

Colliri Antibatterici Rinforzati Reference Primer

Dott. Salvatore Luceri – Dott. Antonio Scialdone
Ospedale FBF Oftalmico – Milano

AIMO

INTRODUZIONE

Questo documento vuole essere uno strumento di rapida consultazione che fornisca un'idea immediata sul meccanismo di azione, la posologia e il razionale di scelta dei farmaci impiegati in Oculistica nel trattamento delle infezioni corneali (cheratiti) di origine batterica, fungina e amebica. Si è ritenuto utile fornire un elenco commentato degli antimicrobici ad uso oftalmico, cosiddetti “colliri rinforzati” (*“fortified antibiotics”*), mediante la raccolta di informazioni disponibili sia in scheda tecnica, sia nei dati derivanti dalla letteratura medica e dalle evidenze cliniche: il trattamento delle cheratiti virali (i.e. da HSV, HZV) è stato volutamente tralasciato nella stesura in quanto il trattamento di queste forme è ormai consolidato e consiste di farmaci già ampiamente disponibili in commercio sia in formulazioni topiche che sistemiche, pertanto non richiede formulazioni preparate ad hoc.

Questo breve manuale si propone, inoltre, di fornire una panoramica sull'utilità e le modalità di un prelievo del campione idoneo per l'identificazione microbiologica dell'agente eziologico responsabile, che spesso rappresenta un aspetto critico nella corretta gestione terapeutica di questo genere di patologie.

CHERATITI BATTERICHE

Le cheratiti batteriche richiedono una pronta diagnosi e un adeguato trattamento in quanto una mancata risoluzione dell'infezione può portare, in casi severi, a perforazione corneale ed endoftalmite, sebbene anche un successo terapeutico (guarigione dall'infezione) comporti facilmente una compromissione visiva da cicatrici corneali o astigmatismo irregolare.

La severità dell'infezione dipende dalla virulenza del microrganismo che l'ha causata e dalla presenza di eventuali comorbidità, sia sistemiche che locali (superficie oculare) (tab. 1).

I traumi, primi fra tutti quelli associati all'utilizzo di lenti a contatto (LAC), rappresentano il principale fattore di rischio: gli stafilococchi, in particolare lo *S. aureus*, fra i gram-positivi e lo *Pseudomonas aeruginosa* fra i gram-negativi risultano i più comuni microrganismi coinvolti nelle cheratiti batteriche.

La terapia deve essere iniziata nel più breve tempo possibile e consiste nella somministrazione di antibiotici, la cui scelta è generalmente empirica all'inizio, e guidata successivamente da prelievi corneali e relative colture, qualora necessario. Essendo la cornea un tessuto non vascolarizzato, farmaci somministrati per via sistemica hanno poca efficacia poiché non in grado di diffondersi a concentrazione sufficiente nel sito di infezione. Pertanto la somministrazione è soprattutto topica.

La concentrazione degli antibiotici in collirio disponibili in commercio è spesso insufficiente per infezioni corneali vaste, profonde o virulente. Per questo si impiegano antibiotici a maggiore concentrazione, cosiddetti fortificati o rafforzati. "Fortificare" un antibiotico significa potenziarne l'efficacia mediante un adeguato aumento della concentrazione per ottenere più elevate concentrazioni locali in sede di infezione, preparandoli da formulazioni liofilizzate o per uso parenterale alla concentrazione adeguata. Inoltre, per ottenere una concentrazione locale maggiore della concentrazione minima inibitoria (mic) della maggior parte dei batteri, l'instillazione iniziale di antibiotici dovrebbe essere intensiva, ogni 30 minuti nelle prime ore, ogni ora per le successive 48-72 ore e, in base alla risposta, da scalare nei giorni successivi ogni 2, 4 e 6 ore: viene considerato successo terapeutico la risoluzione del difetto epiteliale.¹

In caso di ulcere piccole o periferiche i fluorochinolonici (ofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina) sono gli antibiotici commercialmente disponibili più utilizzati come terapia iniziale e grazie ad una buona penetrazione oculare e un'attività ad ampio spettro, a concentrazioni non fortificate, contro la maggior parte dei microrganismi gram positivi e gram negativi.^{2,3}

In caso di ulcere corneali ampie, profonde, con bordi infiltrati, in presenza di ipopion l'utilizzo di antibiotici rinforzati è la prima indicazione.

Bisogna anche considerare che l'utilizzo diffuso di questi antibiotici ha portato allo sviluppo di resistenze farmacologiche soprattutto nei confronti dei fluorochinolonici di prima e seconda generazione che richiedono una sola mutazione, quella contro la DNA girasi, rispetto alle due mutazioni necessarie nei confronti di quelli di terza e quarta generazione (contro DNA girasi e topoisomerasi) per sviluppare resistenza.^{4,5} Colture di *S. aureus* hanno mostrato resistenze crescenti ai fluorochinolonici: i meticillino-resistenti (MRSA) non rispondevano all'ofloxacina (uno dei fluorochinolonici di uso più comune) fino al 74.6% dei casi e fino al 45.9% dei casi quando utilizzati fluorochinolonici di ultima generazione (moxifloxacina e gatifloxacina), pur mantenendo un'ottima risposta alla vancomicina.^{6,7} Anche *P. aeruginosa*, fra i gram-negativi, ha mostrato una resistenza crescente ai fluorochinolonici in aree geografiche come India e Florida.^{8,9}

Gli antibiotici sistemici sono raramente necessari e andrebbero riservati a casi di estensione del processo infettivo ai tessuti adiacenti (sclera), di perforazione corneale o infezione da *Neisseria gonorrhoeae*.

L'utilizzo di steroidi topici avrebbe il razionale potenziale di ridurre l'infiammazione locale e la conseguente risposta cicatriziale a scapito, però, di un rischio di recrudescenza dell'infezione, melting corneale da inibizione della sintesi di collagene, oltre che la possibilità di un aumento della pressione oculare. Tuttavia, non è stato dimostrato che l'aggiunta di steroidi topici sia associata a un maggior rischio di perforazione o tempo di riepitelizzazione, né a maggiori dimensioni del leucoma o una peggiore acuità visiva alla risoluzione,¹⁰ sebbene siano stati associati a leucomi più ampi in caso di cheratiti da *Nocardia*,¹¹ presumibilmente a causa di infezioni ricorrenti e tempo di riepitelizzazione prolungato. L'approccio attualmente suggerito è di introdurre gli steroidi topici dopo l'identificazione del microrganismo, quando si vedano segni di riduzione della infiltrazione stromale e comunque non

prima di 48 ore dall'inizio degli antibiotici rinforzati. In caso di cheratite da Nocardia o funghi questi farmaci vanno evitati.¹²

Il follow-up dovrebbe essere pressoché giornaliero fino a miglioramento dei sintomi e del quadro clinico, in modo da poter adeguare tempestivamente la terapia in caso di mancato miglioramento o stabilizzazione nelle prime 48 ore: risposte cliniche che suggeriscono una buona risposta alla terapia comprendono una riduzione del dolore, dell'edema palpebrale e dell' iniezione congiuntivale, della densità dell'infiltrato e dell' edema stromale, dell'attività in camera anteriore (cellule, fibrina e ipopion), iniziale riepitelizzazione.

