Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Investigation of fungal keratitis using mycological and molecular methods

Mojgan Saghazadeh Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran **(Corresponding author).** saghazadeh_99@yahoo.com
Neda Shirinabadi MSc student, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. neda.sh60@yahoo.com

Abstract

Purpose: Fungal keratitis is a general term for a fungal disease of the cornea and can be caused by a wide variety of fungi. Keratitis is one of the causes of blindness worldwide. In this regard, the aim of the present research is to achieve an accurate and correct method in the diagnosis of fungal keratitis.

Materials and methods: From all patients with keratitis who referred to the Central Eye Bank of Iran from May 1394 to June 1395, in addition to direct examination and culture of a corneal chip sample, the diagnosis was first made by confocal scanning of the cornea, and the sensitivity and specificity of the diagnosis obtained from confocal scanning with Direct experiment and cultivation were compared. Then, using the colonyPCR method, PCR was performed from the colonies of Aspergillus and Fusarium fungi without DNA extraction, with the general primers of fungi (ITS1,4) and the specific primer of Aspergillus genus (ASPf1).

Findings: Out of 366 patients clinically suspected of having infectious keratitis, direct test and confocal scan results were positive in 17 patients and culture was positive in 13 cases. 47.06% of the patients were workers. Fusarium genus was the most isolated (47.06%). The rest included Aspergillus (17.65%), Microsporum (5.88%) and Penicillium (5.88%).

Conclusion: Since the delay in the treatment of fungal keratitis causes corneal opacity, reduced vision and absolute blindness, timely diagnosis and rapid treatment of fungal keratitis is necessary.

Keywords: fungal keratitis, mycological method, confocal microscopy, culture, PCR, cornea, eye diseases.

Received: 2023/09/20 ; **Revised:** 2023/09/11 ; **Accepted:** 2023/08/20 ; **Published online:** 2023/07/02
Cite: Saghazadeh. M. & Shirinabadi, N. (2023). Investigation of fungal keratitis using mycological and molecular methods. *Applied Biology*, 13(4), p. 69-80.
Article type: Research Article © the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

بررسی کراتیت قارچی با استفاده از روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی

مژگان سقازاده | استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران (**نویسنده مسئول**). saghazadeh_99@yahoo.com
ندا شیرین‌آبادی | دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. neda.sh60@yahoo.com

چکیده

هدف: کراتیت قارچی یک اصطلاح کلی برای یک بیماری قارچی قرنیه چشم است و می‌تواند توسط طیف گسترده‌ای از قارچ‌ها بوجود بیاید. کراتیت یکی از علل کوری در سراسر جهان محسوب می‌شود. در این راستا، هدف تحقیق حاضر دستیابی به یک روش دقیق و صحیح در تشخیص کراتیت قارچی می‌باشد.

روش: از همه بیماران مبتلا به کراتیت مراجعه‌کننده به بانک چشم مرکزی ایران از اردیبهشت ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵، علاوه‌بر آزمایش مستقیم و کشت از نمونه تراشه قرنیه، ابتدا تشخیص توسط اسکن کانفوکال قرنیه صورت گرفت و حساسیت و ویژگی تشخیص بدست آمده از اسکن کانفوکال با آزمایش مستقیم و کشت مقایسه گردید. سپس با استفاده از روش colonyPCR از کلنی‌های قارچ‌های آسپرژیلوس و فوزاریوم بدون استخراج DNA، PCR با پرایمرهای عمومی قارچ‌ها (ITS1,4) و پرایمر اختصاصی جنس آسپرژیلوس (ASPf1) انجام شد.

یافته‌ها: از ۳۶۶ بیمار مشکوک به کراتیت عفونی از نظر بالینی، نتایج آزمایش مستقیم و اسکن کانفوکال در ۱۷ بیمار مثبت و کشت در ۱۳ مورد مثبت گردید. ۴۷/۰۶ درصد از بیماران کارگر بودند. جنس فوزاریوم بیشترین مورد جدا شده بود (۴۷/۰۶٪). بقیه موارد شامل آسپرژیلوس (۱۷/۶۵٪)، میکروسپوروم (۵/۸۸٪) و پنی‌سیلیوم (۵/۸۸٪) بودند.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که تأخیر در درمان کراتیت قارچی سبب کدورت قرنیه، کاهش بینایی و کوری مطلق می‌شود، تشخیص به موقع و درمان سریع کراتیت قارچی ضروری است.

