

Eficácia do fluconazol subconjuntival na ceratite experimental por *Fusarium solani* em modelo animal

Efficacy of subconjunctivally injected fluconazole in experimental Fusarium solani keratitis in animal model

Roberto Freda ⁽¹⁾
Arnaldo Colombo ⁽²⁾
Paulo Sérgio Barros ⁽³⁾
Denise de Freitas ⁽⁴⁾

RESUMO

Objetivo: Avaliar a eficácia do uso do fluconazol subconjuntival em ceratite fúngica por *Fusarium solani* experimentalmente induzida em modelo animal.

Métodos: Após imunossupressão prévia com corticosteróide subconjuntival, o inóculo padrão, preparado com o auxílio do método de espectrofotometria, foi injetado no estroma corneano. Depois de três dias, iniciou-se a aplicação de 300 µl de fluconazol subconjuntival (grupo 1) ou placebo (grupo 2), por quatro dias consecutivos. Cinco dias após a primeira dose subconjuntival de fluconazol ou placebo, procedeu-se ao sacrifício dos animais e à trepanação das córneas e imersão destas em meio de enriquecimento líquido. Aliquotas de 100, 10 e 1 µl deste meio foram semeadas, após 3 dias, em placas com Sabouraud-dextrose e as colônias crescidas, contadas em 5 dias.

Resultados: A análise estatística considerou o número de colônias crescidas nas diferentes diluições, para cada grupo. Não houve diferença estatisticamente significante entre o grupo tratado com fluconazol subconjuntival e o grupo controle.

Conclusão: A utilização de fluconazol subconjuntival, durante 4 dias, não foi eficaz na redução do número de colônias crescidas em placas, quando comparado com o grupo tratado apenas com placebo, em ceratite fúngica por *Fusarium solani* experimentalmente induzida em coelhos.

Palavras-chave: Fluconazol; Micose; Ceratite; Fungo; *Fusarium*.

INTRODUÇÃO

Os fungos são agentes oportunistas de infecção, raramente afetando córneas saudáveis de indivíduos imunocompetentes sem alteração epitelial. Trauma, sobretudo com material orgânico vegetal, uso tópico de corticosteróides e antibióticos, lentes de contato, procedimentos cirúrgicos, contaminação de soluções de irrigação ou de manutenção de lentes de contato, infecção sistêmica e imunodepressão, sobretudo associada à neutropenia, são fatores de risco e potenciais adjuvantes da infecção fúngica ¹.

O número de casos ceratite micótica têm aumentado nas últimas décadas, sobretudo a partir da introdução dos corticosteróides na prática clínica e do uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro ^{1,2}. No Brasil, estudos indicam que cerca de 10% dos casos de úlcera de córnea são de etiologia micótica ³.

Os gêneros mais importantes, do ponto de vista de incidência, são *Fusarium* spp e *Aspergillus* spp, dependendo da região e do clima ^{1,3,4}.

⁽¹⁾ Médico Pós-Graduando (Nível Mestrado) do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP-EPM.

⁽²⁾ Prof. da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Coordenador do Laboratório Especial de Micologia (UNIFESP-EPM).

⁽³⁾ Prof. Livre-Docente de Medicina Veterinária da USP. Doutora em Oftalmologia e Chefe do Setor de Doenças Externas Oculares e Córnea do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP-EPM.

⁽⁴⁾ Apresentado como tema-livre durante o XXIX Congresso Brasileiro de Oftalmologia.

Trabalho realizado com apoio financeiro do CAPES.

Endereço para correspondência: Av. Dr. João Simplicio Alves de Carvalho, 164. Porto Alegre (RS). CEP 91360-260

As úlceras corneanas fúngicas, particularmente aquelas causadas por fungos filamentosos, são mais frequentes em clima quente, sobretudo em regiões tropicais. Em climas mais frios, predominam os fungos leveduriformes¹.

O tratamento das infecções fúngicas na córnea é difícil, prolongado e de custo elevado. Isto se deve tanto às características biológicas dos fungos, quanto à limitação frente à eficácia e resposta terapêutica dos antifúngicos disponíveis^{5,6}. Até o presente momento, não se conhece uma droga ideal para o tratamento da ceratite micótica¹.