La somministrazione di antibiotici andrebbe scalata progressivamente al miglioramento del quadro clinico in quanto una somministrazione prolungata si associa a tossicità con peggioramento dell'infiammazione e difetti epiteliali persistenti: quando la riepitelizzazione corneale è completa e l'infiltrato stromale risolto la terapia antibiotica topica può essere sospesa.

Fattori di rischio estrinseci	Fattori di rischio locali
Lenti a contatto:	Suture corneali lasse
<ul style="list-style-type: none"> • Uso eccessivo o notturno • Disinfezione inadeguata o con acqua di rubinetto, scarsa igiene • Utilizzo in piscina, vasche idromassaggio o durante la doccia • Scarsa supervisione specialistica 	Disfunzioni del film lacrimale
Traumi corneali - chimici, termici o da corpi estranei	Anomalie palpebrali - lagofthalmo, trichiasi
Chirurgia - cataratta, trapianto di cornea, chirurgia rifrattiva	Cheratite neurotrofica
Associati a farmaci (colliri contaminati, FANS, anestetici, steroidi, conservanti, ipotonizzanti topici)	Disturbi associati ad erosioni corneali ricorrenti
	Difetti epiteliali ed abrasioni
	Cheratiti virali - HSV, HZV
	Edema corneale epiteliale - cheratopatia bollosa
	Fattori di rischio sistemici
	Diabete mellito
	Malattie del connettivo
	Disturbi dermatologici/mucosi - S. Stevens-Johnson, pemfigo
	Blefarocongiuntivite atopica
	Deficienza vit. A
	Graft-versus-host-disease
	Neurinoma dell'acustico e neurochirurgia con danno al V o VII n.c.

Tabella 1: fattori di rischio favorenti lo sviluppo di cheratite infettiva

Cocchi gram-positivi (es. stafilococchi, streptococchi)

- ✓ Fluorochinoloni (diverse concentrazioni)
- ✓ Cefazolina 50 mg/ml
- ✓ Vancomicina 10-50 mg/ml

Bacilli gram-positivi (es. micobatteri non tubercolari)

- ✓ Fluorochinoloni (diverse concentrazioni)
- ✓ Amikacina 20-40 mg/ml
- ✓ Claritromicina 10 mg/ml
- ✓ Azitromicina 10 mg/ml

Cocchi gram-negativi (es. Neisseria)

- ✓ Fluorochinoloni (diverse concentrazioni)
- ✓ Ceftriaxone 50 mg/ml
- ✓ Ceftazidime 50 mg/ml

Bacilli gram-negativi (es. Pseudomonas, Haemophilus, enterobatteri)

- ✓ Fluorochinoloni (diverse concentrazioni)
- ✓ Tobramicina/gentamicina 9-14 mg/ml
- ✓ Ceftazidime 50 mg/ml

Microorganismi non identificati

- ✓ Fluorochinoloni (diverse concentrazioni)
- ✓ Cefazolina/Vancomicina 25-50 mg/ml + Tobramicina/Gentamicina 9-14 mg/ml

Bacterial Keratitis – preferred practice pattern AAO (2018)

CHERATITI FUNGINE

Le cheratiti fungine sono meno comuni rispetto alle batteriche in paesi dai climi temperati e rimangono tipiche soprattutto di paesi tropicali e subtropicali, con picchi di incidenza stagionale durante i mesi più caldi e umidi. Anche se l'utilizzo diffuso di lenti a contatto morbide rappresenta un importante fattore predisponente verso questo tipo di infezioni nei paesi sviluppati, l'eziologia fungina è tipicamente secondaria a traumi corneali, in particolare da materiale vegetale, i quali rimangono il principale fattore di rischio;^{13,14} sono comunque riportati casi in seguito a trapianti di cornea^{15,16} o chirurgia della cataratta.¹⁷ *Fusarium* e *Aspergillus*, fra i funghi filamentosi, e le specie di *Candida*, fra le muffe, sono i funghi isolati più di frequente.¹⁸⁻¹⁹

I sintomi sono generalmente meno intensi rispetto a quelli riportati nelle cheratiti batteriche, e con un decorso più lento: aspetti clinici suggestivi di eziologia fungina sono infiltrati a margini soffici e irregolari, dall'aspetto asciutto e a bordi rilevati, la presenza di lesioni satelliti (funghi filamentosi) e pigmentazione grigio/marrone (*Curvularia*); a volte l'epitelio è intatto al di sopra di un infiltrato stromale profondo (*Candida*).

Il trattamento principale delle cheratiti fungine è basato sull'utilizzo di formulazioni topiche che devono comunque essere preparate in estemporanea in quanto non disponibili commercialmente.

La natamicina topica è considerata il trattamento di scelta quando la cheratite è sostenuta da funghi filamentosi, soprattutto da *Fusarium*,²⁰ non viene distribuita in Italia ma è ordinabile presso la farmacia Vaticana (<http://www.vaticanstate.va/it/servizi/farmacia-vaticana/orari-e-spedizioni.html>)

o presso altri Paesi. Alternative sono l'amfotericina B, utilizzata anche per *Candida* o *Aspergillus*, o il voriconazolo topici. La somministrazione dovrebbe essere oraria nei primi giorni, scalata poi a 6-8 volte al giorno dopo 3 o 4 giorni a seconda della risposta clinica e mantenuta fino ad un mese 4 volte al giorno.²¹

L'utilità di un'associazione con antimicotici sistemici è controversa e, ad oggi, non esiste una vera evidenza scientifica che avvalori un uso di routine di terapie sistemiche; queste possono essere giustificate in casi particolarmente severi di coinvolgimento limbare o sclerale, perforazione incipiente o in atto, endoftalmite, casi refrattari, pediatrici e post-cheratoplastica.^{22,21} In particolare, il voriconazolo per via orale sembra avere un ruolo additivo nelle cheratiti da *Fusarium* quando aggiunto alla natamicina topica.²³ la sua ottima penetrazione intraoculare permette concentrazioni inibenti la maggior parte di funghi e muffe (anche per somministrazione topica e in occhi non infiammati) e lo rende utile, per via sistemica, come adiuvante in caso di cheratiti refrattarie e ideale nelle endoftalmiti endogene da *Candida* (le più comuni).^{24,25} Casi refrattari e infiltrati profondi sono stati trattati anche con iniezione intrastromale (intracorneale) di antimicotici (voriconazolo il più utilizzato) e in camera anteriore (amfotericina B):^{26,27} in caso di insuccesso, come per le cheratiti batteriche, alternativa terapeutica finale rimane la cheratoplastica terapeutica.

Come nelle cheratiti batteriche, testare la suscettibilità agli antimicrobici è importante anche nella gestione clinica di pazienti con cheratiti fungine, data la diffusione di resistenze anche fra questi microrganismi.^{28,29} Il gold standard della diagnosi di laboratorio rimangono gli esami microbiologici con analisi "a fresco" al microscopio e colture³⁰ che permettono di differenziare fra infezioni da funghi filamentosi e muffe, identificare eventuali coinfezioni batteriche, testare la suscettibilità ai farmaci antifungini.³¹ Inoltre, le colture hanno mostrato anche valore prognostico in quanto, qualora ripetute a 6 giorni dall'inizio del trattamento e ancora positive, è più probabile aspettarsi outcomes visivi peggiori, leucomi più ampi e maggiore rischio di perforazione: in tal caso, l'oculista può considerare l'aggiunta di un altro agente antifungino topico, sistemico o per via intrastromale.³²

CHERATITE DA ACANTHAMOEBA

L'acanthamoeba è un parassita ubiquitario, presente nell'aria, suolo, acqua in forma cistica dormiente, molto resistente ad antibiotici, temperature estreme e UV, che assume caratteristiche invasive nella sua forma di trofozoita.

