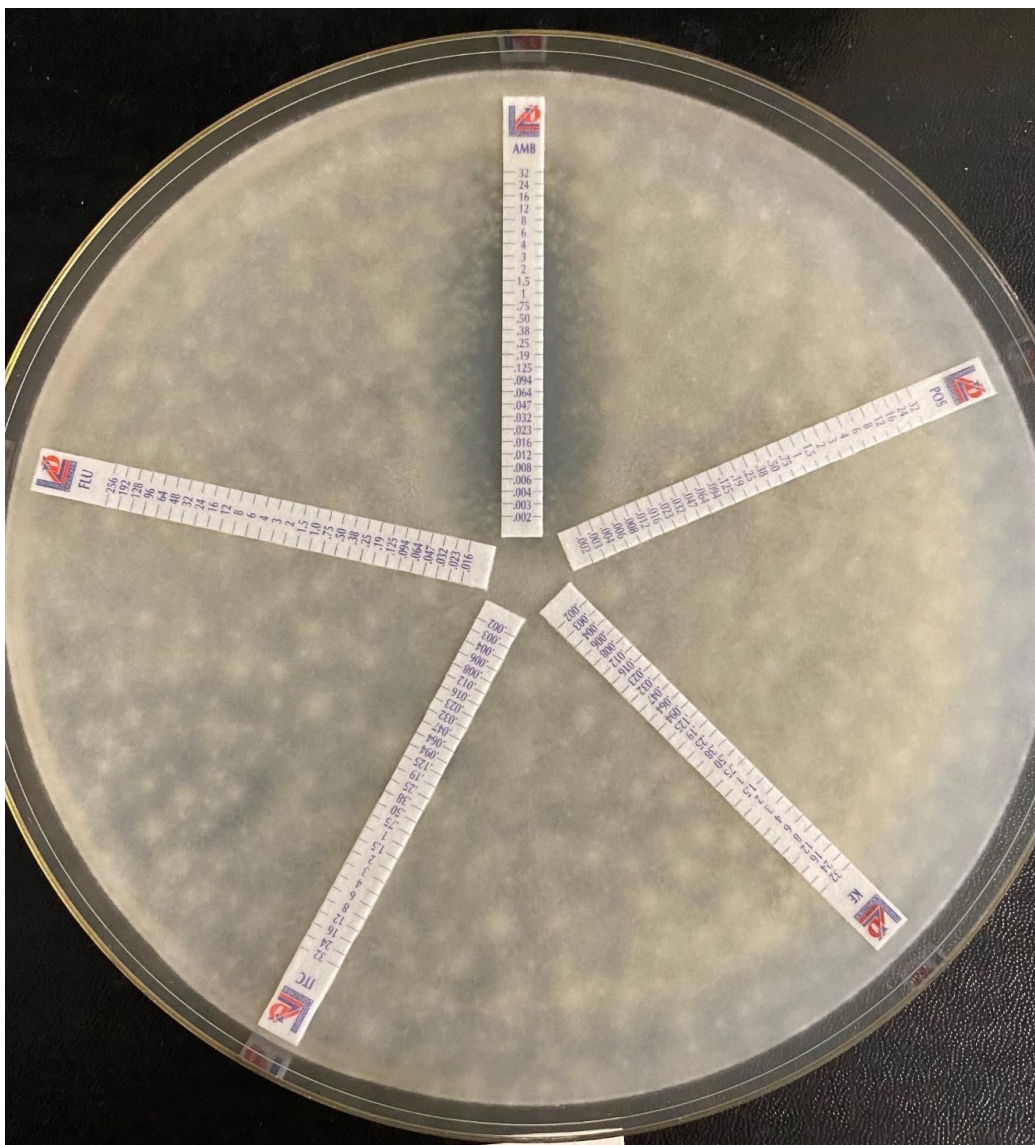
Figura 32 – Amostra MTPI 74 de *P. insidiosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 75 de *P. insidiosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 33). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. insidiosum*.

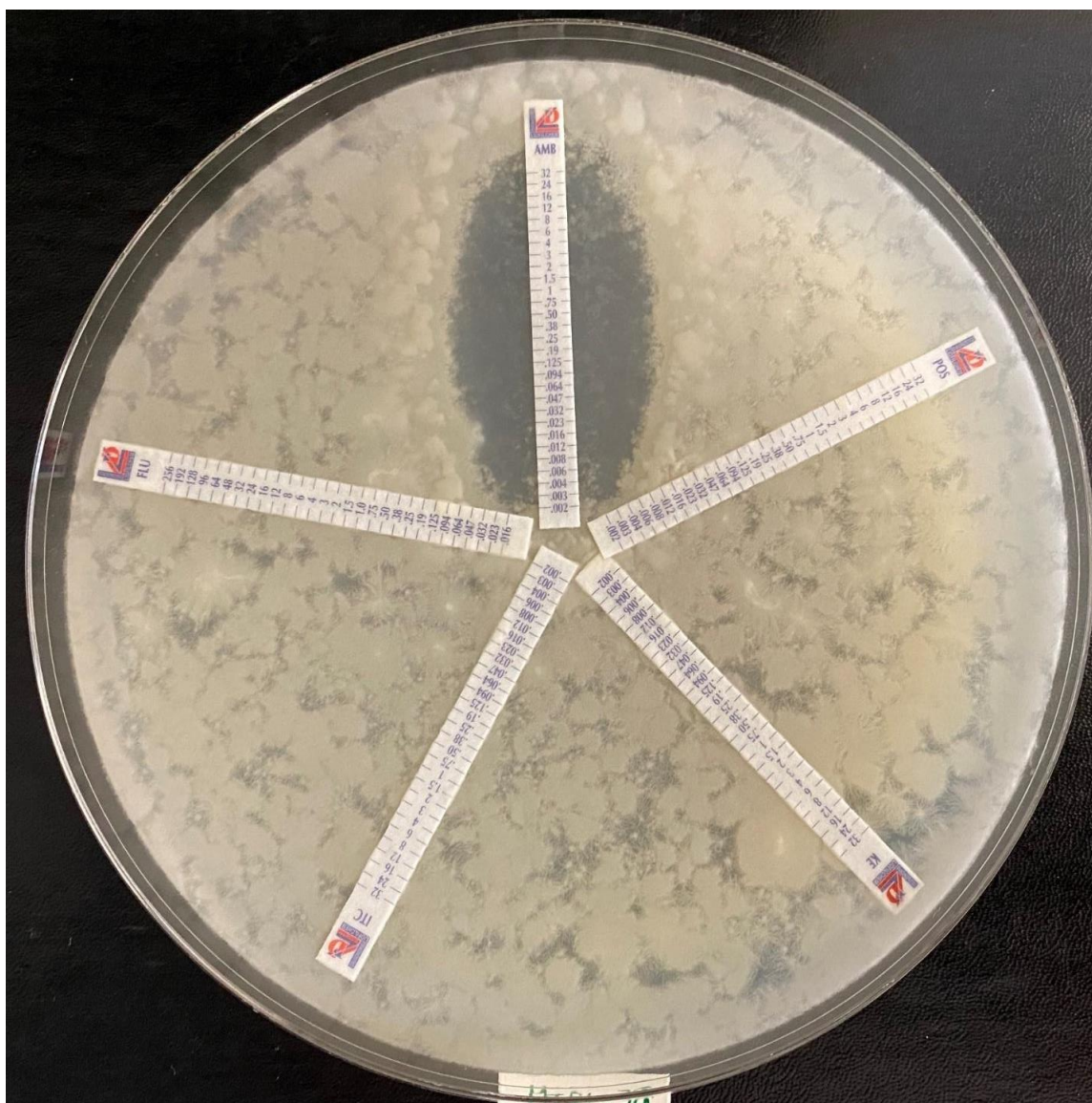
Figura 283 – Amostra MTPI 75 de *P. insidiosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 76 de *P. insidiosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 34). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. insidiosum*.

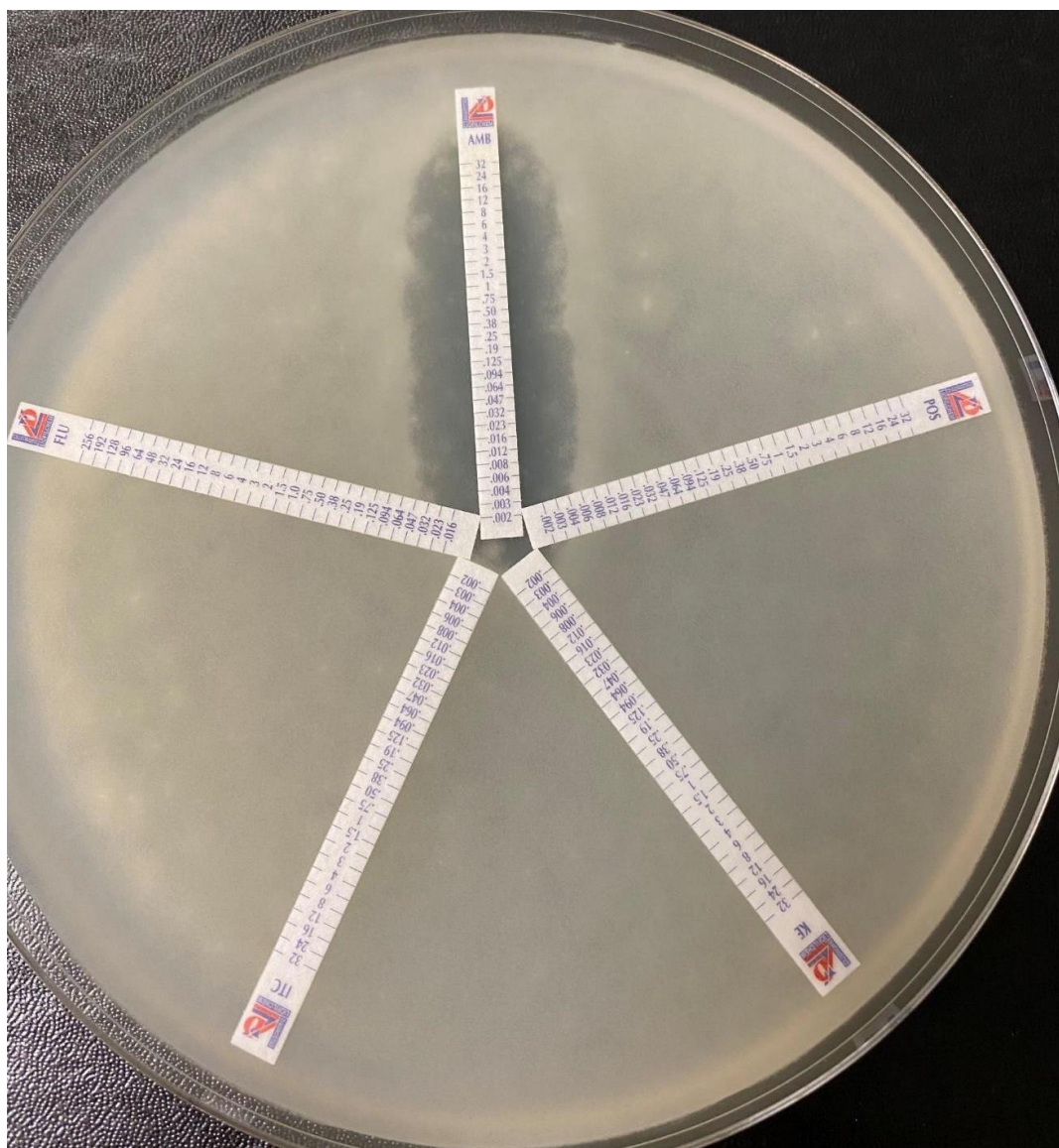
Figura 34 – Amostra MTPI 76 de *P. insidiosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 77 de *P. insidiosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 35). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. insidiosum*.