Além disto, a dificuldade diagnóstica dessa condição faz com que muitas vezes nem ao menos a suspeita de ceratite micótica seja considerada no diagnóstico diferencial das ceratites¹.

Classicamente, as ceratites causadas por fungos filamentosos têm sido tratadas com administração tópica de natamicina a 5% associada ao cetoconazol por via oral (400 mg/dia). Já as ceratites leveduriformes são tratadas com anfotericina B 0,15% tópica e cetoconazol (400 mg/dia) ou fluconazol (200 mg/dia), por via oral¹.

A natamicina é pobremente absorvida pela córnea, penetrando em pequena quantidade no humor aquoso. Assim, as infecções profundas causadas por fungos filamentosos não podem ser efetivamente tratadas com esta droga^{1,5}. A natamicina é pouco absorvida quando ingerida oralmente e a via subconjuntival é ineficaz. Além disto, algumas espécies fúngicas podem apresentar resistência à natamicina¹.

Não existe, na literatura, um estudo avaliando a eficácia “*in vivo*” do fluconazol subconjuntival em relação à infecção fúngica por *Fusarium solani* na ceratite experimental induzida em modelo animal.

OBJETIVOS

1 - Avaliar a eficácia do uso de fluconazol subconjuntival em ceratite fúngica experimental por *Fusarium solani* induzida em modelo animal, em coelho.

2 - Avaliar a resposta *in vitro*, através de teste de sensibilidade, da cepa de *Fusarium solani* utilizada no modelo animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 coelhos da raça Nova Zelândia, previamente selecionados e examinados por profissionais habilitados.

Os animais permaneceram no laboratório MEDLAB, em gaiolas separadas com 0,65 m² de área, mantidos em condições apropriadas e conforme orientação da ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*). O experimento foi submetido à análise e aprovação pela Comissão de Ética da UNIFESP-EPM.

Ao início do estudo, o peso dos animais variou de 2350g a 3230g. Todos os coelhos foram examinados imediatamente e cuida-

dosamente antes do início da pesquisa, clínica e biomicroscopicamente, a fim de se descartar a presença de doença sistêmica ou ocular concomitante. Os animais eram assistidos diariamente por profissionais qualificados e treinados, supervisionados por biólogos e veterinários.

A indução da ceratite foi realizada no olho direito dos animais, segundo Ishibashi⁷, com imunossupressão prévia com dexametasona.

A cepa de *Fusarium solani* empregada no experimento foi isolada a partir de um paciente portador de ceratite fúngica do Setor de Doenças Externas Oculares e Córnea (Departamento de Oftalmologia da UNIFESP-EPM), cedida pelo laboratório deste Setor.

Após três dias da injeção do inóculo, foram aplicados, por sorteio, 300 µl de fluconazol subconjuntival na concentração de 2 mg/ml (Zoltec® frasco com 100 ml de 2 mg por ml - Laboratório Pfizer) em 19 coelhos e 300 µl de soro fisiológico, em 21 coelhos (placebo), de acordo com sorteio. A técnica de aplicação utilizada para o fluconazol subconjuntival foi a mesma que se empregou para a injeção de dexametasona. Os coelhos foram submetidos a um total de quatro aplicações. A droga era aplicada uma vez ao dia, no mesmo período do dia e nas mesmas condições, tanto para os coelhos do grupo tratado com fluconazol, quanto para os coelhos do grupo controle.

Após cinco dias da primeira aplicação de fluconazol ou placebo, os coelhos foram sacrificados e realizou-se, então, a trepanação e retirada das córneas, seguida de lavagem das mesmas em soro fisiológico esterilizado e imersão em meio de cultura líquido para fungo (1 ml de “Brain-Heart-Infusion” - BHI- Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), com antibiótico (gentamicina e cloranfenicol nas concentrações, respectivamente, de 50 mg e 40 mg por litro). Imediatamente após a colocação das córneas no meio líquido, o tubo era fechado e enviado para a estufa.