Essendo poco frequente e condividendo aspetti clinici sovrapponibili alle cheratiti di origine erpetica, batterica o fungina,³³ questa forma di cheratite viene spesso misdiagnosticata con conseguente ritardo della diagnosi e terapie inadeguate fino sviluppare quadri clinici avanzati di compromissione corneale. Inizialmente, può esserci solo un coinvolgimento epiteliale (epiteliopatia pseudodendritiforme, microerosioni e microcisti) per cui potrebbe non essere fatta diagnosi di cheratite infettiva prontamente; la successiva invasione stromale (entro 2-4 settimane) sviluppa facilmente segni clinici più suggestivi quali, fra gli altri, un dolore severo e invalidante, sproporzionato rispetto al quadro clinico, un infiltrato anulare o infiltrati multipli, cheratoneurite radiale.³⁴

L'oculista deve sospettare un'eziologia amebica in presenza di fattori di rischio come l'utilizzo non corretto di lenti a contatto o un'esposizione all'acqua o a traumi con materiale potenzialmente contaminato, colture negative e una mancata risposta ad antibiotici, antivirali ed antimicotici. Dove

disponibile, avvalersi di polymerase-chain-reaction (PCR) e analisi istopatologica. La microscopia confocale, che visualizza le cisti amebiche come opacità biancastre intrastromali³⁵ è utile ma richiede esperienza e non può essere improvvisata. Gli esami colturali con escherichia coli richiedono un terreno specifico e possono non dare risultati fino a 3 settimane.

Il trattamento della cheratite da *Acanthamoeba* rimane topico, basato su colliri a base di *diamidine*, propamidina isetionato 0.1% (Brolene) e esamidina 0.1%, (Desomedine), e di *biguanidi*, poliesametilene biguanide 0.02% (PHMB) e clorexidina 0.02%, queste ultime più efficaci delle prime anche verso la forma cistica.³⁴³⁶ La somministrazione topica di questi colliri dovrebbe essere a cadenza oraria per alcuni giorni (e notti) e poi scalata entro 4-6 settimane ad un dosaggio di 4 volte al giorno: questa terapia di mantenimento va ridotta molto lentamente (3-6 mesi) per assicurare la morte delle cisti.

Le diamidine sono disponibili in commercio come colliri in alcuni Paesi ma non in Italia: Brolene è disponibile in Inghilterra o reperibile in Vaticano e ordinabile online; Desomedine è ottenibile in Svizzera con prescrizione medica anche italiana o nella farmacia Vaticana. Una preparazione a base di PHMB 0.02% in soluzione fisiologica tamponata, può essere richiesta a SIFI tramite specifico modulo reperibile sul sito dell'azienda (<https://www.sifigroup.com/public/files/Modulo%20di%20richiesta%20PHMB%200%2C02%20.pdf>). Come la clorexidina, lo iodopovidone è un disinfettante di uso comune in sala operatoria: ha dimostrato, in vitro e alla concentrazione dell'1%, un effetto di inibizione delle cisti amebiche (con possibile attività cisticida) maggiore rispetto a propamidina e PHMB, incontrando interesse come ulteriore strategia terapeutica, sebbene la sua efficacia non sia ancora supportata da studi clinici.³⁷

CHERATITI MISTE

Le infezioni polimicrobiche sono sostenute da più microrganismi nello stesso momento, il più delle volte si tratta di una combinazione di un batterio e un fungo, oppure di diverse specie di batteri: sono poco comuni (3.5%-4.8%) ma non rare, frequentemente associate a traumi oculari.³⁸⁻³⁹ La coinfezione può derivare da un'inoculazione diretta al momento del trauma, sovrainfezione, infezione opportunistica favorita da patologie della superficie oculare preesistenti o precedente uso di steroidi. Non rara la coinfezione con HSV.

Problemi potenziali associati alle cheratiti miste includono un ritardo nella diagnosi e un decorso prolungato della patologia. Può capitare che in un primo momento venga isolato un solo microrganismo, ad esempio un batterio, e che il trattamento specifico non sia sufficiente per la risoluzione della cheratite quando associata vi è una infezione fungina e non viene associato un antimicotico in terapia. E' quindi importante considerare la possibilità di una cheratite polimicrobica in caso di fallimento del trattamento specifico iniziale contro il primo microrganismo isolato, e pertanto è consigliato ripetere le colture.

Un ritardo nell'isolamento o nel trattamento di uno dei microrganismi coinvolti può risultare in outcome peggiori, infiltrati più ampi ed un maggior rischio di endoftalmite.³⁸⁻³⁹

IL RUOLO DELLE COLTURE

Gli scraping corneali e relative colture confermano la diagnosi di cheratite, identificando l'agente patogeno e definendone la sensibilità agli antibiotici o antimicotici (antibiogramma), quindi permettendo una terapia mirata.

Le colture sono opzionali in caso di piccole ulcere periferiche, senza melting corneale, ma andrebbero eseguite *sempre* in caso di:

- infiltrati corneali centrali, ampi (≥ 2 mm) e/o associati a melting stromale
- infezioni croniche o non responsive agli antibiotici ad ampio spettro
- storia di chirurgia corneale
- caratteristiche cliniche atipiche, suggestive di infezioni fungine, da amebe o micobatteri
- infiltrati corneali multipli¹

Un adeguato campione corneale si ottiene instillando anestetico topico (la minor quantità possibile per l'attività antimicrobica intrinseca che può influenzare negativamente la coltura)⁴⁰ ed utilizzando una spatola, lama o un tampone sterile per eseguire uno *scraping* accurato del materiale ai bordi dell'area corneale infetta (circa 10-15 secondi): tale procedura va eseguita alla lampada a fessura. La raccolta del solo materiale purulento è spesso insufficiente per le colture e andrebbe pertanto rimosso prima di eseguirle. Il materiale ottenuto andrebbe inoculato nei mezzi di coltura nel minor tempo possibile per ottimizzare la raccolta.⁴¹ Spesso però, in uno scenario reale, il mezzo di coltura non è prontamente disponibile all'oculista, per cui si utilizzano *tamponi* sterili disponibili in commercio per trasporto di batteri, virus, chlamidia, micoplasmi. I tamponi attualmente disponibili in commercio hanno un rivestimento della punta in nylon floccato che agisce come un soffice spazzolino che permette di recuperare e rilasciare il campione prelevato in quantità maggiore rispetto a quelli tradizionali (rayon, Dacron). Vanno quindi esclusi i comuni tamponi faringei. Il kit di prelievo è costituito dal tampone stesso e da una provetta con tappo a vite contenente 1 ml di terreno di trasporto adatto a conservare e mantenere vitali i microrganismi per i quali il determinato tampone è specifico (fig. 1).