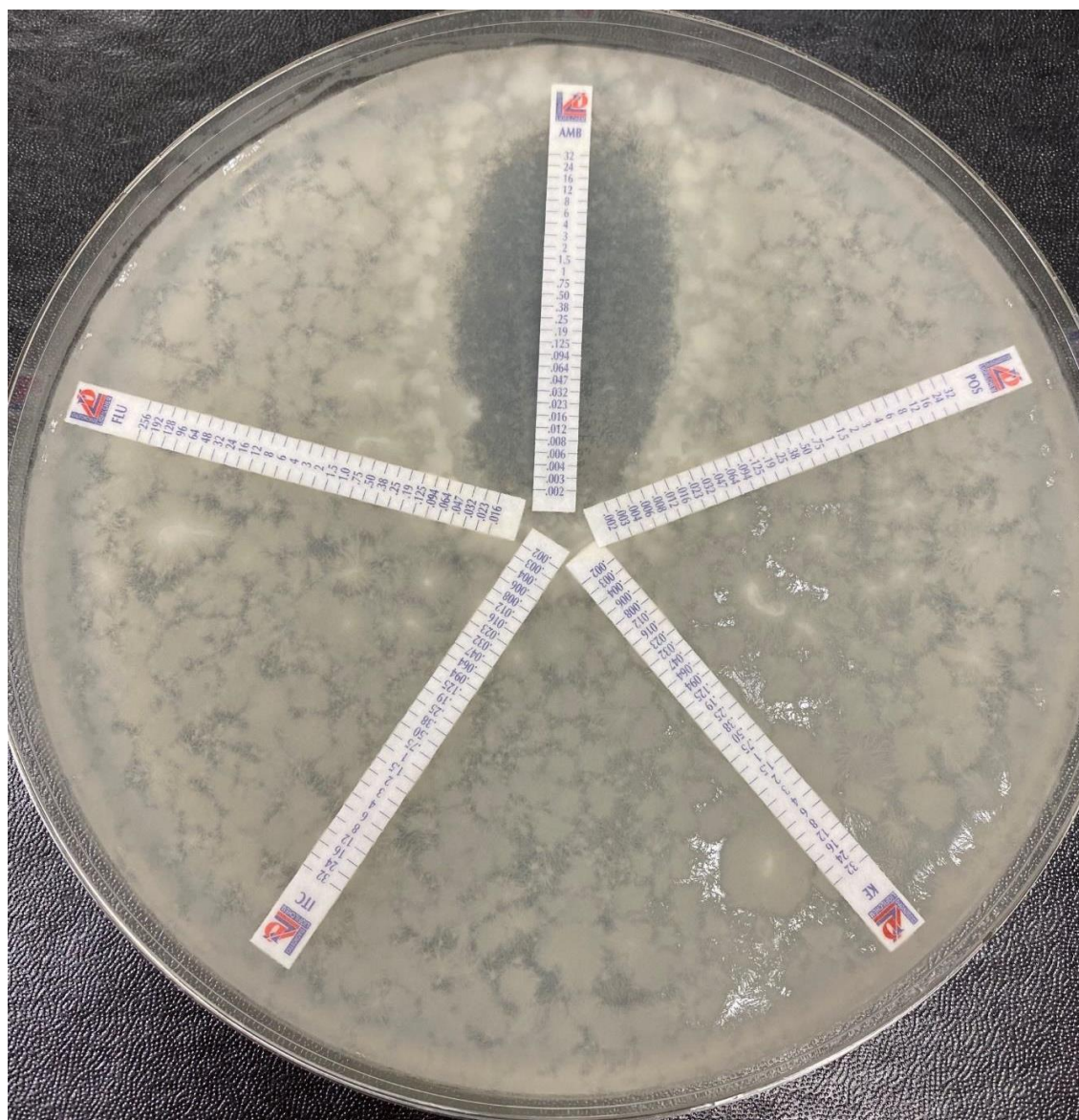
Figura 35 – Amostra MTPI 77 de *P. insidiosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 79 de *P. insidiosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 36). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. insidiosum*.

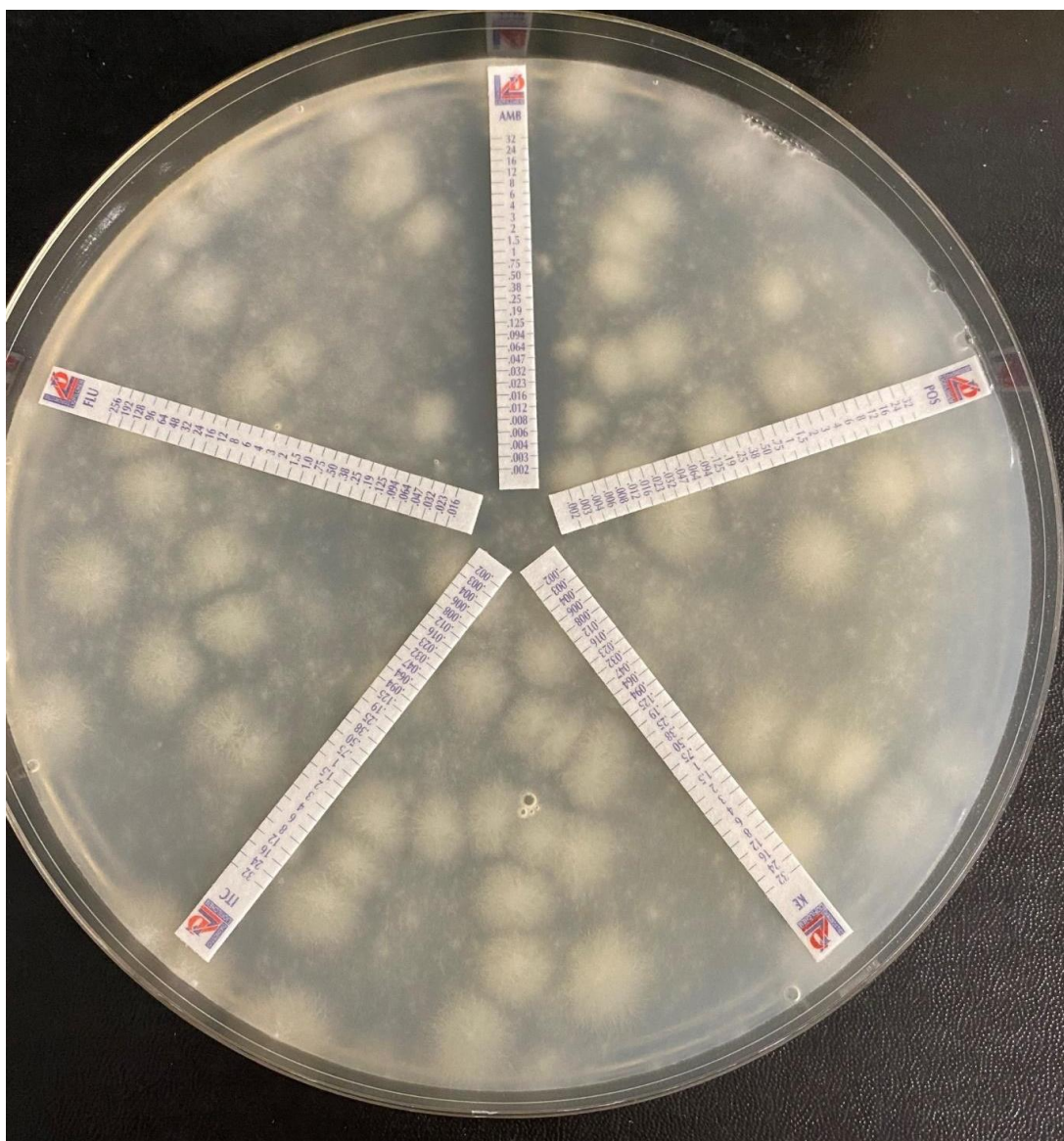
Figura 296– Amostra MTPI 79 de *P. insidiosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 81 de *P. insidiosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 37). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. insidiosum*.

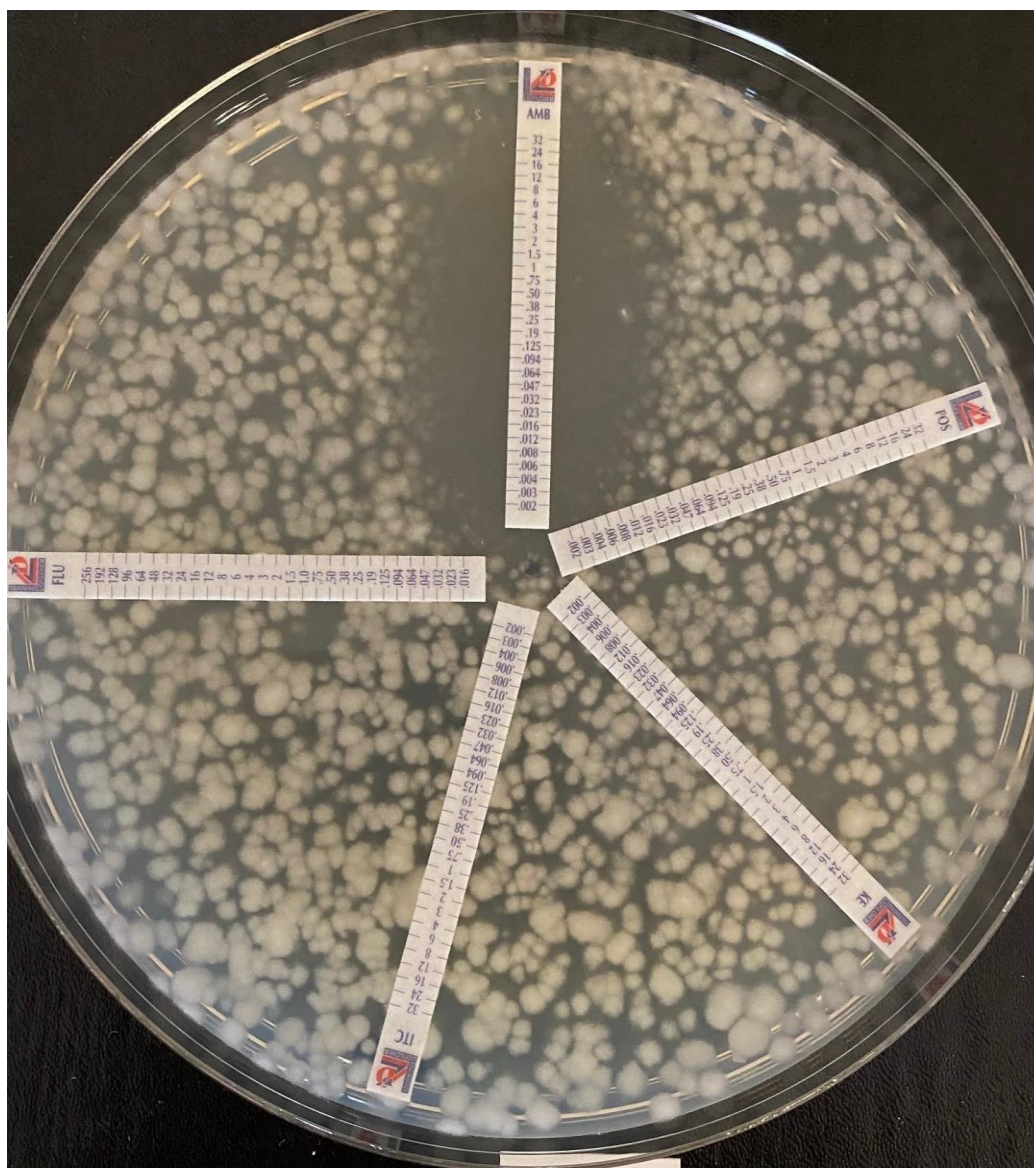
Figura 37 – Amostra MTPI 81 de *P. insidiosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 72 de *P. periculosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 38). Os demais antifúngicos não foram efetivos na inibição do crescimento do *P. periculosum*.