کلیدواژه‌ها: کراتیت قارچی، روش قارچ‌شناسی، میکروسکوپ کانفوکال، کشت، PCR، قرنیه، بیماری‌های چشمی.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۱ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۵/۲۹ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۶/۲۰ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۰۶/۲۹

استناد به این مقاله: سقازاده، مژگان؛ شیرین‌آبادی، ندا (۱۴۰۲). بررسی کراتیت قارچی با استفاده از روش‌های قارچ‌شناسی و مولکولی. *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۴)، ص۶۹-۸۰.

ناشر: دانشگاه قم
© نویسندگان
نوع مقاله: پژوهشی

۱. مقدمه

کراتیت قارچی متعاقب ضربه و با تلقیح عوامل قارچی به قرنیه ایجاد می‌شود. این بیماری معمولاً با التهاب شدید چشم، ایجاد زخم قرنیه با حضور هایف قارچ در استرومای قرنیه همراه است (۱۹). هم قارچ‌های رشته‌ای و هم مخمرها می‌توانند عامل ابتلای کراتیت قارچی باشند. بیشترین قارچ‌های جدا شده از عفونت‌های قرنیه، گونه‌های آسپرژیلوس و فوزاریوم از قارچ‌های رشته‌ای هستند. مهم‌ترین قارچ‌های مخمری مسبب کراتیت نیز گونه‌های کاندیدا به خصوص آلبیکنس می‌باشند (۱۶). از نظر کلینیکی، کراتیت قارچی با کراتیت‌های عفونی دیگر اشتباه می‌شود. از طرفی قارچ‌های مختلف پاسخ‌های درمانی متفاوتی دارند. پس، عدم تشخیص اولیه مناسب و مشکلات در جداسازی و شناسایی قارچ‌های مسبب و به دنبال آن عدم درمان موثر، هنوز به عنوان یک چالش عظیم در رابطه با این بیماری مطرح است؛ چراکه هرگونه تأخیر در درمان آن باعث کدورت قرنیه، کاهش بینایی و کوری مطلق می‌شود (۱۱). در حال حاضرآزمایش مستقیم و کشت از نمونه‌های تراشه قرنیه، ازجمله روش‌های رایج تشخیص می‌باشند و به عنوان استاندارد مرجع در تشخیص عامل کراتیت قارچی به حساب می‌آیند. در این میان آزمایش مستقیم دارای نرخ تشخیصی بالاتری نسبت به کشت است، ولی این روش تشخیصی نیاز به تکنسین‌های باتجربه دارد. کشت روی محیط‌های قارچ‌شناسی نیز از روش‌های مرسوم به حساب می‌آید، ولی نیاز به زمان طولانی حداقل ۵ تا ۱۰ روز دارد. با توجه به این‌که کراتیت قارچی بسیار سریع منتشر می‌شود و براحتی باعث سوراخ شدن قرنیه چشم می‌گردد، پس تشخیص درست و به موقع در اوایل بیماری برای درمان کراتیت قارچی مهم است.

میکروسکوپ کانفوکال نیز یك روش تشخیص غیرتهاجمی است که کل قرنیه را به سرعت و به صورت کیفی و کمّی بررسی می‌کند و سبب تشخیص فوری بیماری قرنیه در بافت زنده می‌شود (۲). هم‌اکنون کشت تراشه‌های قرنیه روش استاندارد شناسایی عامل اتیولوژیک کراتیت قارچی است که با کمک ویژگی‌های مورفولوژیک ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌ها صورت می‌گیرد (۱۱). از این روش در کنار آزمایش مستقیم تراشه‌های قرنیه به‌طور معمول استفاده می‌شود. به‌طور کلی، یافته‌های بالینی نمی‌تواند نوع عامل بیماری را مشخص کند، پس، به منظور کاهش عوارض چشمی بیماران، لازم است درمان به موقع را بر مبنای یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی آغاز کرد (۶).