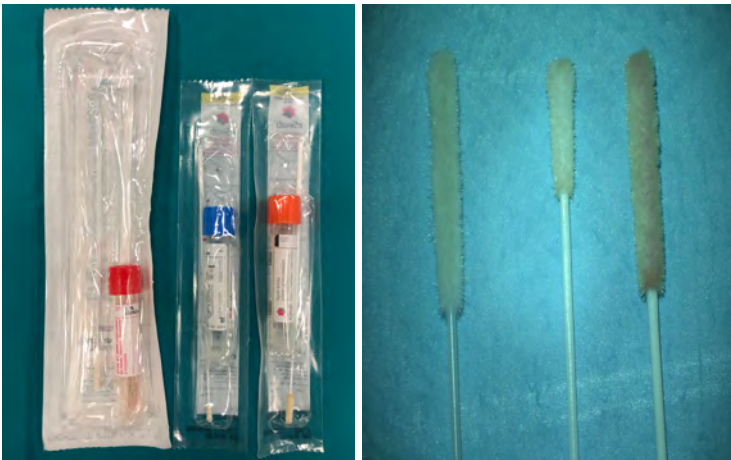


Fig 1 – esempi di kit per campionamento microbiologico disponibili in commercio e relativi tamponi

Prima dello scraping corneale andrebbero eseguiti anche prelievi palpebrali e congiuntivali dell'occhio interessato e del controlaterale poiché, in caso di colture corneali negative, le altre potrebbero fornire indicazione del possibile patogeno. Per ottenere *colture palpebrali* il tampone andrebbe sfregato lungo tutto il margine palpebrale inferiore, mentre quelle congiuntivali vengono eseguite facendo guardare il paziente in alto e passando il tampone lungo il cul-de-sac congiuntivale. A questo punto si procede con un secondo tampone al *prelievo corneale*, applicando il tampone su margini e letto dell'ulcera, con leggera pressione tale da indentare leggermente la cornea (meno pressione se l'eccessivo assottigliamento può predisporre alla perforazione) e con diversi passaggi sull'area di interesse per aumentare la possibilità di successo del prelievo; inoltre, è importante evitare contaminazione del campione per contatto con le ciglia o le palpebre. Dopo il prelievo, il bastoncino del tampone va inserito (e rotto in corrispondenza del punto di rottura colorato, fig. 2) all'interno dell'apposita provetta contenente il terreno di trasporto e il tutto inviato al laboratorio di microbiologia, dove si provvederà alla semina del campione nei terreni di coltura idonei, all'identificazione del patogeno e all'esecuzione dell'antibiogramma.



Fig. 2 – conservazione del campione microbiologico

Nel sospetto di un'eziologia fungina il prelievo viene eseguito allo stesso modo ma dovrebbe essere più abbondante per minimizzare la possibilità di colture falsamente “negative”. Quando la semina diretta non è possibile per mancanza del terreno adatto, il campione andrebbe indirizzato alla microbiologia prima possibile (per una semina entro 2 ore) per favorire la sopravvivenza dei microrganismi oppure conservato a 4° C per evitarne una sovracrescita batterica, che potrebbe avere il sopravvento su quella microbica.

In caso di colture negative, cheratiti croniche e non guaribili, o infiltrati troppo profondi per uno scraping superficiale vi è indicazione per una *biopsia corneale*: una biopsia di almeno 1-2 mm in diametro, a spessore parziale, è generalmente un campione sufficiente per l'analisi istopatologica e colturale. In breve, dopo aver preparato il campo sterile sotto al microscopio operatorio e fornito anestesia topica, si procede con una trapanazione parziale ad una profondità di 0.2-0.3 mm e dissezione lamellare con bisturi del campione da inviare alla microbiologia: se possibile, andrebbe inclusa l'intera area affetta risparmiando l'asse visivo per quanto possibile.⁴²

Agar-sangue e agar-cioccolato (incubazione a 35°-37°) sono i mezzi di coltura comunemente utilizzati per isolare la maggior parte dei patogeni coinvolti nelle infezioni oculari: il primo permette la crescita della maggior parte dei batteri aerobi e funghi ad eccezione delle specie patogene più esigenti, come *Neisseria*, *Haemophilus* e *Moraxella*, che crescono meglio su agar-cioccolato. I funghi crescono meglio su terreni a base di agar-Sabouraud (incubazione a 22-25°), mentre terreni non nutrienti con uno strato di *Escherichia coli* sono utilizzati per la coltura di *Acanthamoeba*. Viene utilizzato il brodo di coltura (tryptone o tioglicolato, incubazione a 36°) per l'isolamento di micobatteri, batteri aerobi e anaerobi facoltativi (incluse le specie di stafilococchi e streptococchi, *E.coli* e *Listeria*) e miceti.¹



Fig. 3 – colture positive su agar-sangue, Sabouraud e brodo di tryptone

I prelievi corneali andrebbero routinariamente inoculati su agar-sangue, cioccolato, Sabouraud e brodo di coltura entro le 24 ore (fig. 3); la coltura specifica per *Acanthamoeba* viene raramente utilizzata in quanto non immediata e la diagnosi, al giorno d'oggi, si avvale di strumenti come la PCR e l'analisi istopatologica e la microscopia confocale (utile anche nell'evidenziare le ife in cheratiti da funghi filamentosi), se c'è esperienza nell'uso.

Le colture aerobiche sono incubate a 35°-37° con una buona crescita di microrganismi fra le 24 e le 48 ore, ma quelli a lenta crescita possono richiedere fino a 7 giorni prima di fornire un esito di mancata crescita. Gli anaerobi possono metterci fino a 7 giorni per formare colonie visibili sui terreni di coltura e, per tale motivo, non andrebbero smaltiti prima delle 2 settimane. Funghi e micobatteri possono richiedere fino 6-8 settimane prima che venga stabilita assenza di crescita, ma nella maggior parte dei casi le colture diventano positive nei primi 3-7 giorni.

In laboratorio, prima della semina sul tampone sui terreni di coltura può essere fatto un esame a “fresco” del materiale inviato, mediante lo striscio su vetrino e colorazioni specifiche: la colorazione di Gram viene usata di routine per visualizzare batteri e funghi mentre quella di Giemsa, in più, permette di identificare corpi inclusi intracitoplasmatici da *Chlamydia* e *Acanthamoeba*. La colorazione a base di KOH (idrossido di potassio) è specifica per funghi, sia filamentosi che muffe, mentre la colorazione di Ziehl-Neelsen viene utilizzata quando si sospettano micobatteri o infezioni da *Nocardia*. La crescita dei patogeni sui terreni di coltura è seguita dall'identificazione dei patogeni e dalla definizione della sensibilità agli antimicrobici, mediante l'utilizzo di specifici pannelli in base al microrganismo isolato.

Oltre all'agente patogeno responsabile, il laboratorio fornisce anche l'antibiogramma (fig. 4), che permette di determinare, per una serie di famiglie di antibiotici testati, la più bassa concentrazione capace di inibire la crescita dei microrganismi identificati (concentrazione minima inibente, MIC). I risultati vengono indicati in un referto come quello in figura. Le MIC più basse sono quelle degli antibiotici più efficaci per il microorganismo individuato: più è bassa la MIC di uno specifico antibiotico, maggiore è la sensibilità del patogeno allo stesso.