Todo o procedimento que envolveu a retirada das córneas foi realizado sob rigorosa técnica de desinfecção e antissepsia, com materiais e campos operatórios esterilizados, manuseio sempre próximo ao fogo, na tentativa de minimizar a possibilidade de contaminação.

Após 3 dias em cultura à temperatura de 25°, procedeu-se à diluição seriada e semeadura em meio sólido (Sabouraud-dextrose - Diagonlab, Barcelona). As colônias foram contadas após 5 dias da semeadura. Considerou-se como “incontáveis” as placas que apresentavam mais de 50 colônias, dada a dificuldade em se individualizar as mesmas e conseqüente possibilidade de erro na sua contagem.

SENSIBILIDADE “*IN VITRO*”

Adicionalmente, foi avaliada a resposta “*in vitro*” da cepa de *Fusarium solani* utilizada no experimento “*in vivo*”, realizando teste de sensibilidade antifúngica com fluconazol, anfotericina B, itraconazol e cetoconazol, através do método de macro-diluição em caldo, adaptado de parâme-

tros estabelecidos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*⁸ e estudos de padronização para fungos filamentosos^{9, 10}.

Método Estatístico

Para a análise dos resultados foram empregados os seguintes testes:

1) Análise de variância por postos de Friedman, com a finalidade de estudar o comportamento das diferentes alíquotas (100 µl, 10 µl e 1 µl) utilizadas do meio de enriquecimento líquido (BHI) e semeadas em placas de Sabouraud-dextrose, tanto para o grupo controle como para o grupo tratado. Esta análise foi complementada pelo teste de comparações múltiplas.

2) Teste de Mann-Whitney para confrontar cada uma das diferentes alíquotas do meio de enriquecimento líquido (100 µl, 10 µl e 1 µl), entre o grupo controle e o grupo tratado.

3) Teste do qui-quadrado, a fim de avaliar possíveis associações de colônias contáveis e incontáveis entre os grupos controle e tratado, da alíquota de 100 µl do meio de enriquecimento líquido. Para a alíquota de 10 µl, foi aplicado o teste exato de Fisher, após observadas as restrições de Cochran.

Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade (H0).

RESULTADOS

No grupo 1 (tratado com fluconazol) foram excluídos da análise estatística 3 coelhos (nº 6, 14 e 33). No grupo 2 (tratados com soro fisiológico), também foram excluídos 3 coelhos (nº 11, 22 e 35). Os coelhos nº 6 e 22 foram eliminados pela dúvida em relação à adequada administração do inóculo. Os coelhos de nº 11 e 33 apresentaram contaminação fúngica (*Aspergillus* sp e *Penicillium* sp)

associada ao crescimento do *Fusarium solani*, na placa de ágar Sabouraud-dextrose. Os coelhos nº 14 e 35 morreram durante o experimento, de causa desconhecida. A análise estatística foi, portanto, realizada com 18 coelhos tratados com fluconazol (grupo 1) e 16 coelhos tratados com placebo (grupo 2).

A seguir, apresentamos o resultado da contagem de colônias obtidas a partir da cultura de diferentes alíquotas (100, 10 e 1 µl) do meio de enriquecimento líquido, semeadas em placas de ágar Sabouraud-dextrose, das córneas dos coelhos tratados com fluconazol subconjuntival (grupo 1) ou placebo (grupo 2).

A Tabela 1 apresenta apenas os coelhos que foram efetivamente incluídos na análise estatística, desconsiderando, portanto, os animais que morreram, tiveram contaminação ou foram excluídos do estudo.

Não houve diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle, nas diferentes diluições, tanto em relação ao número de colônias contáveis (teste de Mann-Whitney), quanto incontáveis (teste do Qui-quadrado e teste exato de Fisher).

O resultado dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) na macro-diluição em caldo para os quatro antifúngicos, no teste de sensibilidade "in vitro", foram os seguintes:

Agente	CIM
Fluconazol	> 64 µg/ml (Resistente)
Anfotericina B	0,5 µg/ml (Sensível)
Itraconazol	> 4 µg/ml (Resistente)
Cetoconazol	2 µg/ml (Resistente)

Observa-se, portanto, que no estudo "in vitro", também foi evidenciada a inefetividade do fluconazol em relação ao *Fusarium solani*, demonstrada através da resistência apresentada por este microrganismo.