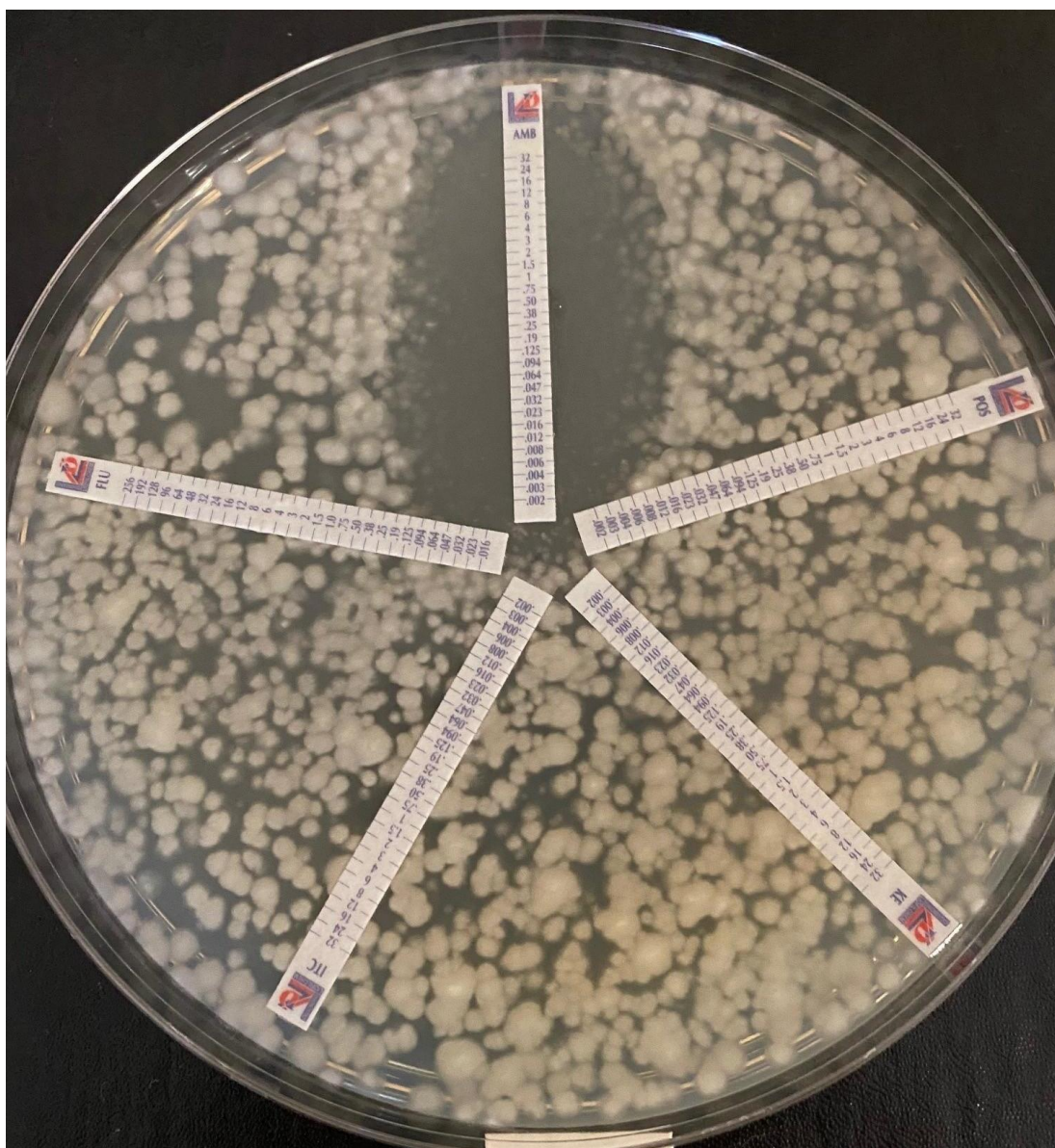
Figura 38 – Amostra MTPI 72 de *P. periculosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 80 de *P. periculosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 39). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. periculosum*.

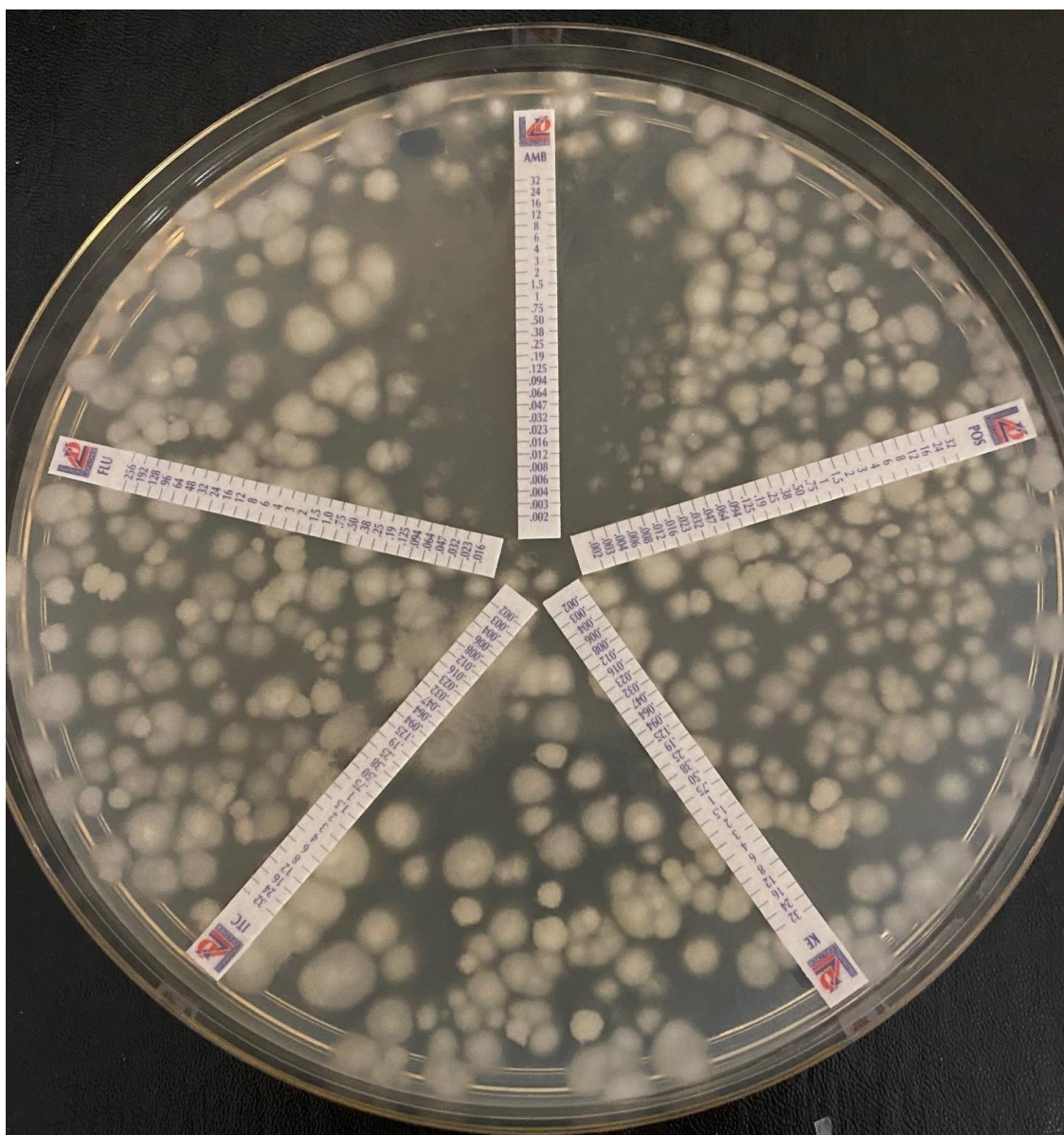
Figura 39– Amostra MTPI 80 de *P. periculosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 82 de *P. periculosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 40). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. periculosum*.

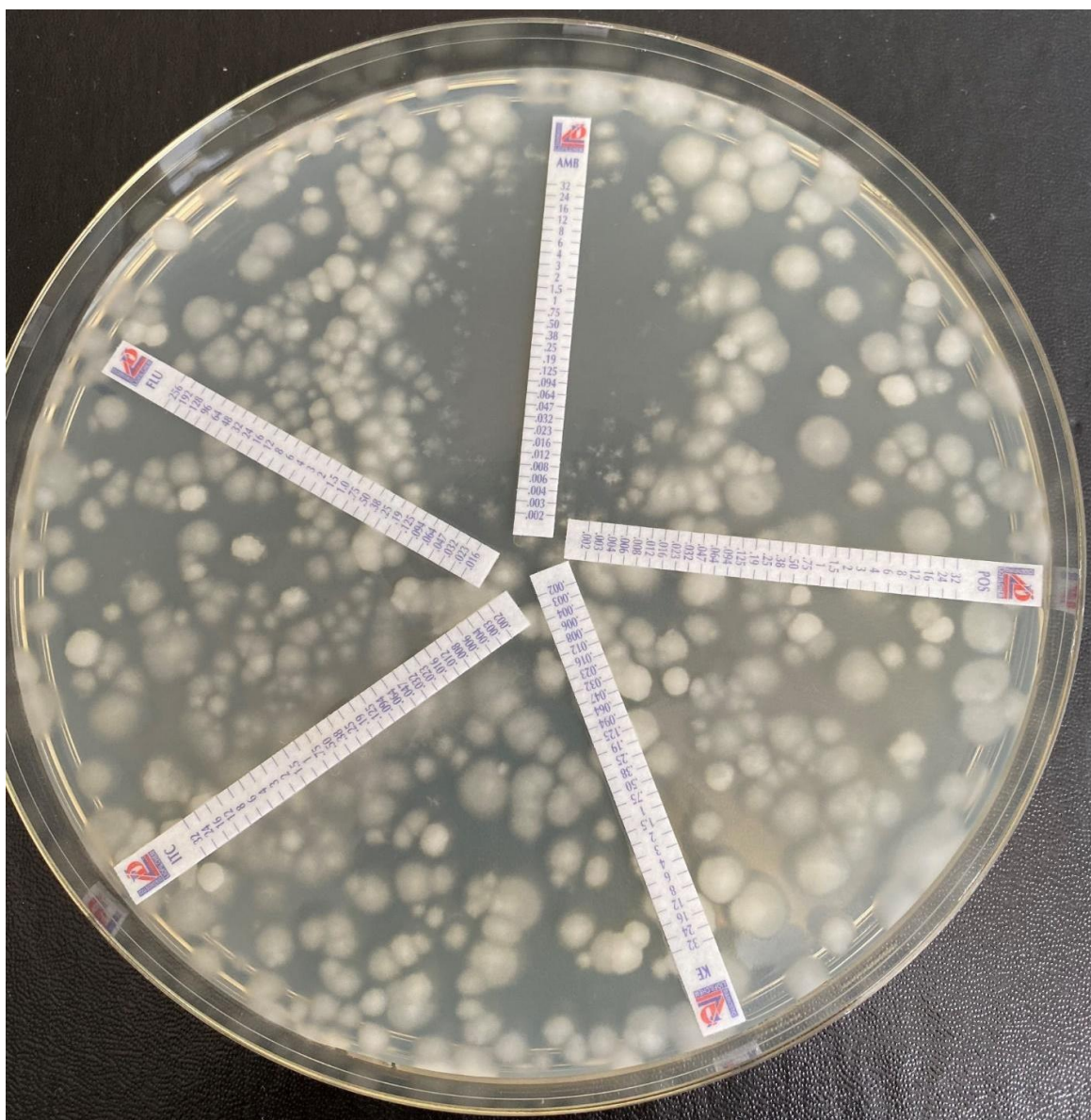
Figura 40 – Amostra MTPI 82 de *P. periculosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

A amostra MTPI 46 de *P. periculosum* apresentou resultados de inibição completa de crescimento do microrganismo para todas as concentrações de MIC, inclusive a mais inferior – 0,002µg/mL, no E-test® da anfotericina B. É possível perceber que o halo de inibição foi homogêneo para todas as concentrações (Figura 41). Os demais antifúngicos não foram efetivas na inibição do crescimento do *P. periculosum*.