BATTERIOLOGIA

Materiale: Tampone Congiuntivale destro

Esame: Coltura T. congiuntivale DX
 Risultato: Positivo
 Ceppo 1: Pseudomonas aeruginosa

Antibiogramma Ceppo 1

ANTIBIOTICI	MIC				
Amikacina	16	I			
Cefotaxime	>32	R			
Ceftazidime	>32	R			
Ciprofloxacina	>2	R			
Fosfomicina	32	R			
Gentamicina	>8	R			
Meropenem	2	S			
Nitrofurantoina	>256	R			
Piperacillina/Tazobactam	64	R			
Tigeciclina	>4	R			
Trimetoprim/Sulfametoxazolo	>160	R			

Legenda: S = Sensibile; I = sensibile, dose dipendente, relazionato al sito di infezione; R = Resistente.
 MIC = Minima Concentrazione Inibente in µg/mL
 L'ANTIBIOGRAMMA refertato è stato rianalizzato in allineamento col Bollettino EUCAST 2019

Fig. 4 – esito culturale con relativo antibiogramma di Pseudomonas sensibile soltanto a Meropenem

Fino al 35% delle colture (fino al 59% quando si considerano solo prelievi da ulcere post-traumatiche)^{14,43} possono risultare falsamente negative, senza fornire indicazioni terapeutiche aggiuntive. I motivi possono essere prelievo eseguito scorrettamente, prelievo troppo superficiale, tipo di tampone errato, eccesso di antibiotico nelle ore precedenti il prelievo, troppo tempo fra prelievo e insemminazione (frequente), insemminazione eseguita male, terreno di trasporto errato. L'oculista può considerare di interrompere la terapia per 12-24 ore prima di eseguire un nuovo prelievo, in quanto la crescita di eventuali patogeni è influenzata dalla presenza di antimicrobici.

PREPARAZIONE DEI PIU' COMUNI COLLIRI RINFORZATI

I colliri di seguito elencati hanno concentrazioni di antibiotici, non commercializzate e devono essere preparati ad hoc sul singolo paziente. Si tratta di medicinali utilizzati *off-label* ma ampiamente descritti e riportati in letteratura, quindi di uso ormai consolidato e largamente utilizzati in tutto il mondo.

Tali formulazioni risultano essere delle vere e proprie preparazioni galeniche che devono, quindi, sottostare a precise regole di allestimento e distribuzione, come stabilito dal D.M. del 18 novembre 2003 in merito alle "Procedure di allestimento di preparati magistrali e officinali". Se, per mancanza di cooperazione, di tempo o di expertise la preparazione da parte della farmacia non fosse possibile: è piuttosto semplice allestire, con l'aiuto di un collaboratore, un campo di "tipo operatorio" con ampio telo sterile, guanti, siringhe ed aghi monouso sterili.

Sul telino sterile aperto andranno appoggiati solo strumenti sterili. Gli aghi monouso scoperti non

devono venire in contatto con il piano di appoggio e l'esterno di flaconi o essere tenuti fra le dita. In generale, i colliri “rinforzati”, quando preparati come sospensioni (diluzione di polvere contenente il principio attivo) andrebbero conservati al riparo dalla luce e refrigerati (2°-8°C) fino a 7 giorni, essendo privi di conservanti, e agitati prima dell’uso.

ANTIBIOTICI

Come descritto in precedenza, alla presentazione di un quadro clinico severo di cheratite batterica (ulcere corneali ampie, profonde, coinvolgenti l’asse visivo, in presenza di ipopion) e in attesa dei risultati dell’antibiogramma andrebbe instaurata una terapia topica empirica ad ampio spettro. A tal proposito una buona scelta iniziale sarebbe l’associazione di colliri fortificati a base di vancomicina, con ottima copertura verso i gram-positivi, inclusi gli MRSA, e ceftazidime per una copertura ottimale contro i gram-negativi, in particolare *Pseudomonas*. La terapia va poi adeguata in base ai risultati forniti dall’antibiogramma, se necessario.

CEFAZOLINA O CEFTAZIDIME 50 mg/ml

Cefalosporine (β -lattamici) di prima (attività contro gram-positivi ed alcuni gram-negativi) e terza generazione (migliore attività contro gram-negativi, ottima contro *Pseudomonas*), rispettivamente. Spesso somministrate in associazione con un aminoglicoside per ottimizzare la copertura antibiotica.⁴⁴ Gli antibiotici β -lattamici, essendo instabili in soluzione, non esistono in commercio in forma di collirio e andrebbero preparati ogni 4-5 giorni. Possibile reazione in pazienti allergici alle penicilline.

- Aggiungere 10 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali ad un flacone da 1 g di cefazolina o ceftriaxone in polvere e sciogliere [concentrazione risultante: 100 mg/ml].
- Prelevare 5 ml di soluzione da aggiungere a ulteriori 5 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali [50 mg/ml].
- Conservare in frigo ed agitare prima dell’uso. ^[L]_[SEP]

TOBRAMICINA 15 mg/ml O GENTAMICINA 14 mg/ml

Aminoglicosidi che agiscono come battericidi per inibizione della sintesi proteica (subunità ribosomiale 30S) principalmente in batteri gram-negativi, ma anche *S. aureus* e *S. epidermidis*. Per la cheratite da *Pseudomonas*, possono essere associati a una cefalosporina con adeguata attività contro questo bacillo.

- Prelevare 2 ml di soluzione di tobramicina o gentamicina in preparazione iniettabile (40 mg/ml) da aggiungere a collirio (5 ml) a base di tobramicina o gentamicina 0.3% disponibili in commercio per ottenere una soluzione di 14 mg/ml
- Conservare in frigo ed agitare prima dell’uso ^[L]_[SEP]

AMIKACINA 50 mg/ml

Altro aminoglicoside, frequentemente associato ad altri antibiotici in caso cheratiti da micobatteri, spesso riportate a seguito di LASIK.⁴⁵⁴⁶ Rimane il farmaco di scelta per la cheratite da *Nocardia*.⁴⁷

- Prelevare 1 ml di amikacina in preparazione iniettabile (500 mg/2 ml) da aggiungere a 4 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione di circa 50 mg/ml.

VANCOMICINA 50 mg/ml; 25 mg/ml; 15 mg/ml

Glicopeptide attivo contro gram-positivi, inclusi gli MRSA (per i quali è antibiotico di scelta),⁶ ma nessuna attività contro gram-negativi: non dovrebbe essere somministrata come singolo antibiotico nel trattamento iniziale della cheratite batterica, ma riservata a stafilococchi resistenti alle cefalosporine.

- Aggiungere 10 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali ad un flacone da 500 mg di vancomicina in polvere per ottenere una soluzione di 50 mg/ml;
- Prelevare 5 ml della soluzione da 50 mg/ml da aggiungere a ulteriori 5 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione di 25 mg/ml;
- Prelevare 3 ml della soluzione da 50 mg/ml da aggiungere a ulteriori 7 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione di 15 mg/ml.

TRIMETOPRIM – SULFAMETOXAZOLO 16 mg/ml – 80 mg/ml

Combinazione di antibiotici che agiscono su fasi sequenziali del metabolismo dell'acido folico di batteri gram-positivi e negativi, utilizzata con successo in cheratiti da *Nocardia*.⁴⁸

- Prelevare 1 ml di combinazione fissa Trimetoprim – Sulfametoxazolo in preparazione iniettabile (80 mg/5 ml + 400 mg/5 ml) da aggiungere a 4 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione di circa 16 - 80mg/ml.

ALTRE FORMULAZIONI

Allo stesso modo possono essere diluiti vari antibiotici per preparare i colliri più appropriati in base ai risultati forniti dall'antibiogramma. Si riportano alcune formulazioni già presenti in letteratura con le relative concentrazioni:

- Imipenem 5 mg/ml⁴⁹ – beta-lattamico ad ampio spettro, disponibile in polvere per soluzione iniettabile combinato con cilastina (500mg+500mg): diluire imipenem+cilastina in polvere con 10 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione di 50 mg/ml, aggiungere 1 ml di tale soluzione a 9 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione della concentrazione desiderata.