اگرچه بیش از ۷۰ گونه قارچی به‌عنوان عوامل اتیولوژیک کراتومایکوزیس گزارش شده‌اند، اما جنس‌های فوزاریوم و آسپرژیلوس ازجمله شایع‌ترین آن‌ها بوده و در بیشتر مطالعات این دو جنس و یا

یکی از آن‌ها به‌عنوان عامل غالب بیماری معرفی شده‌اند. جنس کاندیدا نیز شایع‌ترین مخمر گزارش شده از موارد بیماری است (۱۳). با این وجود الگوی اپیدمیولوژیک کراتیت قارچی در مناطق مختلف جهان و حتی در بخش‌های مختلف یک کشور متفاوت است و افزون‌بر فاکتورهای آب و هوایی، وضعیت اقتصادی مردم و شغل غالب منطقه نیز می‌تواند تعیین‌کننده باشد، که در پژوهش تینگ و همکاران جهت تشخیص کراتیت‌های عفونی به روش‌های معمول میکروبی، روش‌های مولکولی و همچنین استفاده از میکروسکوپ کانفوکال، اشاره شده است (۱۷).

۲. مواد و روش‌ها

پس از تکمیل پرسشنامه توسط بیماران، شامل اطلاعات فردی (سن، جنس، شغل و میزان تحصیلات)، سابقه داشتن بیماری زمینه‌ای همچون دیابت، بیماری‌های نقص سیستم ایمنی، کورتون‌تراپی و یا استفاده از لنز و...، و معاینه مجدد بیماران توسط پزشک متخصص و تعیین ناحیه مبتلا روی قرنیه نیز انجام شد. سپس نمونه‌برداری از تراشه قرنیه توسط متخصص چشم انجام شد و آزمایش مستقیم برای تشخیص عناصر قارچی صورت گرفت. بدین منظور از محلول شفاف‌کننده پتاس ۱۰% برای تهیه لام مستقیم استفاده شد. سپس کشت نمونه‌های بالینی در محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (شرکت کولب، مونترال کانادا) انجام شد.

تراشه‌ها روی محیط ساخته شده کشت داده شد و در دمای ۲۵-۲۲ درجه برای مدت ۳ هفته نگهداری و به‌طور روزانه بررسی گردیدند. پس از ۳ روز پلیت‌ها براساس مشخصات ظاهر کلنی و ویژگی‌های میکروسکوپی مورد بررسی قرار داده شد. در صورت رشد کلنی قارچ، به روش تیزدمانت (روش خرد کردن) لام تهیه شد و دستگاه زایشی قارچ در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت. برای تهیه تیزدمانت از محلول لاکتوفنل کاتن بلو استفاده شد. علاوه‌بر روش کشت، در این مطالعه، واکنش PCR مستقیماً از کلنی قارچ و بدون استخراج DNA انجام گرفت.

٤ تا ٥ روز پس از کشت به وسیله سرمیکروپیپت، ۱ میلی‌متر مکعب از کلنی‌های فوزاریوم و آسپرژیلوس برداشته شد و در میکروتیوب‌های جداگانه ریخته شد و به عنوان نمونه DNA جهت colony PCR استفاده شد. واکنش colony PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق پس از سفارش، توسط شرکت سیناژن ساخته شد. پرایمر اختصاصی در این تحقیق، مربوط به ژن ASPf1 می‌باشد. ITS1,4 نیز پرایمر عمومی قارچ‌ها برای آسپرژیلوس و فوزاریوم است (جدول ۱).

جدول ۱ - توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
ASPf1	GTCGCAACCAAATAGGAA CTAAGGCATAATACCCAC	۶۵۸
ITS1,4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	۵۹۷

همان‌طور که گفته شد، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase، ۱۶/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر x 10، پرایمرهای رفت و برگشت، هر کدام در حجم ۱ میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر dNTP و ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ انجام شد. میکروتیوب‌های حاوی مخلوط PCR بعد از تهیه، در دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad) با برنامه موجود در جدول (۲) قرار داده شد.