Tabela 1

Diluição	Controle 100 µl	Controle 10 µl	Controle 1 µl	Tratado 100 µl	Tratado 10 µl	Tratado 1 µl
nº colônias	> 50	> 50	2	> 50	7	1
nº colônias	> 50	7	1	> 50	13	1
nº colônias	> 50	12	3	> 50	> 50	1
nº colônias	> 50	> 50	17	> 50	35	8
nº colônias	7	0	0	> 50	13	5
nº colônias	> 50	11	2	50	5	0
nº colônias	> 50	30	4	33	3	0
nº colônias	> 50	21	3	21	7	3
nº colônias	20	0	0	> 50	16	1
nº colônias	35	4	1	37	8	0
nº colônias	21	0	0	> 50	22	1
nº colônias	12	4	0	> 50	15	2
nº colônias	12	4	1	13	0	0
nº colônias	> 50	12	1	> 50	8	3
nº colônias	10	0	0	> 50	> 50	12
nº colônias	32	3	2	23	0	0
nº colônias				12	1	0
nº colônias				30	0	0

DISCUSSÃO

Considerando que o acometimento da córnea por fungos é uma condição grave, potencialmente deletéria à preservação da anatomia e da função visual, cabe ao médico oftalmologista conhecer e saber conduzir da melhor forma possível os casos de infecção corneana por estes agentes¹.

O fato de a maioria dos indivíduos afetados por ceratomico-se ser composta por adultos em fase de plena atividade em seus respectivos postos de trabalho, torna esta condição, além de um problema de ordem médica e individual, um significativo fardo social, uma vez que o seu tratamento pode ser prolongado e as suas conseqüências ópticas e visuais, bastante sérias¹.

Tendo em vista a subjetividade do exame clínico e sua considerável dependência em função do observador em questão, optamos por avaliar somente o aspecto quantitativo laboratorial das córneas infectadas, através de contagem de colônias em placas, e não o aspecto clínico das córneas.

A avaliação do fluconazol na forma de injeção subconjuntival não é significativa na literatura¹¹. Não foi encontrada nenhuma descrição sobre a avaliação da eficácia do fluconazol subconjuntival para o tratamento de ceratite por fungo filamentosos.

Optou-se por realizar uma dose diária da droga por quatro dias subseqüentes, uma vez que este é o regime terapêutico empregado na prática clínica, nos casos de ceratite fúngica, tratados com injeção subconjuntival de fluconazol. É possível que a administração mais freqüente de droga tenha um melhor efeito e este fato merece estudos futuros.

O uso tópico de derivados imidazólicos para o tratamento de ceratite fúngica por *Fusarium solani* já foi relatado^{12,13}. Não há na literatura, entretanto, referência sobre a efetividade do fluconazol tópico em ceratite por fungos filamentosos, sendo esta, também, uma área aberta a investigações.

O espectro de ação do fluconazol tem sido estudado em uma grande variedade de modelos, animais e laboratoriais, sendo efetivo para *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* e outras espécies do gênero *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma*^{14,15,16}.

O fluconazol tem sido bastante utilizado "in vivo" em infecções muco-cutâneas ou sistêmicas por *Candida spp*, em pacientes imunocompetentes ou imunodeprimidos, bem como nos casos de meningite criptocócica, sobretudo em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida¹⁷.

Os testes de sensibilidade para antifúngicos atualmente mais empregados compreendem diluição em caldo, tanto micro quanto macro-diluição, diluição em ágar e difusão de disco. Outras técnicas também têm sido descritas e incluem espectrofotometria de massa, citometria de fluxo e captação de metabólicos marcados e o "E"-teste^{17,18}. Recentemente, o NCCLS relatou normas de padronização para testes de sensibilidade a antifúngicos, cujos resultados são excelentes para leveduras, tanto em relação à reprodutibilidade como sua correlação clínico-laboratorial. Utiliza-

mos em nosso estudo uma adaptação da macro-diluição em caldo, segundo parâmetros do NCCLS. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles relatados na literatura, sobretudo em relação à resistência do *Fusarium solani* frente ao fluconazol^{14,15}.