- Meropenem 50 mg/ml^{50,51} - beta-lattamico ad ampio spettro, disponibile in polvere per soluzione iniettabile da 500 o 1000 mg: diluire meropenem 500 mg in polvere con 10 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere la concentrazione desiderata. (fig. 5)
- Piperacillina/tazobactam 10 mg/ml⁵² - beta-lattamico in associazione ad inibitore delle β -lattamasi (tazobactam) disponibile in polvere per soluzione iniettabile da 2 g + 250 mg: diluire la polvere in 10 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione alla concentrazione di 200 mg/ml, poi diluire 0.5 ml di tale soluzione con 9.5 ml di soluzione fisiologica o lacrime artificiali per ottenere la concentrazione desiderata.
- Colistimetato 16 mg/ml⁵³ – disponibile in polvere per soluzione iniettabile da 1.000.000 UI (80 mg): diluire la polvere in 5 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione della concentrazione desiderata.

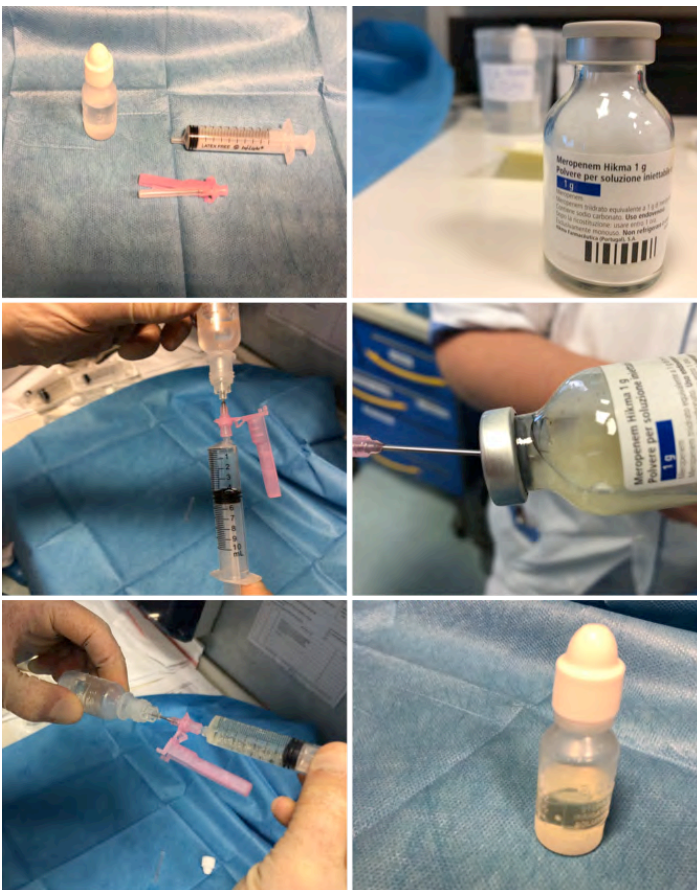


Fig. 5 – esempio di preparazione di collirio rinforzato Meropenem 5%

ANTIMICOTICI

AMFOTERICINA B 1.5 mg/ml

E' stato il primo antimicotico utilizzato nelle cheratiti fungine. Poliene, interagisce con l'ergosterolo comportando perdita di materiale cellulare attraverso pori nella membrana cellulare. Altamente attivo contro *Candida* e *Cryptococcus*, ma non efficace contro le specie di *Fusarium*. E' poco solubile in acqua e altamente fotosensibile, va per questo conservato al buio e refrigerato (2°-8°). L'uso sistemico è limitato dalla tossicità renale dose-dipendente (che può essere limitata con infusione di liquidi endovenosi) ed epatotossicità, ma rimane l'antimicotico più sicuro in gravidanza.²¹

- Aggiungere 10 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali a 50 mg di amfotericina B in polvere;
- Prelevare 3 ml della soluzione ottenuta da 5 mg/ml da aggiungere a ulteriori 7 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione di 1.5 mg/ml

NATAMICINA 50 mg/ml

Poliene, agisce come fungicida interagendo con l'ergosterolo della membrana plasmatica alterando il trasporto di glucosio e aminoacidi all'interno della cellula: ha un ampio spettro di attività fungina (*Alternaria*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Scedosporium*, *Trichophyton*, *Penicillium* spp.) ed è il farmaco di scelta nelle infezioni da *Fusarium* e *Aspergillus*.²¹ Ha un'ottima penetrazione intracorneale ma non raggiunge la camera anteriore in concentrazioni sufficienti. Esiste già una formulazione in collirio commercializzata da Alcon ma non disponibile in tutti i paesi (Italia inclusa, ma ordinabile presso la farmacia Vaticana)

VORICONAZOLO 10 mg/ml

Triazolo con azione dose-dipendente: fungistatico a basse concentrazioni, fungicida ad alte. Altera la permeabilità della parete cellulare fungina inibendo la sintesi dell'ergosterolo, una sua componente fondamentale, portando a lisi cellulare. E' disponibile sia in formulazione orale (200-400 mg 2 volte al giorno) che parenterale. Rispetto ad altri farmaci della stessa classe (fra cui fluconazolo e itraconazolo) ha uno spettro d'azione più ampio, ideale per infezioni da *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* (inclusi i ceppi resistenti ad altri azoli e amfotericina B) e con una buona azione anche contro *Fusarium*.^{21,54} considerato la migliore alternativa in caso di cheratiti refrattarie alla natamicina. E' controindicato in gravidanza in quanto teratogenico.

- Aggiungere 20 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali a 200 mg di voriconazolo in polvere per ottenere una soluzione di 10 mg/ml

ITRACONAZOLO 10 mg/ml

Triazolo, attivo contro la maggior parte di *Candida* e *Aspergillus* spp., molto meno contro *Fusarium* spp. In alcuni Paesi è disponibile sia in collirio che in pomata oftalmica, ma non in Italia, dove esiste solo come formulazione orale in compresse, per cui la preparazione topica dovrebbe essere richiesta alla farmacia ospedaliera.

FLUCONAZOLO 2 mg/ml

Spettro d'azione ridotto rispetto ad altri triazoli, limitato a *Candida* spp, per cui rimane poco utilizzato. Già disponibile come soluzione per infusione (50 ml) alla concentrazione richiesta.