جدول ۲ - پروتکل زمانی-دمایی PCR

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	مدت زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
دناتوره‌شدن اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
دناتوره شدن	۹۴	۶۰ ثانیه	۳۸
چسبیدن	۵۸	۴۵ ثانیه	
سنتز	۷۲	۶۰ ثانیه	
سنتز نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

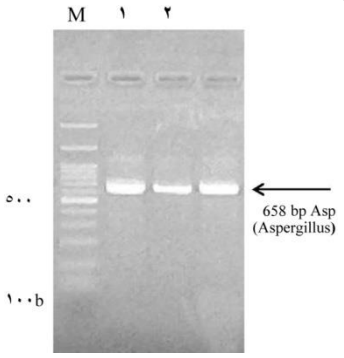
جهت مشاهده نتایج، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از بافر رنگ‌کننده مخلوط شده و با احتیاط به داخل چاهک ژل الکتروفورز (۱/۵ درصد) منتقل شد. در یکی از چاهک‌ها، ٤ میکرولیتر مارکر مولکولی استاندارد لود شد. الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و به مدت ٤٥ دقیقه انجام گردید. ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (10µg/ml) رنگ‌آمیزی شد. عکسبرداری از ژل به کمک ترانس الومیناتور UV انجام گردید.

۳. نتایج

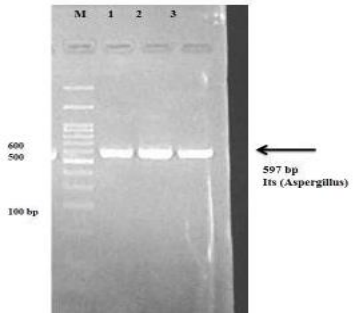
براساس نتایج کشت قارچی، از بین ۳٦٦ بیمار مشکوک به کراتیت عفونی از نظر بالینی، ۱۷ نفر(٤/٦٤ درصد) مبتلا به عفونت قارچی چشم بوده‌اند و ۳٤۹ نفر (۹۵/۳٦ درصد) به انواع دیگر کراتیت‌های عفونی مبتلا بودند. قارچ‌های جدا شده از کشت به ترتیب شامل فوزاریوم ۸ مورد (٤۷/۰٦ درصد)، آسپرژیلوس ۳ مورد (۱۷/٦۵ درصد)، میکروسپوروم ۱ مورد (۵/۸۸) و پنی‌سیلیوم ۱ مورد (۵/۸۸) می‌باشد. همچنین در ٤ مورد (۲۳/۵۳ درصد) نتیجه کشت منفی بود. در مطالعه

انجام گرفته، کلیه بیماران قبل از نمونه‌گیری و تهیه تراشه قرنیه، در مقابل میکروسکوپ کانفوکال قرار گرفتند که در ۱۷ مورد هایف‌های قارچی در زمینه دارك به خوبی قابل مشاهده بود و آزمایش مستقیم و کشت این افراد نیز کراتیت قارچی را نشان می‌داد.

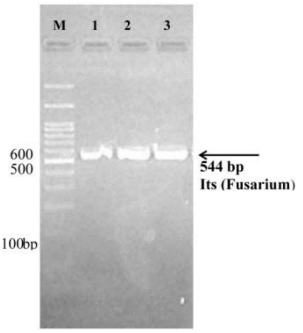
در PCR انجام شده در این تحقیق با پرایمر عمومی Its 1,4، فوزاریوم در باند (bp ٥٤٤) مشاهده و آسپرژیلوس در باند (bp ٥٩٧) مشاهده گردید و با پرایمر اختصاصی Aspf1، آسپرژیلوس در باند (bp ٦٥٨) مشاهده گردید. در این تحقیق برای هر ۳ بیماری که در آزمایش مستقیم و کشت، آسپرژیلوس فومیگاتوس تشخیص داده شده بود، و برای ۸ بیماری که تشخیص فوزاریوم داده شده بود، ٤ پلیت برای انجام colony PCR انتخاب شده که بعد از انجام PCR همگی تشکیل باند داده و این نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش در تشخیص قارچ‌ها است. نتایج حاصل از Colony PCR در DNA جنس آسپرژیلوس با پرایمر اختصاصی (ASPf) قارچ آسپرژیلوس و پرایمر عمومی قارچ‌ها (ITS1,4) مطابق تصاویر زیر می‌باشد.