Embora o fluconazol não tenha um bom espectro de ação "in vitro" para fungos filamentosos^{13,14,15}, com resultados "in vitro" por vezes bastante insatisfatórios, alguns não apresentando qualquer atividade contra *Fusarium spp*, existem alguns Serviços de Oftalmologia que empregam o fluconazol em casos recalcitrantes de ceratite por *Fusarium solani*. Além disto, a possibilidade de empregar um antifúngico subconjuntival, sem efeitos adversos, tem levado a uma maior utilização do fluconazol por esta via de administração. Em nosso estudo, não observamos reações adversas nos animais que receberam fluconazol subconjuntival.

Devido a problemas na padronização dos testes de sensibilidade a antifúngicos, os resultados "in vitro" podem não representar exatamente o comportamento de uma determinada droga frente a um microrganismo quando esta for utilizada "in vivo"^{1,14}. Sendo assim, e particularmente em relação a fungos filamentosos, há necessidade de confirmação dos dados referentes ao teste "in vitro", através de estudos com modelos animais.

Nossos resultados "in vitro" de sensibilidade foram compatíveis com aqueles encontrados na literatura^{14,15,16}. A relativa sensibilidade do *Fusarium solani* à anfotericina B encontrada neste estudo, demonstra que esta droga pode ser considerada como adjunta ao tratamento com a pimaricina.

Em nosso trabalho, a amostra de *Fusarium solani* também demonstrou resistência "in vitro" ao cetoconazol (CIM de 2,0 µg/ml). Sekhon et al.¹⁴ salientam que a CIM do cetoconazol para quatro isolados de *F. solani* foi de 50 µg/ml. Reuben et al.²⁰ não lograram boa resposta ao cetoconazol em uma série com 16 isolados de *Fusarium solani*. A resistência em relação ao itraconazol e ao fluconazol, presente em nosso trabalho, também já foi demonstrada anteriormente^{14,15,16,19}.

Não foi objetivo desta investigação a pesquisa em relação a eventual toxicidade do fluconazol sob a forma de administração subconjuntival, considerando sobretudo sua extensa utilização clínica prévia por esta via e a ausência de qualquer tipo de reação adversa séria relatada.

Trabalhos têm demonstrado que a infecção fúngica corneana é exacerbada com a administração concomitante de corticosteróides^{2,21}. Além disto, a utilização prévia de corticosteróide é essencial para a indução da ceratite por *Fusarium* no modelo animal⁷. Por isto, utilizamos a dexametasona nos cinco dias que antecederam a injeção do inóculo e durante os dois dias seguintes. Desta forma, não administrou-se o fluconazol concomitantemente ao corticosteróide, a fim de evitar-se qualquer tipo de interação entre estas drogas.

Kirku et al.²¹ observaram que córneas de coelhos não tratados com dexametasona apresentavam sinais iniciais de resolução da ceratite fúngica já no 7º dia pós-inoculação e, no

14º dia, exibiam completa resolução da infecção. O estudo histopatológico evidenciou apenas um intenso infiltrado inflamatório celular. Por outro lado, os coelhos tratados previamente com dexametasona apresentavam crescimento vigoroso das hifas de *Fusarium solani*, com cultura positiva em Sabouraud-dextrose no 3º, 7º e, inclusive, 14º dia após a inoculação. No estudo histopatológico das córneas do grupo tratado com corticosteróide, a infiltração celular inflamatória era escassa, ao contrário do grupo não tratado com dexametasona, evidenciando a importância e a magnitude do efeito da utilização prévia de corticosteróide. Ishibashi ⁷ evidenciou numerosas células inflamatórias na córnea de coelhos infectados por *F. solani*, que previamente receberam corticosteróide subconjuntival, tanto no 10º quanto no 15º dia. Estes achados mostram a importância do papel dos corticosteróides nos casos de infecção fúngica.

É desconhecida a relação da associação entre o uso de corticosteróide e de fluconazol. Um estudo ²² demonstrou a importância dos polimorfonucleares e monócitos como sinérgicos na ação do fluconazol em relação a *Candida albicans*. Não há, contudo, relatos em relação aos fungos filamentosos.