Figura 41 – Amostra MTPI 46 de *P. periculosum* demonstrando halo de inibição homogêneo e completo para todas as concentrações de MIC da anfotericina B.



Fonte: arquivo pessoal.

7. DISCUSSÃO

Fatores como maior conhecimento sobre a ceratite causada por oomicetos, assim como, melhor compreensão da patogênese, da apresentação clínica e das características microbiológicas, são condições primárias que facilitam o diagnóstico rápido, colaborando com o tratamento precoce da ceratite por *Pythium* (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020). Atualmente, não há tratamento padrão-ouro para ceratite causada pelas espécies de *Pythium* e, com a falta de testes padronizados de suscetibilidade antifúngica, a escolha de um tratamento clínico apropriado, também, se torna difícil (GURNANI *et al.*, 2022). Baseado nessa necessidade de definição de um protocolo mais efetivo para a abordagem clínica de casos de ceratite por *Pythium*, o presente estudo avaliou a resposta *in vitro* das drogas antifúngicas AMB, KCZ, ICZ, FCZ e PCZ.

Nosso estudo demonstrou efetividade da AMB *in vitro* indicando que possivelmente este antifúngico seria potencialmente indicado para tratamento de *P. insidiosum* e *P. periculosum* em amostras de ceratites. Em concordância com esse resultado, os autores He e colaboradores (2016) relatam boa resposta em um caso de criança tratada com lavagem intra-cameral com AMB e FCZ, após recorrência de infecção em botão corneano doado (HE *et al.*, 2016). Thanathane e colaboradores (2013) também evidenciam um caso tratado com combinação de AMB intra-cameral e vacina, após TPK, com resolução do quadro infeccioso (THANATHANE *et al.*, 2013). Testes *in vitro* de AMB em amostras de ceratite por *Pythium* são dificilmente encontrados na literatura. Os autores Sekhon e colaboradores (1992) relatam insucesso na inibição do crescimento de *P. insidiosum in vitro* para os políenos AMB e hamicina, utilizando metodologia de diluição das medicações (SEKHON; PADHYE; GARG, 1992), achados esses discordantes dos resultados encontrados no presente estudo. A opção pelo estudo da AMB foi baseada nos relatos de boa resposta *in vivo* postulada por alguns autores (THANATHANE *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2016) e na deficiência de estudos *in vitro* com amostras de *Pythium* obtidas a partir de casos de ceratite. De acordo com Muller e colaboradores (2013) por se tratar de uma droga utilizada de maneira polivalente (tópica, intraestromal e intra-cameral) no tratamento de ceratites (MÜLLER; KARA-JOSÉ; DE

CASTRO, 2013), um estudo mais aprofundado da AMB teria grande contribuição no tratamento das ceratites por *Pythium*, fato que motivou a inclusão desse antifúngico no presente estudo.

A maior parte dos autores postula que a falta de ergosterol na parede celular do *Pythium*, que é o principal local de ação da maioria dos antifúngicos, é a principal razão para sua falta de resposta para os agentes já testados. A parede celular do *Pythium* compreende, principalmente, celulose, pequenas quantidades de β -glucano e quitina (PEREIRA *et al.*, 2007; LORETO *et al.*, 2014; GURNANI *et al.*, 2022).

É ainda importante observar que nesse estudo o padrão de inibição visualizado para a AMB não respeitou o padrão de inibição de MIC esperado, em elipse. Foi encontrado um padrão homogêneo de inibição, o que corrobora a hipótese de que a AMB age sobre o *Pythium* através dos mecanismos de ação secundários, responsáveis por sua efetividade tradicionalmente observada em patógenos não fúngicos, como *Leishmania*. Apesar da maior parte dos autores postularem que a falta de ergosterol na parede celular do *Pythium*, que é o principal local de ação da maioria dos antifúngicos, ser a principal razão para sua falta de resposta para os agentes já testados (PEREIRA *et al.*, 2007; LORETO *et al.*, 2014; GURNANI *et al.*, 2022), incluindo a AMB, não foi esse o resultado obtido nesse estudo. De acordo com Brajtburg e colaboradores, Sokol-Anderson e colaboradores e Marzzullo e colaboradores, a AMB, além de se ligar ao ergosterol e levar à lise celular, é capaz de promover dano oxidativo às células, levando a morte celular (BRAJTBURG *et al.*, 1985; SOKOL-ANDERSON *et al.*, 1988; MARZZULLO; SOUZA; CAMPA, 1997). Ainda como mecanismo de ação adicional, Bernaudini e colaboradores, Boggs e colaboradores, Jullien e colaboradores e Pallister e Warnock ressaltam o efeito imunomodulador da AMB, na produção de anticorpos, na funcionalidade dos PMN e na redução da fagocitose (BERNAUDIN *et al.*, 1987; PALLISTER; WARNOCK, 1989; BOGGS; CHANG; GOUNDALKAR, 1991; JULLIEN *et al.*, 1991). Esses mecanismos de ação evidenciados são os prováveis responsáveis pelo resultado obtido no presente estudo, em que a AMB apresentou efetividade para todos os MIC, apesar de, sabidamente, os Oomicetos não apresentarem ergosterol em sua membrana citoplasmática.

Nossos resultados mostraram, ainda, ausência de resposta na inibição de crescimento das amostras de *Pythium* para as demais medicações testadas, KCZ, ICZ, FCZ e PCZ. Esses achados podem ser corroborados pelos relatos dos autores Thanathane e colaboradores (2013), Loreto e colaboradores (2014), He e colaboradores (2016), Hou e colaboradores (2021), Gurnani e colaboradores (2022), e em suas publicações (THANATHANE *et al.*, 2013; LORETO *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2021; GURNANI *et al.*, 2022). Destes, apenas Loreto e colaboradores realizaram o teste de ICZ, FCZ e PCZ *in vitro*, no entanto, as amostras utilizadas foram *P. insidiosum* extraído de lesões em cavalos. Gurnani e colaboradores (2022) destacam, em revisão bibliográfica, o insucesso do ICZ, natamicina e VCZ (GURNANI *et al.*, 2022). Os demais estudos foram relatos de caso com uso dos antifúngicos fluconazol (THANATHANE *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2021), cetoconazol e itraconazol (THANATHANE *et al.*, 2013) com ou sem associação de demais medicamentos como natamicina e voriconazol, por exemplo (THANATHANE *et al.*, 2013).

Em contrapartida, os resultados encontrados nesse estudo com relação a ineficácia dos azóis testados, são conflitantes com alguns relatos. Todos os trabalhos considerados, foram desenvolvidos com amostras de ceratites por *Pythium* ou em paciente com essa patologia ou, ainda, em modelo animal em que quadros de ceratite por *Pythium* foram intencionalmente induzidos. Argenta e colaboradores (2007) demonstram boa atividade *in vitro* das drogas ICZ e terbinafina associadas; Loreto (2010) relata, em modelo animal, boa resposta para a atividade de FCZ associado a fluvastatina (ambos via tópica) e terbinafina (via oral); Cavalheiro e colaboradores (2009) postulam efetividade na associação de FCZ e terbinafina *in vitro*; Sekhon e colaboradores (1992) evidenciam uma resposta satisfatória, em ordem crescente de eficácia, para as drogas FCZ, KCZ e miconazol; Fonseca e colaboradores (2014) observaram *in vitro* resposta satisfatória pra KCZ e ICZ; Hasika e colaboradores (2019) relatam boa resposta em três de sete pacientes tratados com ICZ em monoterapia tópica e Lerksuthirat e colaboradores (2017) mostram um caso com boa evolução de paciente tratado com combinação de ICS e terbinafina (SEKHON; PADHYE; GARG, 1992; ARGENTA *et al.*, 2007; CAVALHEIRO *et al.*, 2009; LORETO, 2010; FONSECA *et al.*, 2014; LERKSUTHIRAT *et al.*, 2017; HASIKA *et al.*, 2019). De acordo com as citações acima,

cabe salientar que os resultados dos testes realizados *in vitro* nem sempre podem ser extrapolados a um possível sucesso terapêutico.

Lerksuthirat e colaboradores (2017) identificaram enzimas biossintéticas de esteróides alvo de drogas antifúngicas em um oomiceto, *Aphanomyces euteiches*. Baseados nessa descoberta, aventou-se a hipótese de que *Pythium* poderia ser suscetível aos antifúngicos por, possivelmente, apresentarem as mesmas enzimas biossintéticas. Prosseguiram, então, com estudo *in vitro* dos antifúngicos e com estudo do genoma do *P. insidiosum*. A avaliação *in vitro* foi realizada com 30 amostras de ceratites por *P. insidiosum*, em que foram testadas a associação de terbinafina e itraconazol, em diversas concentrações. O resultado foi suscetibilidade apenas em altas dosagens das drogas testadas, havendo inibição completa com 32, 64 e 128mg/L com a terbinafina (1, 8 e 13 amostras, respectivamente) e não ocorrendo inibição completa em nenhuma dosagem de itraconazol, apresentando *in vitro* crescimento decrescente quanto mais alta a dosagem testada, 78% (a 8mg/L de ICZ), 65% (32mg/L), 61% (64mg/L) e 59% (128mg/L) (LERKSUTHIRAT *et al.*, 2017). Fato que vai de encontro com achados encontrados nesse estudo, visto que a dosagem padronizada na fita de E-test® para ICZ é 0,002 - 32µg/mL que é muito inferior àquela dose inibitória encontrada pelos autores. Já a avaliação genômica do *P. insidiosum* demonstrou que o organismo contém um conjunto incompleto de enzimas biossintéticas de esteróis. A análise não detectou nenhum produto final de esteróis em *P. insidiosum*. A resistência clínica de drogas antifúngicas em *P. insidiosum* resulta de modificações ou perdas de alguns dos genes que codificam as enzimas biossintéticas de esteróis alvo da droga (LERKSUTHIRAT *et al.*, 2017).