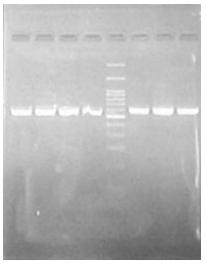
شکل ۱ – PCR آسپرژیلوس فومیگاتوس با پرایمر اختصاصی ASPf (658 bp) چاهک شماره ۱و۲و۳ نتایج حاصل از محصول PCR نمونه‌های ۱و۲و۳ نمونه بیماران است، چاهک M مارکر ۱۰۰bp است.



شکل ۲ – PCR آسپرژیلوس فومیگاتوس با پرایمر عمومی ITS1,4 (597 bp) چاهک شماره ۱و۲و۳ نتایج حاصل از محصول PCR نمونه‌های ۱و۲و۳ نمونه بیماران است، چاهک M مارکر ۱۰۰bp است.



شکل ۳ – ستون M: سایز مارکر (100bp) چاهک شماره ۱و۲و۳
نتایج حاصل از محصول، ستون ۱و۲و۳: PCR فوزاریوم با ITS1,4 PCR (544bp)
نمونه‌های ۱و۲و۳ نمونه بیماران است، چاهک M مارکر ۱۰۰bp است.



شکل ٤ – PCR با پرایمر ITS1,4، سمت چپ سایز مارکر فوزاریوم (544 bp)
و سمت راست آسپرژیلوس فومیگاتوس (597 bp)

با توجه به پراکندگی سنی بیماران، آنها برای توضیح بیشتر در بازه‌های سنّی طبقه‌بندی شدند، در نتیجه کراتیت قارچی در زیر ۱۰ سال وجود ندارد، کمترین سن ابتلا ١٤ سال و بیشترین سن ۸۵ سال می‌باشد و درصد ابتلا به کراتیت قارچی در سنین بین ۳۱ تا ۵۰ سال بیشترین میزان (۵۲/۹ درصد) است. از نظر شغلی، کارگران، زنان خانه‌دار و کشاورزان به ترتیب ٤٧/٠٦ درصد، ۲۳/۵۳ درصد و ۱۷/٦٥ درصد، بیشترین آلودگی قارچی را به خود اختصاص داده‌اند.

٤. نتیجه‌گیری

در این تحقیق با استفاده از قارچ‌های فوزاریوم و آسپرژیلوس مشخص گردید که colony PCR تستی دقیق و قابل اعتماد جهت شناسایی قارچ‌های مورد نظر می‌باشد. این نتایج منطبق با نتایج حاصل از پژوهش گاناسکاران و همکاران (۲۰۲۱) می‌باشد. گاناسکاران (۲۰۲۱) colony PCR را سریع‌ترین راه در مقایسه با PCR برای تکثیر مخمر گزارش دادند که این روش قابل اعتمادی برای تست‌های تشخیصی می‌باشد (۹). کراتیت‌های قارچی یکی از علل کوری در جهان است که به دنبال

آسیب به قرنیه و عوامل مستعدکننده به وسیله قارچ‌های فرصت‌طلب ایجاد می‌شوند (۱۵).

در تحقیقی که توسط بهرا و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد، از ۵۹ بیمار مشکوک به کراتیت قارچی، ۳۸ نفر (۶۴/۴۰%) با روش PCR مثبت بودند. ۴۰/۶۷ درصد نمونه‌ها با روش کشت، ۲۰/۳ درصد در گسترش مرطوب هیدروکسید پتاسیم و ۱۳/۵ درصد توسط رنگ‌آمیزی مثبت شدند که با PCR نیز مثبت بودند (۶). در مطالعه حاضر، نوع قارچ جدا شده در کشت به ترتیب شامل فوزاریوم ۸ مورد (٤٧/٠٦ درصد)، آسپرژیلوس ۳ مورد (١٧/٦٥ درصد)، میکروسپوروم ۱ مورد (٥/٨٨) و پنی‌سیلیوم ۱ مورد (٥/٨٨) می‌باشد. همچنین در ٤ مورد (٢٣/٥٣ درصد) نتیجه کشت منفی بود.