POSACONAZOLO 10 mg/ml

Triazolo di seconda generazione, utilizzato con successo grazie al suo ampio spettro d'azione contro la maggior parte delle *Candida* spp (incluse quelle resistenti al fluconazolo) e funghi filamentosi come *Aspergillus* e *Fusarium* spp: è risultato efficace in cheratiti fungine resistenti ai comuni antimicotici come voriconazolo, fluconazolo e ketoconazolo. Somministrato anche per via orale (200 mg 4 volte al giorno), mostra un ottimo profilo di tolleranza, ma sono possibili effetti collaterali ed è teratogenico quando usato in gravidanza.²¹

- Prelevare 5.5 ml di soluzione per infusione da 300 mg posaconazolo (ciascun ml contiene 18 mg di principio attivo) da diluire con 4.5 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione di 10 mg/ml

CASPOFUNGIN 5 mg/ml – 10 mg/ml

Echinocandina, un lipopeptide che inibisce la sintesi del β -glucano, un polisaccaride della parete fungina, con potente attività contro molte *Candida* e *Aspergillus* spp.: è stata spesso utilizzata con successo in cheratiti fungine refrattarie. La formulazione al 5% rimane stabile per 28 giorni quando refrigerata (4°) e solo per 3 giorni a temperatura ambiente (25°).²¹

- Diluire 70 mg di caspofungin in polvere con 3.5 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali con per ottenere una soluzione di 20 mg/ml
- Aggiungere 3.5 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione da 10 mg/ml
- Prelevare 5 ml di quest'ultima soluzione da aggiungere a 5 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) o lacrime artificiali per ottenere una soluzione da 5 mg/ml

ANTIAMEBICI

PHMB 0.2 mg/ml

Biguanide con attività antitrofozoita e cisticida. SIFI dispone di una preparazione a base di PHMB 0.02% in soluzione fisiologica tamponata, previa richiesta tramite specifico modulo reperibile sul sito dell'azienda (precedentemente riportato)

CLOREXIDINA 0.2 mg/ml

Disinfettante ad ampio spettro, ampiamente utilizzata in sala operatoria. Richiede una preparazione con diluizione della soluzione in commercio per uso topico.

ALTRE VIE DI SOMMINISTRAZIONE

Alcuni antimicrobici sono indicati per la somministrazione oculare per via intrastromale corneale, in camera anteriore e intravitreale.

ANTIBIOTICI

- CEFTAZIDIME - per via intravitreale in caso di endoftalmite (*2.25mg/0.1ml*)
- CEFAZOLINA - in camera anteriore a scopo terapeutico o profilattico (*1mg/0.1ml*)
- GENTAMICINA –per via intravitreale in caso di endoftalmite (*0.2mg/0.1ml*)
- AMIKACINA - per via intravitreale in caso di endoftalmite (*0.4mg/0.1ml*)
- VANCOMICINA - per via intravitreale in caso di endoftalmite o iniettata in camera anteriore a scopo terapeutico o profilattico (*1mg/0.1ml*)

ANTIMICOTICI

- VORICONAZOLO - per via intrastromale (*50-100µg/0.1ml*) o iniettato in camera anteriore (*50µg/0.1 ml*)
- FLUCONAZOLO - per via intravitreale (*25µg/0.1ml*)
- AMFOTERICINA B - per via intrastomale (*5-7.5µg/0.1ml*), iniettata in camera anteriore (*5-10 mg/0.1 ml*) e intravitreale (*5µg/0.1ml*) con iniezioni ripetibili ogni 72 ore.

BIBLIOGRAFIA

1. Lin A, Rhee MK, Akpek EK, et al. Bacterial Keratitis Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*. 2019. doi:10.1016/j.ophtha.2018.10.018
2. Scoper S V. Review of third-and fourth-generation fluoroquinolones in ophthalmology: In-vitro and in-vivo efficacy. *Adv Ther*. 2008. doi:10.1007/s12325-008-0107-x
3. Kowalski RP, Dhaliwal DK, Karenchak LM, et al. Gatifloxacin and moxifloxacin: An in vitro susceptibility comparison to levofloxacin, ciprofloxacin, and ofloxacin using bacterial keratitis isolates. *Am J Ophthalmol*. 2003. doi:10.1016/S0002-9394(03)00294-0
4. Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom*. 2018. doi:10.1111/cxo.12621
5. Thirumalmuthu K, Devarajan B, Prajna L, Mohankumar V. Mechanisms of Fluoroquinolone and Aminoglycoside Resistance in Keratitis-Associated *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*. 2019. doi:10.1089/mdr.2018.0218
6. Chang VS, Dhaliwal DK, Raju L, Kowalski RP. Antibiotic resistance in the treatment of staphylococcus aureus Keratitis: A 20-year review. *Cornea*. 2015. doi:10.1097/ICO.0000000000000431
7. Asbell PA, Sanfilippo CM, Pillar CM, DeCory HH, Sahm DF, Morris TW. Antibiotic resistance among ocular pathogens in the United States five-year results from the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular Microorganisms (ARMOR) surveillance study. *JAMA Ophthalmol*. 2015. doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.3888
8. Oldenburg CE, Lalitha P, Srinivasan M, et al. Emerging moxifloxacin resistance in pseudomonas aeruginosa keratitis isolates in South India. *Ophthalmic Epidemiol*. 2013. doi:10.3109/09286586.2013.790978
9. Haas W, Pillar CM, Torres M, Morris TW, Sahm DF. Monitoring antibiotic resistance in ocular microorganisms: Results from the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular micRorganisms (ARMOR) 2009 surveillance study. *Am J Ophthalmol*. 2011. doi:10.1016/j.ajo.2011.03.010
10. Srinivasan M, Mascarenhas J, Rajaraman R, et al. Corticosteroids for bacterial keratitis: The steroids for corneal ulcers trial (SCUT). *Arch Ophthalmol*. 2012. doi:10.1001/archophthalmol.2011.315
11. Srinivasan M, Mascarenhas J, Rajaraman R, et al. The steroids for corneal ulcers trial (SCUT): Secondary 12-month clinical outcomes of a randomized controlled trial. *Am J Ophthalmol*. 2014. doi:10.1016/j.ajo.2013.09.025
12. Henry CR, Flynn HW, Miller D, Forster RK, Alfonso EC. Infectious keratitis progressing to endophthalmitis: A 15-year study of microbiology, associated factors, and clinical outcomes. *Ophthalmology*. 2012. doi:10.1016/j.ophtha.2012.06.030
13. Jurkunas U, Behlau I, Colby K. Fungal keratitis: Changing pathogens and risk factors. *Cornea*. 2009. doi:10.1097/ICO.0b013e318191695b
14. Green M, Apel A, Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*. 2008. doi:10.1097/ICO.0b013e318156caf2
15. Sun JP, Chen WL, Huang JY, Hou YC, Wang IJ, Hu FR. Microbial Keratitis After Penetrating Keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2017. doi:10.1016/j.ajo.2017.03.022
16. Villarrubia A, Cano-Ortiz A. Candida keratitis after descemet stripping with automated