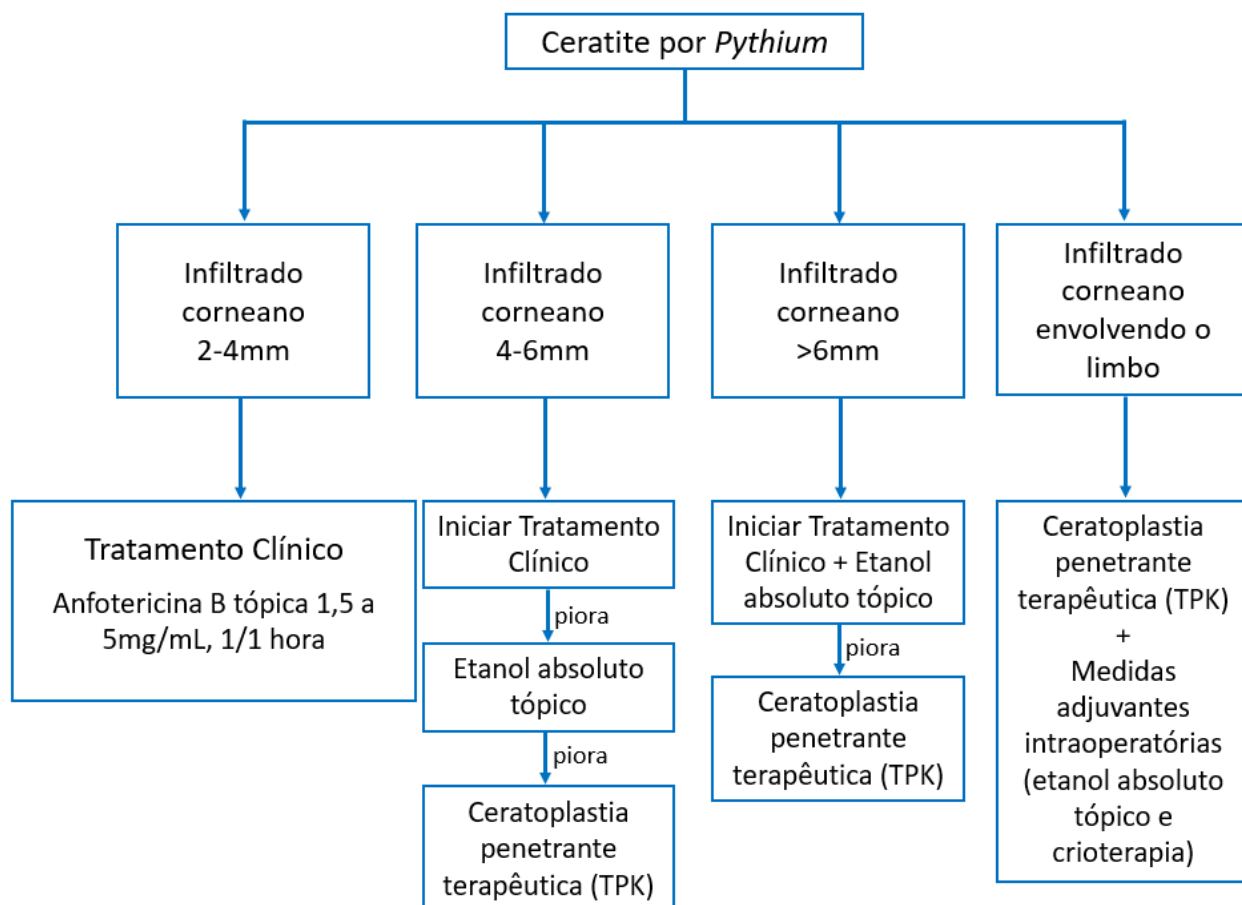
É importante salientar que todos os estudos realizados em testes *in vitro*, *in vivo* e em modelo animal foram realizados considerando se tratarem de casos de ceratite por *P. insidiosum*. No entanto, poderiam se tratar de ceratites por *P. periculosum*, espécie ainda não descrita à época, que se apresenta como infecções mais agressivas e de controle mais difícil (MIRAGLIA *et al.*, 2022). Portanto, esses trabalhos podem apresentar respostas diferentes frente aos testes antifúngicos.

É, também, extremamente relevante ressaltar que os resultados, ora apresentado, de suscetibilidade para AMB (para todas as concentrações, inclusive MIC 0,002, o mais baixo) tem importância significativa. Considerando que os oftalmologistas dominam o manejo da AMB para ceratites fúngicas e que, na maior parte das vezes, o diagnóstico de *Pythium* é tardio, dificultado e/ou impossibilitado pela ausência da tecnologia de alto custo, a possibilidade de utilização da AMB para tratar com efetividade as duas entidades (fungos e *Pythium*) torna essa droga uma opção muito atrativa. Dessa forma, a utilização precoce do tratamento com AMB tópico e intraestromal deve ser considerada, mesmo antes dos resultados laboratoriais (que muitas vezes são falso negativos para fungos e outras espécies, no caso de *Pythium*, não são nem identificados). Sendo o Brasil um país com recursos financeiros limitados, os resultados desse estudo, têm relevância significativa no manejo das ceratites e úlceras graves.

O tratamento com a anfotericina B deve, então, ser considerado como opção de abordagem clínica juntamente as terapias adjuvantes (cola de cianoacrilato, crioterapia e etanol absoluto) para definição de protocolo para o tratamento clínico de úlceras por *Pythium*. Para comprovar a eficácia da AMB *in vivo* é necessária a ampliação desse estudo com análises em modelo animal experimental e/ou *in vivo*.

Baseado em estudo de Gurnani e colaboradores (2022), que considera o tamanho do infiltrado corneano, no momento da apresentação, para definição de conduta em casos de ceratite por *Pythium* (GURNANI *et al.*, 2022), foi proposto, inicialmente, o seguinte protocolo de tratamento (Figura 40). A proposta incorpora os resultados encontrado no presente estudo, mas deve ser, posteriormente, corroborada após maiores estudos da ação da AMB *in vivo*.

Figura 42 – Protocolo de tratamento proposto para manejo e tratamento de ceratites causadas por *Pythium*.



Fonte: adaptado de Gurnani *et al.*, 2022.

8. CONCLUSÃO

As ceratites por *Pythium* spp. são infecções graves, de evolução rápida e que ameaçam a visão, o globo ocular e a órbita. São causadas pelas espécies *P. insidiosum* e *P. periculosum* e simulam as ceratites fúngicas mimetizando suas características clínicas e laboratoriais. Devido às semelhanças, o diagnóstico, muitas vezes, é tardio o que piora ainda mais o prognóstico da doença. O tratamento dessa patologia é desafiador devido a resposta pobre aos antifúngicos usualmente utilizados.

Na tentativa de se determinar a melhor estratégia terapêutica para pitiose ocular, foi testado *in vitro* a ação dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, cetonazol, itraconazol e posaconazol.

O E-test®, método de escolha para o teste, se mostrou um método simples e eficaz na avaliação a susceptibilidade de *P. insidiosum* e *P. periculosum*.

A anfotericina B demonstrou ação inibitória de 100% das amostras testadas de *P. insidiosum* e *P. Periculosum* em, absolutamente, todas as concentrações de MIC, incluindo a mais baixa. Esses oomicetos patogênicos testados não foram suscetíveis a nenhum dos outros antifúngicos testados.

Diante desses resultados promissores, considera-se a anfotericina B opção viável para tratamento de ceratites infecciosas graves, incluindo aquelas por *Pythium* spp. Considerando a dificuldade diagnóstica enfrentada no Brasil, a possibilidade de utilização de uma mesma droga para controle de ceratites por fungos e por *Pythium* apresenta grande potencial para melhorar o prognóstico das infecções causadas por esses agentes. Somado a isso, como é uma droga já manipulada e utilizada pela classe oftalmológica, a inclusão dessa no arsenal terapêutico é, ainda, mais atrativa. Dessa maneira, foi possível postular um protocolo para tratamento da ceratite por *Pythium*.

Entretanto, estudos mais aprofundados, para a determinação da ação da anfotericina B *in vivo*, devem ser realizados a fim de incluir de maneira definitiva essa medicação como protocolo de tratamento das infecções corneanas por *Pythium*.

9. REFERÊNCIAS

- ABAD, J. C.; FOSTER, C. S. Fungal keratitis. **Int Ophthalmol Clin.**, v. 36, n. 3, p. 1-15, 1996.
- ADL, S. M. *et al.* The revised classification of eukaryotes. **J Eukaryot Microbiol.** v. 59, p. 429-514, 2012.
- AGARWAL S. *et al.* Clinical profile of *Pythium* keratitis: perioperative measures to reduce risk of recurrence. **Br J Ophthalmol.**, v. 102, n. 2, p. 153-7, 2018.
- AGARWAL, S. *et al.* Clinical profile, risk factors and outcome of medical, surgical and adjunct interventions in patients with *Pythium insidiosum* keratitis. **Br J Ophthalmol.**, v. 103, p. 296-300, 2019.
- AGARWAL, S. *et al.* Role of Topical Ethanol in the Treatment of *Pythium insidiosum* keratitis- A Proof of Concept. **Cornea**, v. 39, n. 9, p.1102-1107, 2020.
- AHIRWAR, L. K. *et al.* Linezolid shows high safety and efficacy in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis in a rabbit model. **Exp Eye Res.**, v. 202, p. 108345, 2021.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. cap.23: Phylum Oomycota: p. 683-737.
- ALFONSO, E. C.; GALLOR, A. MILLER, D. Fungal keratitis. In: KRACHMER, J. H.; MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. editors. **Cornea: fundamentals, diagnosis and management**. 3 ed. New York: Mosby Elsevier, 2011. cap 82.
- ALVARENGA, L. S.; FREITAS, D.; LIMA, A. L. H. Ceratite por Acanthamoeba. **Arq. Bras. Oftalmol**, v. 63, n. 2, p. 155-9, 2000.
- ANUMOLU, S. S. *et al.* Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogels for sustained pharmacological response. **J Control Release**. V.137, n.2, p.152-159, 2009.
- ANUTARAPONGPAN, O. *et al.* Role of confocal microscopy in the diagnosis of *Pythium insidiosum* keratitis. **Cornea**, v. 37, n. 2, p. 156-161, 2018.
- ARGENTA, J. S. *et al.* *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 2, p. 767-9, 2008.
- AUSTWICK, P.K.C.; COPLAND, J.W. Swamp cancer. **Nature**, v. 250, p. 84, 1974.

AVUNDUK, A. M. *et al.* Comparison of efficacy of topical and oral fluconazole treatment in experimental *Aspergillus* keratitis. **Curr Eye Res.**, v. 26, n. 2, p. 113-7, 2003.

BABALOLA, O. E. Intravitreal linezolid in the management of vancomycin-resistant enterococcal endophthalmitis. **Am J Ophthalmol Case Rep.**, v. 20, p. 100974, 2020.

BACHMANN, S. P. *et al.* *In vitro* activity of caspofungin Against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 11, p. 3591-6, 2002.

BADAWI, A. E.; MOEMEN, D.; EL-TANTAWY, N. L. Epidemiological, clinical and laboratory findings of infectious keratitis at Mansoura Ophthalmic Center Egypt. **Int J Ophthalmol.**, v. 10, n. 1, p. 61-67, 2017.

BAGGA, B. *et al.* Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. **Br J Ophthalmol.**, v. 102, n. 12, p. 1629-1633, 2018.

BAGGA, B. *et al.* Sensitivity and specificity of potassium hydroxide and calcofluor white stain to differentiate between fungal and *Pythium* filaments in corneal scrapings from patients of *Pythium* keratitis. **Indian J Ophthalmol.**, v. 70, n. 2, p. 542-545, 2022.