در یک کارآزمایی تصادفی ده ساله شامل ۲۰ بیمار که توسط انصاری و همکاران انجام شد، همه موارد مشکوک پس از ارزیابی با روش‌های میکروسکوپی، کشت و PCR نتایج مشابهی دربرداشتند (۵). در مطالعه حاضر در PCR انجام گرفته در این تحقیق با پرایمر عمومی Its 1,4، فوزاریوم در باند (٥٤٤ bp) و آسپرژیلوس در باند (٥٩٧ bp) مشاهده گردید و با پرایمر اختصاصی Aspf1، آسپرژیلوس در باند (٦٥٨ bp) مشاهده شد. در این تحقیق برای هر ۳ بیماری که در آزمایش مستقیم و کشت به آسپرژیلوس فومیگاتوس رسیده بودیم و همچنین از ۸ بیماری که تشخیص فوزاریوم داده بودند، ٤ پلیت برای انجام colony PCR انتخاب شده بود که بعد از انجام PCR همگی تشکیل باند داده بودند و این نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش در تشخیص قارچ‌ها است.

جعفری نسب و همکاران نیز در تحقیقی یک مورد گزارش از کراتیت ناشی از آسپرژیلوس فلاووس پیامد فوری DALK را در خانمی ۲۸ ساله گزارش کردند و ضمن پرداختن به خصوصیات کلینیکی، میکروبیولوژی و هیستوپاتولوژی و اسکن کانفوکال، با تشخیص سریع و درمان مناسب، بهبودی کامل را درپی داشت. در این بررسی بر اسکن کانفوکال به عنوان یک ابزار تشخیصی ارزشمند تاکید گردید (۸). در مطالعه حاضر تراشه قرنیه گرفته شده توسط پزشک، تحت آزمایش مستقیم با پتاس ۱۰% قرار گرفت. همچنین بقیه نمونه روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و نتایج حاصل از آزمایش مستقیم با کلنی‌های رشد کرده روی محیط SC با هم مقایسه گردید. آزمایش مستقیم در ۱۰۰% موارد قارچ رشته‌ای را نشان داد که کاملاً منطبق با تشخیصی بود که از میکروسکوپ کانفوکال گرفته شده بود. ولی در ٤ مورد (٢٣/٦ درصد) نتیجه کشت منفی بود و این در حالی بود که در آزمایش مستقیم و میکروسکوپ کانفوکال، نتیجه قارچ رشته‌ای یا همان فیلامنتوس بدست آمده بود.

البته مواردی هم بوده که برخلاف نتایج مطالعه حاضر، کشت روشی مطمئن معرفی شده است. امیری‌نیا در سال‌های ۹۱ و ۹۰ به مقایسه بین روش‌های مستقیم و کشت پرداخت. در این مطالعه از ۹۱ مورد کراتیت قارچی شناسایی شده، ٤ مورد (۰۱%) در آزمایش مستقیم و ۷ مورد (۱۷/۵%) در کشت مثبت بودند. البته در این تحقیق از روش nested PCR نیز استفاده شده بود که این روش نیز نتایج مثبت خوبی را داشت (۱). در مطالعه حاضر، افرادی دارای کشت مثبت بودند که شروع بیماری آنها تا زمان تشخیص، بیشتر از یك هفته بود. این بیماران از لحاظ تشخیص میکروسکوپی دارای عفونت قارچی شدید و در مرحله پیشرفته بیماری قرار داشتند. در حالی که سایر بیمارانی که دارای کشت منفی بودند، در مرحله آغازین بیماری قرار داشتند. کشت منفی در این بیماران را می‌توان با کم بودن حجم نمونه در تلقیح به محیط کشت، محدودیت این روش در بازپروری عناصر قارچی و وجود مرحله آغازین بیماری به دلیل کم بودن بار ارگانیسمی توجیه کرد. بنابراین، می‌توان گفت که راه تشخیصی قطعی بیماری، تهیه لام مستقیم بوده و علایم بالینی و کشت به تنهایی کمك‌کننده نیستند.