Em ceratite por fungos leveduriformes, experimentalmente induzida em coelhos tratados previamente com antibacteriano tópico, observou-se correlação com uma pior evolução clínica, provavelmente devido à superposição de infecção fúngica, conseqüente à alteração da flora ocular²³. Entretanto, o papel dos antibióticos na potencialização, ou inibição, de infecção micótica corneana é controverso ¹.

Procedemos à contagem das colônias no 3º dia após a semeadura no Sabouraud-dextrose uma vez que neste momento já se observava crescimento na placa passível de quantificação e sem sobreposição das colônias. Nos estudos-piloto constatou-se que após este período havia acentuada sobreposição do crescimento das colônias e, por esta razão, fixou-se em três dias o tempo de leitura das colônias. Consideramos como "incontáveis" as placas com mais de 50 colônias e esta definição foi estabelecida a partir dos resultados dos estudos-piloto.

A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre o grupo tratado com fluconazol e o grupo controle, nas três diluições estudadas. Isto foi verdadeiro tanto para as colônias contáveis quanto incontáveis. Também não houve efetividade da droga na inibição das colônias fúngicas "in vitro".

O presente trabalho demonstrou que a utilização de fluconazol subconjuntival, na freqüência de uma vez ao dia por quatro dias subseqüentes, em ceratite fúngica por *Fusarium solani* experimentalmente induzida em coelhos, não apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparado com grupo controle tratado apenas com placebo.

Novos estudos controlados, alterando-se a freqüência e a concentração da droga, poderão corroborar estes achados. Neste ínterim, as pesquisas na busca de uma droga mais efetiva para os casos de ceratite por fungos filamentosos, sobretudo *Fusarium solani*, devem ser amplamente estimuladas.

SUMMARY

Purpose: *To assess whether subconjunctivally injected fluconazole was effective in experimental Fusarium solani keratomycosis in rabbits.*

Methods: *After corticosteroid immunosuppression of the rabbit eyes, 20 µl of the inoculum, prepared by the spectrophotometric method, were injected into the midcorneal stroma. Three days later, either 300 µl subconjunctival fluconazole or placebo injections were initiated and given during four consecutive days. After five days of the first dose, the animals were sacrificed and the corneas trephined and immersed in appropriate liquid growth media. Aliquots of 100, 10 and 1 µl were placed in agar-Sabouraud-dextrose medium plates and the growth of F. solani determined by counting the number of colonies grown in the plates after 5 days.*

Results: *Statistical analysis considered the number of colonies in the different dilutions, for each group. There was no statistical significant difference between the fluconazole-treated group and the placebo group.*

Conclusion: *The present investigation did not find any significant reduction in the number of fungal colonies grown in plates, after administration of subconjunctival fluconazole during 4 consecutive days, when compared to the placebo-treated group, in cases of experimentally induced F. solani keratitis in rabbits.*

Keywords: *Fluconazole; Mycosis; Keratitis; Fungus; Fusarium*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thomas PA. Mycotic keratitis: an underestimated mycosis. *J Med Vet Mycol* 1994;32:235-56.
2. Abad JC, Foster CS. Fungal keratitis. *Intern Ophthalmol Clin* 1996;36(3):1-15.
3. Lima ALH, Nishi M, Lottenberg CL, Guidugli T. Úlceras de córnea em serviço de referência. *Arq Bras Oftalmol* 1988;51:118-20.
4. Vieira LA, Carneiro MDF, Guidugli T, Scarpi M. Incidência de úlceras corneanas fúngicas no laboratório de doenças externas oculares da Escola Paulista de Medicina. *Arq Bras Oftalmol* 1992;55(4):180.
5. Lima ALH, Belfort Jr R, Parel JM, Rebell G. Peneiração de diferentes antimicóticos na córnea humana: estudo "in vitro". *Arq Bras Oftalmol* 1987;50(2):80-7.
6. Gonçalves JOR. A irrigação contínua no tratamento das úlceras micóticas da córnea. *Arq Bras Oftalmol* 1977;40:232-35.
7. Ishibashi Y. Experimental fungal keratitis due to *Fusarium*: studies on animal model and inoculation technique. In: Schimiza K, Oosterhuis J. Proceedings of the XXIII Concilium Ophthalmologicum of Kyoto. Amsterdam, Excerpta Medica 1978;1705-8.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: tentative standard. Villanova, NCCLS 1995;15(10):29p,M27-P.
9. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper Jr C, Fothergill A, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):139-43.
10. Colombo AL, McGough DA, Rinaldi MG. Discrepancies between MIC and MLC values of amphotericin B against isolates of *Aspergillus* species. *Mycopathologica* 1994;128:129-33.