BAGGA, B. *et al.* Successful strategic management of *Pythium insidiosum* keratitis with antibiotics. **Ophthalmology**, v. 128, n. 1, p. 169-172, 2021.

BALDAUF, S. L. *et al.* A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. **Science**, v. 290, p. 972-977, 2000.

BEGGS, W.H. Physicochemical cell damage in relation to lethal amphotericin B action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 363-364, 1994.

BENNETT, J. Agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L., editor. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. p. 1103-17.

BERNAUDIN, F. *et al.* Effet *in vitro* de l'amphotéricine B sur le chimiotactisme des polynucléaires et des "large granular lymphocytes" à activité "natural killer". **Pathol. Biol.**, v. 35, p. 1403-1407, 1987.

BERRYESSA, N. *et al.* Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **J Vet Internal Med.**, v. 22, p. 1065-1069, 2008.

BOGGILD, K. *et al.* Laboratory Diagnosis of Amoebic Keratitis: Comparison of Four Diagnostic Methods for Different Types of Clinical Specimens. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 1314-1318, 2009.

BOGGS, J. M.; CHANG, N. H.; GOUNDALKAR, A. Liposomal amphotericin B inhibits in vitro T-lymphocyte response to antigen. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 879-885, 1991.

BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 409-427, 1993.

BOSCO, S. M. G. *et al.* Human pythiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, v. 11, n. 5, p. 715-8, 2005.

BRAJTBURG, J. *et al.* Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. *J. Infect. Dis.*, v. 149, p. 986-997, 1984.

BRAJTBURG, J. *et al.* Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 29, p. 172-176, 1985.

BRIDGES, C. H.; EMMONS, C. W. A phycomycosis of horses caused by *Hyphomyces destruens*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 138, p. 579-589, 1961.

BUERGELT, C.; POWE, J.; WHITE, T. Abdominal Pythiosis in a Bengal Tiger (*Panthera tigris tigris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 37, n. 2, p. 186-189, 2006.

BURTON, M. Corneal blindness. *Community Eye Health.*, n. 22, p. 33-35, 2009.

CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. *J Vet Diag Invest.*, v. 16, n. 6, p. 567-571, 2004.

CANTON, E.; ESPINEL-INGROFF, A.; PEMAN, J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 7, n. 1, p. 107-119, 2009.

CAO, B. *et al.* Outcomes of *Pythium* keratitis: a meta-analysis of individual patient data. *Curr Ophthalmol*, v. 10, n. 4, p. 198-208, 2022.

CAVALHEIRO, A. S. *et al.* In Vitro Activity of Terbinafine Combined with Caspofungin and Azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, 2009.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; McMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the horse. *Vet Clin North Am: Equine Pract*, v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

CHANDLER, F. W. W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. A Color Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases. **Chicago: Year Book Medical Publishers, Inc.**, 1980. 333p. p.104-105.

HANG, H. Y.; CHODOSH, J. Diagnostic and therapeutic considerations in fungal keratitis. **Int Ophthalmol Clin.**, v. 51, n. 4, p. 33-42, 2011.

CHITASOMBAT, M. N. *et al.* Recent update in diagnosis and treatment of human pythiosis. **PeerJ**. v. 20, n. 8, p. e8555, 2020.

COSTA, C. C.; GUILHOTO, J. J. M.; BURNQUIST, H. L. Impactos Socioeconômicos de Reduções nas Perdas Pós-colheita de Produtos Agrícolas no Brasil. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, v. 53, n. 3, p. 395-408, 2015.

CUENCA-ESTRELLA, M. *et al.* Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, n. 3, p. 917-21, 2006.

DAHLGREN, M. A.; LINGAPPAN, A.; WILHELMUS, K. R. The clinical diagnosis of microbial keratitis. **Am J Ophthalmol.**, v. 143, n. 6, p. 940-944, 2007.

DART, J. K.; SAW, V. P.; KILVINGTON, S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment. **Am J Ophthalmol.**, v. 148, n. 4, p. 487-499, 2009.

DE COCK, A. W. *et al.* *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **J Clin Microbiol**, v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.

DE HAAN, J.; HOOGKAMER, L. J. Hypho-mycosis destruens. **Veeartsennijkundige Bld. voor Ned. Indië**, v. 13, p. 350-374, 1901.

DESHMUKH, D. *et al.* New insights into culture negative endophthalmitis by unbiased next generation sequencing. **Sci rep**. v. 9, n. 1, p. 844, 2019.

DRUMMOND, D. C. *et al.* The effects of amphotericin B, fluconazole and miconazole on neutrophil and lymphocyte function in a guinea pig model. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 36, p. 375-384, 1995.

DUARTE, M. C. B. **Ceratites infecciosas: fatores associados a positividade das culturas**. 2016, 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

DURSUN, D. *et al.* Advanced fusarium keratitis progressing to endophthalmitis. **Cornea**, v. 22, n. 4, p. 300-3, 2003.

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

ERNST, E. J. Susceptibility Testing Methods of Antifungal Agents. In: ERNST, E. J.; ROGERS, P. D. **Antifungal agents: methods and protocols**. 1 ed. New Jersey: Humana Totowa, 2005. cap. 1, p. 3-12.

ESCARIÃO, A. C. S. L. *et al.* Efeito terapêutico do crosslinking corneal na ceratite infecciosa. **Rev. bras.oftalmol.**, v. 72, n. 6, p. 366-72, 2013.

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.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Rev Bras Ciênc Farm.**, v. 42, n. 2, p. 167-94, 2006.

FISCHER, J. R. *et al.* Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, n. 3, p. 380-2, 1994.

FREITAS, D.; ALVARENGA, L.; LIMA, A. L. H. Ceratite herpética. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 64, n. 1, p. 81-6, 2001.

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

GAASTRA, W. *et al.* *Pythium insidiosum*: An overview. **Vet Microbiol.**, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, 2010.

GARCIA, A.; ADLER-MOORE, J.P.; PROFFITT, R. Single-dose AmBisome (liposomal amphotericin B) as prophylaxis for murine systemic candidiasis and histoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 2327-2332, 2000.

GARCIA-VALENZUELA, E.; SONG, C. D. Intracorneal injection of amphotericin B for recurrent fungal keratitis and endophthalmitis. **Arch Ophthalmol.**, v. 123, n. 12, p.1721-3, 2005.

GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 52, n. 1, p. 37-48, 2001.

GHATE, D.; EDELHAUSER, H. F. Ocular drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv.**, v. 3, n. 2, p. 275- 287, 2006.

GOLDBLUM, D. *et al.* Topical caspofungin for treatment of keratitis caused by *Candida albicans* in a rabbit model. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 4, p.1359-63, 2005.

GOLDBLUM, D. *et al.* Treatment of postkeratitis *Fusarium* endophthalmitis with amphotericin B lipid complex. **Cornea**, v. 19, n. 6, p. 853-6, 2000.

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

GRATIERI, T. **Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo*.** 2010. 190f. Tese

(Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

GRAYBILL, J.R.; BOCANEGRA, R. Liposomal amphotericin B therapy of murine histoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1885-1887, 1995.

GRECCO, F. B. *et al.* Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n.11, p. 938-942, 2009.

GREEN, M.; APEL, A.; STAPLETON, F. Risk Factors and Causative Organisms in Microbial Keratitis. **Cornea**, v. 27, n.1, p. 22-27, 2008.

GREEN, W. R.; BENNETT, J. E; GOOS, R. D. Ocular penetration of amphotericin B: a report of laboratory studies and a case report of postsurgical cephalosporium endophthalmitis. **Arch Ophthalmol.**, v. 73, p. 769-75, 1965.

GURNANI, B. *et al.* Retrospective multifactorial analysis of *Pythium* keratitis and review of literature. **Indian J Ophthalmol.**, v. 69, n. 5, p. 1095-1101, 2021.

GURNANI, B. *et al.* *Pythium insidiosum* Keratitis: Past, Present, and Future. **Ophthalmol Ther.**, v.11, n.5, p. 1629-1653, 2022.

GURNANI B.; KAUR K. Predicting Prognosis Based on Regional Prevalence, Ulcer Morphology and Treatment Strategy in Vision-Threatening *Pythium insidiosum* Keratitis. **Clin Ophthalmol.**, v. 17, p.1307-1314, 2023.

GURNANI B.; KAUR K. *Pythium* Keratitis. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island: StatPearls Publishing**; 2022.

GURNANI B. *et al.* *Pythium insidiosum* keratitis—a review. **Indian J Ophthalmol.**, v.70, n.4, p.1107–1120, 2022.

GURNANI, B. *et al.* Successful management of pediatric *Pythium insidiosum* keratitis with cyanoacrylate glue, linezolid, and azithromycin: rare case report. **Eur J Ophthalmol.**, v. 32, n. 5, p. NP87-NP91, 2021.

HARIPRASAD, S. M. *et al.* Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature. **Br J Ophthalmol.**, v. 92, n. 7, p. 871-8, 2008.

HASIKA, R. *et al.* *Pythium* keratitis in South India: Incidence, clinical profile, management, and treatment recommendation. **Indian J Ophthalmol.**, v. 67, n. 1, p. 42-47, 2019.

HE, H. *et al.* Diagnosis and Treatment of *Pythium insidiosum* Corneal Ulcer in a Chinese Child: A Case Report and Literature Review. **Am J Case Rep.**, v. 17, p. 982-988, 2016.

HEADLEY, S. A.; ARRUDA JR, H. N. Equine cutaneous pythiosis: a report of four

cases. **Cienc. Rural**, v. 34, n. 1, p. 289-292, 2004.

HENRY, C. R. *et al.* Infectious keratitis progressing to endophthalmitis: a 15-year study of microbiology, associated factors, and clinical outcomes. **Ophthalmology**, v. 119, n. 12, p. 2443-9, 2012.

HIROSE, H. *et al.* Treatment of fungal corneal ulcers with amphotericin B ointment. **Am J Ophthalmol.**, v. 124, n. 6, p. 836-8, 1997.

HÖFLING-LIMA, A. L.; NISHIWAKI-DANTAS, M. C.; ALVES, M. R. **Doenças Externas Oculares e Córnea**. 4 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2016. 620 p.

HOLLANDER, D. A.; ALDAVE, A. J. Drug-induced corneal complications. **Curr Opin Ophthalmol.**, v. 15, n. 6, p. 541-548, 2004.

HOU, H. *et al.* *Pythium insidiosum* keratitis reported in China, raising the alertness to this fungus-like infection: a case series. **J Med Case Rep.**, v. 15, n. 1, p. 619, 2021.

HUANG, W. *et al.* Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol- containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. **Biophys. J.**, v. 83, p. 3245-3255, 2002.

HUNG, C; LEDDIN, D. Keratitis caused by *Pythium insidiosum* in an immunosuppressed patient with Crohn's disease. **Clin Gastroenterol Hepatol.**, v. 12, n. 10, p. A21-2, 2014.

IBRAHIM, M. M. *et al.* Epidemiology and medical prediction of microbial keratitis in southeast Brazil. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 74, n. 1, p. 7-12, 2011.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgrad. Med. J.**, v. 70, p. 558-560, 1994.

IMWIDTHAYA, P. Mycotic keratitis in Thailand. **J Med Vet Mycol**, v. 33, p. 81-82, 1995.

INKOMLUE, R. *et al.* Development of an anti-elicitin antibody-based immunohistochemical assay for diagnosis of pythiosis. **J Clin Microbiol.**, v. 54, n.1. p. 43-48, 2016.