در مطالعه حاضر، از بین ۳٦٦ نفر که با تشخیص احتمالی کراتیت عفونی از اردیبهشت ۱۳۹٤ تا خرداد ۱۳۹۵ به بانک چشم مرکزی ایران مراجعه نموده‌اند، تنها ۱۷ نفر (٤/٦٤ درصد) مبتلا به کراتیت قارچی بوده‌اند. در مطالعه حاضر کارگران، زنان خانه‌دار و کشاورزان به ترتیب (٤۷/۰٦ درصد)، (۲۳/۵۳ درصد) و (۱۷/٦۵ درصد) بیشترین آلودگی قارچی چشمی را به خود اختصاص داده‌اند. در مطالعه بهرا و همکاران نیز ۸۰/۲۷ درصد بیماران ساکن مناطق روستایی و کشاورز بوده‌اند (۶).

در مطالعه انجام گرفته، کلیه بیماران قبل از نمونه‌گیری (تهیه تراشه قرنیه)، در مقابل میکروسکوپ کانفوکال قرار گرفتند که در ۱۷ مورد آنها هایف‌های قارچی در زمینه تاریک به خوبی قابل مشاهده بود و آزمایش مستقیم و کشت این افراد نیز کراتیت قارچی را نشان داد. در مطالعه رضایی کنوی و همکاران نیز به سودمندی روش تشخیص اسکن کانفوکال اشاره گردیده و حساسیت این روش ۹۳/۴% بیان شده است (۲).

کراتیت‌های قارچی را باید ازجمله بیماری‌های رو به افزایش دانست. در مطالعه حاضر تمامی هایف‌های رویشی قارچ‌های رشته جدا شده، شفاف بودند و هیچ مورد قارچ دماتیاسه (سیاه) از بیماران جدا نگردید. در حالی‌که در سایر مطالعات انجام شده، قارچ‌های سیاه نیز از مبتلایان به کراتیت قارچی جدا شده است (۷،۱۲).

در مطالعه فتی و همکاران نیز همین نتیجه به دست آمد (۳). در حالی‌که در سایر مطالعات انجام

شده، قارچ‌های سیاه نیز از مبتلایان به کراتیت قارچی جدا شده است. توماس (۲۰۰۳) نیز در هند علاوه‌بر اینکه فوزاریوم و آسپرژیلوس را جزو عوامل شایع کراتیت قارچی معرفی کرده است، قارچ سیاه کورووولاریا را نیز به عنوان یکی از عوامل یافت شده در بیماران گزارش نموده است (۱۸).

در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده در تحقیق و همچنین نتایج حاصل از سایر تحقیق‌ها، آزمایش مستقیم با پتاس، حساسیت بسیار بالایی را در هر دو مرحله آغازین و پیشرفته کراتیت قارچی و ارزش پیش‌گویی مثبت و منفی بالایی در تشخیص دارد (۱۴). با توجه به پژوهش‌های انجام شده در این حوزه، به خوبی می‌توان رشد چشمگیر موارد گزارش شده را در دهه اخیر مشاهده نمود. افزایش زمینه‌های مساعدکننده مانند بیماری‌های نقص ایمنی و دیابت، تغییر شرایط و رفتارها در زندگی روزمره مانند استفاده از لنزهای طبی و زیبایی، کثرت و سهولت اعمال جراحی و افزایش داوطلبین انجام برخی اعمال زیبایی چشم می‌تواند دلیل رشد بیماران مبتلا به کراتیت قارچی باشد (۴). لازم به ذکر است از آنجایی که روش کشت، ارگانیسم‌های زنده و زایا را مشخص می‌کند، معمولاً در قالب روشی استاندارد برای تشخیص عفونت‌های میکروبی ازجمله کراتیت قارچی و به عنوان روش ارجح مطرح می‌گردد. به‌علاوه، سرعت و دقت روش PCR در تعیین حضور ژن‌های میکروبی قابل توجه است؛ لیکن باید در نظر داشت حضور ژن‌های مربوطه را می‌توان از عوامل قارچی مرده نیز تایید کرد. بنابراین، به دلیل اهمیت تشخیص عفونت فعال بالینی، اولویت روش کشت بر PCR دارای اهمیت است (۶،۷).