- endothelial keratoplasty. *Eur J Ophthalmol*. 2014. doi:10.5301/ejo.5000499
17. Jhanji V, Sharma N, Mannan R, Titiyal JS, Vajpayee RB. Management of tunnel fungal infection with voriconazole. *J Cataract Refract Surg*. 2007. doi:10.1016/j.jcers.2006.12.026
 18. Kredics L, Narendran V, Shobana CS, et al. Filamentous fungal infections of the cornea: A global overview of epidemiology and drug sensitivity. *Mycoses*. 2015. doi:10.1111/myc.12306
 19. Nielsen SE, Nielsen E, Julian HO, et al. Incidence and clinical characteristics of fungal keratitis in a Danish population from 2000 to 2013. *Acta Ophthalmol*. 2015. doi:10.1111/aos.12440
 20. Venkatesh Prajna N, Krishnan T, Mascarenhas J, et al. The mycotic ulcer treatment trial: A randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *JAMA Ophthalmol*. 2013. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.1497
 21. Sahay P, Singhal D, Nagpal R, et al. Pharmacologic therapy of mycotic keratitis. *Surv Ophthalmol*. 2019. doi:10.1016/j.survophthal.2019.02.007
 22. Bunya VY, Hammersmith KM, Rapuano CJ, Ayres BD, Cohen EJ. Topical and Oral Voriconazole in the Treatment of Fungal Keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2007. doi:10.1016/j.ajo.2006.07.033
 23. Prajna NV, Krishnan T, Rajaraman R, et al. Effect of oral voriconazole on fungal keratitis in the Mycotic Ulcer Treatment Trial II (MUTT II) a randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol*. 2016. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.4096
 24. Vemulakonda GA, Hariprasad SM, Mieler WF, Prince RA, Shah GK, Van Gelder RN. Aqueous and vitreous concentrations following topical administration of 1% voriconazole in humans. *Arch Ophthalmol*. 2008. doi:10.1001/archophthalmol.2007.8
 25. Hariprasad SM, Mieler WF, Holz ER, et al. Determination of Vitreous, Aqueous, and Plasma Concentration of Orally Administered Voriconazole in Humans. *Arch Ophthalmol*. 2004. doi:10.1001/archophth.122.1.42
 26. Prakash G, Sharma N, Goel M, Titiyal JS, Vajpayee RB. Evaluation of Intrastromal Injection of Voriconazole as a Therapeutic Adjunctive for the Management of Deep Recalcitrant Fungal Keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2008. doi:10.1016/j.ajo.2008.02.023
 27. Sharma N, Sankaran P, Agarwal T, et al. Evaluation of Intracameral Amphotericin B in the Management of Fungal Keratitis: Randomized Controlled Trial. *Ocul Immunol Inflamm*. 2016. doi:10.3109/09273948.2015.1057597
 28. Venkatesh Prajna N, Lalitha P, Rajaraman R, et al. Changing azole resistance: A secondary analysis of the MUTT I randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol*. 2016. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.0530
 29. Sun CQ, Prajna NV, Krishnan T, et al. Effect of pretreatment with antifungal agents on clinical outcomes in fungal keratitis. *Clin Exp Ophthalmol*. 2016. doi:10.1111/ceo.12794
 30. Sharma S, Kunimoto DY, Gopinathan U, Athmanathan S, Garg P, Rao GN. Evaluation of corneal scraping smear examination methods in the diagnosis of bacterial and fungal keratitis: A survey of eight years of laboratory experience. *Cornea*. 2002. doi:10.1097/00003226-200210000-00002
 31. Mahmoudi S, Masoomi A, Ahmadikia K, et al. Fungal keratitis: An overview of clinical and laboratory aspects. *Mycoses*. 2018;61(12):916-930. doi:10.1111/myc.12822
 32. Lietman TM, McLeod S, Acharya NR, Lietman TM, Rose-Nussbaumer J. The Utility of Repeat Culture in Fungal Corneal Ulcer Management: A Secondary Analysis of the MUTT-I Randomized Clinical Trial. *Am J Ophthalmol*. 2017. doi:10.1016/j.ajo.2017.03.032
 33. Mascarenhas J, Lalitha P, Prajna NV, et al. Acanthamoeba, fungal, and bacterial keratitis: A

- comparison of risk factors and clinical features. *Am J Ophthalmol.* 2014. doi:10.1016/j.ajo.2013.08.032
34. Szentmáry N, Daas L, Shi L, et al. Acanthamoeba keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *J Curr Ophthalmol.* 2019. doi:10.1016/j.joco.2018.09.008
 35. Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, Holland EJ. Confocal microscopy findings of Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol.* 1996. doi:10.1016/S0002-9394(14)70576-8
 36. Duguid IGM, Dart JKG, Morlet N, et al. Outcome of Acanthamoeba keratitis treated with polyhexamethyl biguanide and propamidine. *Ophthalmology.* 1997. doi:10.1016/S0161-6420(97)30092-X
 37. Sunada A, Kimura K, Nishi I, et al. In vitro evaluations of topical agents to treat Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology.* 2014. doi:10.1016/j.ophtha.2014.04.013
 38. Lim NCS, Lim DKA, Ray M. Polymicrobial versus monomicrobial keratitis: A retrospective comparative study. *Eye Contact Lens.* 2013. doi:10.1097/ICL.0b013e3182a3024e
 39. Ahn M, Yoon KC, Ryu SK, Cho NC, You IC. Clinical aspects and prognosis of mixed microbial (bacterial and fungal) keratitis. *Cornea.* 2011. doi:10.1097/ICO.0b013e3181f23704
 40. Reynolds MM, Greenwood-Quaintance KE, Patel R, Pulido JS. Selected Antimicrobial Activity of Topical Ophthalmic Anesthetics. *Transl Vis Sci Technol.* 2016. doi:10.1167/tvst.5.4.2
 41. McLeod SD, Kumar A, Cevallos V, Srinivasan M, Whitcher JP. Reliability of transport medium in the laboratory evaluation of corneal ulcers. *Am J Ophthalmol.* 2005. doi:10.1016/j.ajo.2005.06.042
 42. Alexandrakis G, Haimovici R, Miller D, Alfonso EC. Corneal biopsy in the management of progressive microbial keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2000. doi:10.1016/S0002-9394(99)00449-3
 43. Lim BX, Koh VTC, Ray M. Microbial characteristics of post-traumatic infective keratitis. *Eur J Ophthalmol.* 2018. doi:10.5301/ejo.5001009
 44. Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology.* 2017;124(11):1678-1689. doi:10.1016/j.ophtha.2017.05.012
 45. John T, Velotta E. Nontuberculous (atypical) mycobacterial keratitis after LASIK: Current status and clinical implications. *Cornea.* 2005. doi:10.1097/01.ico.0000151565.63107.64
 46. Solomon R, Donnenfeld ED, Azar DT, et al. Infectious keratitis after laser in situ keratomileusis: Results of an ASCRS survey. *J Cataract Refract Surg.* 2003. doi:10.1016/S0886-3350(03)00512-1
 47. Behaegel J, Ní Dhubhghaill S, Koppen C. Diagnostic Challenges in Nocardia Keratitis. *Eye Contact Lens.* 2018. doi:10.1097/ICL.0000000000000462
 48. Patel R, Sise A, Al-Mohtaseb Z, et al. Nocardia asteroides keratitis resistant to amikacin. *Cornea.* 2015. doi:10.1097/ICO.0000000000000634
 49. Patel NR, Reidy JJ, Gonzalez-Fernandez F. Nocardia keratitis after laser in situ keratomileusis: Clinicopathologic correlation. *J Cataract Refract Surg.* 2005. doi:10.1016/j.jcrs.2005.02.049
 50. Sueke H, Kaye S, Wilkinson MC, et al. Pharmacokinetics of meropenem for use in bacterial keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2015. doi:10.1167/iovs.15-17077
 51. Tavassoli S, Gunn D, Williams OM, Darcy K. The successful treatment of a multidrug-resistant Achromobacter xylosoxidans corneal ulcer with topical meropenem. *BMJ Case Rep.* 2018. doi:10.1136/bcr-2018-225163
 52. Chew FL, Soong T, Shin HC, Samsudin A, Visvaraja S. Topical Piperacillin/Tazobactam for



- Recalcitrant *Pseudomonas Aeruginosa* Keratitis . *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010. doi:10.1089/jop.2009.0077
53. Chatterjee S, Agrawal D. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* keratitis and its effective treatment with topical colistimethate. *Indian J Ophthalmol.* 2016. doi:10.4103/0301-4738.179721
54. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 2003. doi:10.1128/JCM.41.8.3623-3626.2003