ISHIBASHI, Y. Miconazole and ketoconazole as a satisfactory first-line treatment for keratomycosis. **Am J Ophthalmol.**, v. 102, n. 4, p. 547-8, 1986.

ISHIBASHI, Y. Oral ketoconazole therapy for keratomycosis. **Am J Ophthalmol.**, v. 95, n. 3, p. 342-5, 1983.

JONES, D. B.; SEXTON, R.; REBELL, G. Mycotic keratitis in South Florida: a review of thirty-nine cases. **Trans Ophthalmol Soc**, v. 89, p. 781-97, 1970.

JONES, D. Diagnosis and management of fungal keratitis. In: TASMAN, W; JAEGER EA, eds. **Duane's clinical ophthalmology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

JULLIEN, S.; CAPUOZZO, E.; SALERNO, C.; CRIFÒ, C. Effects of polyene antibiotics on the activation of human polymorphonuclear leukocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, p. 2037-2040, 1991.

KALAVATHY, C. M. *et al.* Comparison of topical itraconazole 1% with topical natamycin 5% for the treatment of filamentous fungal keratitis. **Cornea**, v. 24, n. 4, p. 449-52, 2005.

KALRA, P. *et al.* Clinical and Histopathological Evaluation of a Rabbit Model for *Pythium insidiosum* keratitis. **Curr Eye Res.**, v. 45, p. 542-9, 2020.

KAMMARNJESADAKUL, P. *et al.* Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). **Med Mycol.**, v. 49, n. 3, p. 289-295, 2011.

KAMOUN, S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. **Eukaryot Cell.**, v. 2, n. 2, p. 191-9, 2003.

KAUR, I. P.; KANWAR, M. Ocular preparations: the formulation approach. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 28, n. 5, p. 473-493, 2002a.

KAUR, I. P.; RANA, C.; SINGH, H. Development of effective ocular preparations of antifungal agents. **J Ocul Pharmacol Ther.**, v. 24, n. 5, p. 481-93, 2008.

KAUSHIK, S. *et al.* Intracameral amphotericin B: initial experience in severe keratomycosis. **Cornea**, v. 20, n. 7, p. 715-9, 2001.

KEERATIJARUT, A. *et al.* Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1,3- β -glucanase. **J Med Microbiol.**, v. 64, n. 9, p. 971-977, 2015.

KERMANI, N. K.; AGGARWAL, S. P. Isolated post-operative *Aspergillus niger* endophthalmitis. **Eye**, v. 14, n. Pt 1, p. 114-6, 2000.

KHOO, S. H.; BOND, J.; DENNING, D. W. Administering amphotericin B—a practical approach. **J Antimicrob Chemother.**, v. 33, n. 2, p. 203-13, 1994.

KLOTZ, S. A. *et al.* *Candida albicans* keratitis treated successfully with itraconazole. **Cornea**, v. 15, n. 1, p. 102-4, 1996.

KOMADINA, T. G. *et al.* Treatment of *Aspergillus fumigatus* keratitis in rabbits with oral and topical ketoconazole. **Am J Ophthalmol.**, v. 99, n. 4, p. 476-9, 1985.

KOSRRUKVONGS, P. *et al.* Evaluation of nested PCR technique for detection of *Pythium insidiosum* in pathological specimens from patients with suspected fungal keratitis. Southeast Asian. **J Trop Med Public Health**, v. 45, n. 1, p. 167-173, 2014.

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

KURIAKOSE, T. *et al.* Intracameral amphotericin B injection in the management of deep keratomycosis. **Cornea**, v. 21, n. 7, p. 653-6, 2002.

LALITHA, P. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis. **Arch Ophthalmol.**, v. 125, n. 6, p. 789-93, 2007.

LAMOUR, K.; KAMOUN, S. *Pythium insidiosum* and Mammalian Hosts. In: (Ed.). **Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools**. 1 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. cap. 19, p. 387-405.

LASPINA, F. *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.**, v. 242, n. 3, p. 204-209, 2004.

LATIJNHOUWERS, M.; De WIT, P. J.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **Trends Microbiol.**, v. 11, p. 462-469, 2003.

LEAL, A. B. M. *et al.* Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001.

LELIEVRE, L. D. *et al.* Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 92, n. 2, p. 270-273, 2015.

LERKSUTHIRAT, T. *et al.* Evolution of the sterol biosynthetic pathway of *Pythium insidiosum* and related oomycetes contributes to antifungal drug resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, n. 4, p. e02352-16, 2017.

LI, L. *et al.* *In vitro* evaluation of combination antifungal activity against *Fusarium* species isolated from ocular tissues of keratomycosis patients. **Am J Ophthalmol.**, v. 146, n. 5, p. 724-8, 2008.

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

LORETO, E. S. *et al.* New insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 58, n. 12, p. 7534-7537, 2014.

MABON, M. Fungal keratitis. **Int Ophthalmol Clin.**, v.38, n. 4, p.115-23, 1998.

MAENO, S. *et al.* Successful medical management of *Pythium insidiosum* keratitis using a combination of minocycline, linezolid, and chloramphenicol. **Am J Ophthalmol Case Rep.**, v. 18, n. 15, p.100498, 2019.

MAHDY, R. A. *et al.* Assessment safety and efficacy of a combination therapy of topical amphotericin B and subconjunctival fluconazole for the treatment of fungal keratitis. **Cutan Ocul Toxicol.**, v. 29, n. 3, p. 193-7, 2010.

MAHDY, R. A.; NADA, W. M.; WAGEH, M. M. Topical amphotericin B and subconjunctival injection of fluconazole (combination therapy) versus topical amphotericin B (monotherapy) in treatment of keratomycosis. **J Ocul Pharmacol Ther.**, v. 26, n. 3, p. 281-5, 2010.

MANI, R. *et al.* Identification of *Pythium insidiosum* complex by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Med Microbiol.**, v. 68, n. 4, p. 574-584, 2019.

MARANGON *et al.* *In vitro* investigation of voriconazole susceptibility for keratitis and endophthalmitis fungal pathogens. **Am J Ophthalmol.**, v. 137, n. 5, p. 820-5, 2004.

MARANGON, F. B.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. Impact of prior therapy on the recovery and frequency of corneal pathogens. **Cornea.** v. 23, n. 2, p. 58-164. 2004.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. *et al.* Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 3, p. 205-210, 2014.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol.**, v. 32, n. 5, p. 449-60, 2006.

MARUJO, F. I. *et al.* Distribuição das ceratites infecciosas em hospital terciário no Brasil. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 76, n. 6, p. 370-373, 2013.

MARZZULLO, L.; SOUZA, L.C.; CAMPA, A. Effect of amphotericin B associated with a lipid emulsion on the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, p. 203-207, 1997.

MATSUMOTO *et al.* Successful topical application of a new antifungal agent, micafungin, in the treatment of refractory fungal corneal ulcers: report of three cases and literature review. **Cornea**, v. 24, n. 6, p. 748-53, 2005.

MATSUMOTO *et al.* The comparison of solitary topical micafungin or fluconazole application in the treatment of *Candida* fungal keratitis. **Br J Ophthalmol.**, v. 95, n. 10, p. 1406-9, 2011.

MATTIA, A.; CERNIGLIA, C.; BAINES, J. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Natamycin (Pimaricin). **WHO Food Additives**. 2002. Series: 48.7 p.

MENDOZA, L. *et al.* Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médical.**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*. In: MERZ, W. G.; HAY, R. J. (Eds.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, **Medical Mycology**. 10 ed. Londres: Hodder Arnold Ltd., 2005. p. 617– 630.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J Mycol Med.**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **J Clin Microbiol.**, v. 31, n. 11, p. 2967- 2973, 1993.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 477-486, 2005.

MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A. A method to obtain rapid zoosporegenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v. 104, p. 59-62, 1988.

MENDOZA, L.; VILELA, R. The Mammalian Pathogenic Oomycetes. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 7, p.198–208, 2013.

MILLER, R. I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, p. 23-28, 1983.

MIRAGLIA, B. M. *et al.* *Pythium insidiosum* complex hides a cryptic novel species: *Pythium periculosum*. **Fungal Biol.**, v. 126, p. 366-74, 2022.

MITTAL, R. *et al.* *Pythium insidiosum* keratitis: histopathology and rapid novel diagnostic staining technique. **Cornea**, v. 36, n. 9, p. 1124-32, 2017.

MITTAL, R.; AGARWAL, S. Reply. **Cornea**, v. 37, n. 3, p. e14–e15, 2018.

MONTEIRO, A. B. **Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum***. 1999. 52p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

MORAL, M. S. *et al.* Pitiose cutânea em equinos. **Saúde Equina**, I, n. 3, p.14-16, 1997.

MORIBE, K.; MARUYAMA, K.; IWATSURU, M. Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 193, p. 97-106, 1999.

MORRIS, M. I.; VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. **Am J Health Syst Pharm.**, v. 63, n. 18, p. 693-703, 2006a.

MORRIS, M. I.; VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, Part 2. **Am J Health Syst Pharm.**, v. 63, n. 19, p. 1813-20, 2006b.

MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, K.; DE CASTRO, R. S. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. **Rev Bras Oftalmol.**, v. 72, n. 2, p. 132-41, 2013.

MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N.; DE CASTRO, R. S. Perfil epidemiológico das ceratomicoses atendidas no HC-UNICAMP. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 75, n. 4, p. 247-50, 2012.

NEGRI, M. *et al.* Correlation Between Etest (R), Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species From Infection and Colonization. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, n. 5, p. 324-330, 2009.

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. **J Ophthalmol.**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

O'DAY, D. M. *et al.* Corneal penetration of topical amphotericin B and natamycin. **Curr Eye Res.**, v. 5, n. 11, p. 877-82, 1986.

O'Day, D. M. *et al.* Differences in response in vivo to amphotericin B among *Candida albicans* strains. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 32, n. 5, p. 1569-72, 1991.

O'DAY, D. M. *et al.* Influence of the corneal epithelium on the efficacy of topical antifungal agents. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 25, n. 7, p. 855-9, 1984.

O'DAY, D. M. *et al.* Intraocular penetration of systemically administered antifungal agents. **Curr Eye Res.**, v. 4, n. 2, p. 131-4, 1985. Erratum in: **Curr Eye Res**, v. 5, n. 7, p. 547, 1986.

O'DAY, D. M. *et al.* Ocular uptake of fluconazole following oral administration. **Arch Ophthalmol.**, v. 108, n. 7, p. 1006-8, 1990.

O'Day D.M., Head W.S., Robinson R.D., Stern W.H., Freeman J.M. Intraocular penetration of systemically administered antifungal agents. **Curr Eye Res.** 1985;4(2):131-4. Erratum in: **Curr Eye Res** 1986;5(7):547.

O'DAY, D. M. Selection of appropriate antifungal therapy. **Cornea**, v. 6, n. 4, p. 238-45, 1987.

OLIVEIRA, L. A. *et al.* Effect of topical 0.5% povidone-iodine compared to 5% natamycin in fungal keratitis caused by *Fusarium solani* in a rabbit model: a pilot study. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 71, n. 6, p. 860-4, 2008.

OLIVEIRA, P. R. *et al.* Ceratite fúngica. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 64, n. 1, p. 75-9, 2001.

OTRI, A. M. *et al.* Profile of sight-threatening infectious keratitis: a prospective study. **Acta Ophthalmol.**, 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. **Clin Experiment Ophthalmol.**, v. 35, n. 1, p. 44-50, 2007.