References

1. Amirinia F, Shokohi T, Nowroozpoor Dailami K & Haghani I. Mycotic Keratitis: An Overview on Diagnosis and Treatment with a Focus on Epidemiology of the Disease in Iran. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2014; 24(119): 235-259. [in persian]
2. Rezaei Kanwi M, Jafarnejadi AA & Javadi MA. Diagnosis of two cases of acanthamoeba keratitis by confocal scanning and its successful treatment. *Bina*. 2013; 10(37): 118-123. [in persian]
3. Fata S, Derakhshan A, Bolourian AA, Sedaghat MR, Khakhshour H, Afzalaghee M, Meshkat M, Najafzadeh M & Fata A. Mycotic Keratitis, A Study on Etiologic Agents, Predisposing Factors and the Result of Treatment among 44 Patients. *Medical journal of mashhad university of medical sciences.* 2010; 53(1): 16-25.
   DOI: 10.22038/mjms.2010.5403[in persian]
4. Alshehri B & Palanisamy M. Evaluation of molecular identification of Aspergillus species causing fungal keratitis. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020; 27(2): 751-756.
5. Ansari Z, Miller D & Galor A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. *Curr Fung Infect Rep.* 2013; 7: 209-18.
6. Behera HS & Srigyan D. Evaluation of polymerase chain reaction over routine microbial diagnosis for the diagnosis of fungal keratitis. *Optometry and Vision Science*. 2021; 98(3): 280-284.
7. Brown L, Leck AK, Gichangi M, Burton MJ & Denning DW. The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2021; 21(3): e49-e57.
8. Jafarinasab MR, Feizi S, Yazdizadeh F, Rezaei Kanavi M & Moein HR. Aspergillus flavus keratitis after deep anterior lamellar keratoplasty. *J Ophthalmic Vis Res.* 2012; 7: 167-171.
9. Gunasekaran R, Janakiraman D, Rajapandian SGK, Appavu SP, Venkatesh PN & Prajna L. Periconia species-An unusual fungal pathogen causing mycotic keratitis. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2021; 39(1): 36-40.
10. Hoffman JJ, Burton MJ & Leck A. Mycotic keratitis—a global threat from the filamentous fungi. *Journal of Fungi*. 2021; 7(4): 273.
11. Hoffman JJ, Dart JK, De SK, Carnt N, Cleary G & Hau S. Comparison of culture, confocal microscopy and PCR in routine hospital use for microbial keratitis diagnosis. *Eye*. 2022; 36(11): 2172-2178.
12. Hung N, Yeh LK, Ma DHK, Lin HC, Tan HY & et al. Filamentous fungal keratitis in Taiwan: based on molecular diagnosis. *Translational Vision Science & Technology*. 2020; 9(8): 32-32.
13. Kuo MT, Chen JL, Hsu SL, Chen A & You HL. An omics approach to diagnosing or investigating fungal keratitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(15): 3631.
14. Mokhtar WA, Hemeda S & Mokhtar GA. Utility of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of paediatric fungal keratitis: A comparative study with conventional mycological work up. *Microbes & Infectious Diseases*. 2021; 2(1).

15. Ng JK, Fraunfelder FW & Winthrop KL. Review and update on the epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment of fungal keratitis. *Current Fungal Infection Reports*. 2013; 7: 293-300.
16. Raj N, Vanathi M, Ahmed NH, Gupta N, Lomi N & Tandon R. Recent perspectives in the management of fungal keratitis. *Journal of Fungi*. 2021; 7(11): 907.
17. Ting DS, Gopal BP, Deshmukh R, Seitzman GD, Said DG & Dua HS. Diagnostic armamentarium of infectious keratitis: A comprehensive review. *The Ocular Surface*. 2022; 23: 27-39.
18. Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 730-797.
19. Thomas PA & Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013; 19(3): 210-220.