11. Klippenstein K, O'Day DM, Robinson RD, Williams TE, Head WS. The qualitative evaluation of the pharmacokinetics of subconjunctivally injected antifungal agents in rabbits. *Cornea* 1993;12(6):512-6.
12. Yee RW, Cheng CJ, Meenakshi S, Ludden TM, Wallace JE, Rinaldi MG. Ocular penetration and pharmacokinetics of topical fluconazole. *Cornea* 1997;16(1):64-71.
13. Behrens-Baumann W, Klinge B, Rüchel R. Topical fluconazole for *Candida* keratitis in rabbits. *Br J Ophthalmol* 1990;74:40-2.
14. Sekhon AS, Padhye AA, Garg AK, Ahmad H; Moledina N. "In vitro" sensitivity of medically significant *Fusarium* species to various antimycotics. *Chemotherapy* 1994;40:239-44.
15. Speeleveld E, Gordts B, Van Landuyt HW, De Vroey C, Raes-Wuytack C. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs. *Mycoses* 1996;39:37-40.
16. Pujol I, Guarro J, Gené J, Sala J. "In vitro" antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp strains. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:163-7.
17. Grant SM, Clissold SP. Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs* 1990;39(6):877-916.
18. Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:314-9.
19. Pfaller MA, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: current state of technology, limitations and standardization. *Infec Dis Clin Nort Am* 1993;7(2): 435-44.
20. Reuben A, Anaissie E, Nelson PE, Hashem R, Legrand C, HO DH. Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1647-9.
21. Kiryu H, Yoshida S, Suenaga Y, Asahi M. Invasion and survival of *Fusarium solani* in the dexamethasone-treated cornea of rabbits. *J Med Vet Mycol* 1991;29:395-406.
22. Brummer E, Stevens DA. Synergy of human neutrophils with fluconazole in killing *Candida* species. *Mycopathologia* 1996;134:115-20.
23. Rheins MS, Suie T, Van Winkle MG, Havener WH. Potentiation of mycotic ocular infections by drugs. *Br J Ophthalmol* 1966;50:533-9.



**XXX
Congresso
Brasileiro de
Oftalmologia**

XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA

4 a 7 de setembro de 1999

Centro de Convenções de Pernambuco - Recife - PE

Tema Oficial:

Retina Clínica e Cirúrgica

Comissão Executiva

Presidente:

Marcelo Ventura

Presidente de Honra:

Geraldo Vicente de Almeida

Vice-Presidentes:

Afonso Medeiros
Francisco Cordeiro
Ronald Cavalcanti

Secretários Gerais:

Ely Almeida Santos
Saulo Gorenstein
Vasco Bravo

Secretários Executivos:

Fernando Cunha
Luis Aramando Gondim
Pedro Gondim

Tesoureiros:

Fernando Ventura
Flávia Emery
Theóphilo de Freitas

Convidados Internacionais Confirmados:

Scheffer Tseng, EUA
William Driebe, EUA
Kirk Paco, EUA
Donald Damico, EUA

William de La Peña, EUA
Stanley Chang, EUA
Eduardo Alfonso, EUA
Ilda Capo, EUA

Recife, aqui é o lugar!

INFORMAÇÕES: CBO Eventos

Al. Santos, 1343 - Cj. 1.110 - Cep: 01419-001 - São Paulo - SP
Tel: 011 284 9020 - Fax: 011 285 4509 - Email: eventos@cbo.com.br