PANDA, A. *et al.* Mycotic keratitis in children: epidemiologic and microbiologic evaluation. **Cornea**, v. 16, n. 3, p. 295-9, 1997.

PATEL, J. S. *et al.* Pyraclostrobin sensitivity of baseline and fungicide exposed isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, **Crop Protection**, v. 34, p. 37-41, 2012.

PEREIRA, D. I. *et al.* Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **J Antimicrob Chemother.**, v. 60, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

PEREIRA, D. I. *et al.* Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **J Antimicrob Chemother.**, v. 60, n. 5, p. 1168-1171, 2007.

PLEYER, U. *et al.* Amphotericin B—bioavailability in the cornea. Studies with local administration of liposome incorporated amphotericin B. **Ophthalmologe**, v. 92, n. 4, p. 469-75, 1995.

PONCE, E.; PECHÉRE, J. C. Activity of amphotericin B and itraconazole against intraphagocytic *Candida albicans*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 9, p. 738-744, 1990.

PRAJNA, N. V. *et al.* A randomised clinical trial comparing 2% econazole and 5% natamycin for the treatment of fungal keratitis. **Br J Ophthalmol.**, v. 87, n. 10, p. 1235-7, 2003.

PRAJNA, N. V. *et al.* Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis. **Arch Ophthalmol.**, v. 128, n. 6, p. 672-8, 2010. **Comment in Arch Ophthalmol.**, v. 129, n. 6, p. 814, 2011.

PRESSER, J. W.; GOSS, E. M. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Med. Mycol.**, v. 53, p. 674-683, 2015.

PUANGSRICHAREM, V. *et al.* Clinical characteristics, histopathology, and treatment outcomes of *Pythium* keratitis: A retrospective cohort study. **Clin Ophthalmol.**, v. 15, p. 1691-701, 2021.

PUANGSRICHARERN, V. *et al.* Clinical characteristics, histopathology, and treatment outcomes of *Pythium* keratitis: a retrospective cohort study. **Clin Ophthalmol.**, v. 23, n. 15, p. 1691-701, 2021.

QU, L; LI, L.; XIE, H. Corneal and aqueous humor concentrations of amphotericin B using three different routes of administration in a rabbit model. **Ophthalmic Res.**, v. 43, n. 3, p. 153-8, 2010.

RAMAPPA, M. *et al.* Successful Medical Management of Presumptive *Pythium insidiosum* Keratitis. **Cornea**, v. 36, n. 4, p. 511-514, 2017.

RATHI, A. *et al.* *Pythium* Keratitis Leading to Fatal Cavernous Sinus Thrombophlebitis. **Cornea**, v. 37, n. 4, p. 519-522, 2018.

RATHI, V. M. *et al.* Masked comparison of trypan blue stain and potassium hydroxide with calcofluor white stain in the microscopic examination of corneal scrapings for the diagnosis of microbial keratitis. **Indian J Ophthalmol.**, v. 69, n. 9, p. 2457-2460, 2021.

REDDY, P. R. *et al.* A comparative evaluation of Nystatin, Amphotericin-B and Miconazole in keratomycosis. **Indian J Ophthalmol.**, v. 30, n. 4, p. 249-50, 1982.

REINPRAYOON, U. *et al.* *Lagenidium* sp. Ocular Infection Mimicking Ocular Pythiosis. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 8, p. 2778-80, 2013.

RIBEIRO, T. C. *et al.* Microevolutionary analyses of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on exo-1,3- β -glucanase gene. **Infect Genet Evol.**, v. 48, p. 58-63, 2017.

ROSA, R. H. Jr; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. **Ophthalmology**, v. 101, n. 6, p. 1005-13, 1994.

SALMINEN, L. Systemic Absorption of Topically Applied Ocular Drugs in Humans. **J Ocul Pharmacol.**, v. 6, n. 3, p. 243-249, 1990.

SANE, S. *et al.* Improved Outcome of *Pythium* Keratitis With a Combined Triple Drug Regimen of Linezolid and Azithromycin. **Cornea**, v. 40, n. 7, p. 888-893, 2021.

SANTOS, C. O. *et al.* *In vitro* activity of chlorhexidine compared with seven antifungal agents against 98 *Fusarium* isolates recovered from fungal keratitis patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 63, p. e02669-18, 2019.

SANTOS, M. N. *et al.* Pitiose cutânea em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesq Vet Bras**, v. 7, n. 3, p. 57-61, 1987.

SANTOS, M. N.; LONDERO, A. T. Zigomicose subcutânea em cavalos. **Pesq Agropec Bras-Sér Vet**, v. 9, p. 7-8, 1974.

SANTURIO, J. M. *et al.* Cutaneous *Pythiosis insidiosum* in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, p. 123-125, 1998.

SATHAPATAYAVONGS, B. *et al.* Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **J Infect Dis**, v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.

SCHURKO, A. M.; MENDOZA, L.; LÉVESQUE, C. A. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycol Res**, v. 107, p. 537-44, 2003.

SEKHON, A. S.; PADHYE, A. A.; GARG, A. K. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffe* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. **Eur J Epidemiol**, v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.

SHARMA S. *et al.* Application of trypan blue stain in the microbiological diagnosis of infectious keratitis—a case series. **Cornea**, v. 40, n. 12, p. 1624-1628, 2021.

SHARMA, S. *et al.* *Pythium insidiosum* keratitis: clinical profile and role of DNA sequencing and zoospore formation in diagnosis. **Cornea**, v. 34, n. 4, p. 438-442, 2015.

SHENEP, J. L. *et al.* Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clin Infect Dis**, v. 27, n. 6, p.1388-1393, 1998.

SINGH, S. M. *et al.* Clinical and experimental mycotic corneal ulcer caused by *Aspergillus fumigatus* and the effect of oral ketoconazole in the treatment. **Mycopathologia**, v. 106, n. 3, p. 133-41, 1989.

SOKOL-ANDERSON, M. L. *et al.* Role of cell defence against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, p. 702-705, 1988.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 76-83, 1986.

SPONSEL, W. E. *et al.* Ocular and systemic posaconazole(SCH-56592) treatment of invasive *Fusarium solani* keratitis and endophthalmitis. **Br J Ophthalmol.**, v. 86, n. 7, p. 829-30, 2002.

TABOSA, I. M. *et al.* Outbreaks of Pythiosis in Two Flocks of Sheep in Northeastern Brazil. **Veterinary Pathology.**, v. 41, n. 4, p. 412-415, 2004.

TABOSA, I. M. *et al.* Pitiose cutânea em equídeos no semi-árido da Paraíba. **Arq Bras Med Vet Zoot**, v. 51, p. 27-30, 1999.

TANHEHCO, T. Y. *et al.* *Pythium insidiosum* keratitis in Israel. **Eye Contact Lens**, v. 37, n. 2, p. 96-8, 2011.

TANNA V., BAGGA B., SHARMA S., AHIRWAR L.K., KATE A., MOHAMED A., JOSEPH J. *et al.* Randomized Double-Masked Placebo-Controlled Trial for the Management of *Pythium* Keratitis: Combination of Antibiotics Versus Monotherapy. **Cornea**. 2023 Feb 14.

TEERLINK, T.; DE KRUIJFF, B.; DEMEL, R. A. The action of pimaricin, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 599, p. 484-492, 1980.

THAKAR, M. Oral fluconazole therapy for keratomycosis. **Acta Ophthalmol**, v. 72, n. 6, p. 765-7, 1994.

THANATHANE, O. M. D. *et al.* Outbreak of *Pythium* Keratitis During Rainy Season. **Cornea**, v. 32, n. 2, p. 199-204, 2013.

THOMAS, P. A., KALAVATHY C.M., ABRAHAM D.J., RAJASEKARAN J. Oral ketoconazole in Keratomycosis. **Indian J Ophthalmol.**, v. 35, n. 4, p. 197-203, 1987.

TORRES, H. A. *et al.* Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. **Lancet Infect Dis.**, v. 5, n. 12, p. 775-85, 2005.

TU, E. Y. *et al.* Successful treatment of resistant ocular fusariosis with posaconazole (SCH-56592). **Am J Ophthalmol.**, v. 143, n. 2, p. 222-7, 2007.

ULLMANN, A. J. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, n. 2, p. 658-66, 2006.

URBAK, S. F.; DEGN, T. Fluconazole in the management of fungal ocular infections. **Ophthalmologica**, v. 208, n. 3, p. 147-56, 1994.

URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. **Surv Ophthalmol.**, v. 37, n. 6, p. 435-456, 1993.

VALENTE, J. S. S. *et al.* *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v. 57, n. 7, p. 858–863, 2019.

VANITTANAKOM, N. *et al.* Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas, **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 3-4, 2014.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and druginteractions. **J Antimicrob Chemother.**, v. 46, n. 2, p. 171-9, 2000.

VILELA, R. *et al.* *Pythium insidiosum* isolated from infected mosquito larvae in central Brazil. **Acta Tropica**, v. 185, p. 344-348, 2018.

VISHWAKARMA, P. *et al.* *Pythium* keratitis: clinical profile, laboratory diagnosis, treatment, and histopathology features post-treatment at a tertiary eye care center in Eastern India. **Indian J Ophthalmol.**, v. 69, n. 6, p. 1544-1552, 2021.

WAGNER, C. *et al.* The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. **Pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 161-77, 2006.

WANACHIWANAWIN, W. *et al.* Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**, v. 22, p. 3613-3621, 2004.

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

WHITE, S. D. *et al.* Cutaneous pythiosis in a nontravelled California horse. **Vet Dermatol.**, v. 19, n. 6, p. 391-4, 2008.

WHYTE, B. S.; PETERSON, R. P.; HARTSEL, S. C. Amphotericin B and nystatin show different activities on sterol free vesicles. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 164, p. 609-614, 1989.

WILSON, E.; THORSON, L.; SPEERT, D. P. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 796-800, 1991.

WOOD, T. O.; WILLIFORD, W. Treatment of keratomycosis with amphotericin B 0.15%. **Am J Ophthalmol.**, v. 81, n. 6, p. 847-9, 1976.

WORASILCHAI, N. et al. In Vitro Susceptibility of Thai *Pythium insidiosum* Isolates to Antibacterial Agents. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 64, n. 4, p. e02099-19, 2020.

YEE, R. W. et al. Ocular penetration and pharmacokinetics of topical fluconazole. **Cornea**, v. 16, n. 1, p. 64-71, 1997. Comment in **Cornea**, v. 16, n. 6, p. 700, 1997.

YILMAZ S.; MADEN, A. Severe fungal keratitis treated with subconjunctival fluconazole. **Am J Ophthalmol.**, v. 140, n. 3, p. 454-8. 2005. Comment in **Am J Ophthalmol.**, v. 141, n. 4, p. 783, 2006.

YILMAZ, S.; TURE, M.; MADEN, A. Efficacy of intracameral amphotericin B injection in the management of refractory keratomycosis and endophthalmitis. **Cornea**, v. 26, n. 4, p. 398-402, 2007.

YOLANDA H.; KRAJAEJUN, T. Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against *Pythium insidiosum*. **Heliyon.**, v. 6, n. 4, p.e03737, 2020.

YOON, K. C. et al. Therapeutic effect of intracameral amphotericin B injection in the treatment of fungal keratitis. **Cornea**, v. 26, n. 7, p. 814-8, 2007.

ZYGMUNT, W. A. Intracellular loss of potassium in *Candida albicans* after exposure of polyene antifungal antibiotics. **Appl. Microbiol.**, v. 14, p. 953-956, 1966.