بررسی کراتیت قارچی با استفاده از روشهای قارچ شناسی و مولکولی

چکیده

هدف: کراتیت قارچی یک اصطلاح کلی برای یک بیماری قارچی قرنیه چشم است و می تواند توسط طیف گسترده ای از قارچ ها بوجود بیاید. کراتیت یکی از علل کوری در سراسر جهان محسوب می شود. هدف از این تحقیق دستیابی به یک روش دقیق و صحیح در تشخیص کراتیت قارچی می باشد.

روش شناسی: در همه بیماران مبتلا به کراتیت مراجعه کننده به بانک چشم مرکزی ایران از اردیبهشت ۱۳۹٤ تا خرداد ۱۳۹۵، علاوه بر 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 کلنی های قارچ های آسپرژیلوس و فوزاریوم بدون استخراج DNA، PCR با پرایمرهای عمومی قارچ ها (ITS1,4) و پرایمر اختصاصی جنس آسپرژیلوس (ASPf1) انجام شد.

یافته ها: از ۳٦٦ 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. ٤۷/۰٦ درصد از بیماران کارگر بودند. جنس فوزاریوم بیشترین مورد جدا شده بود(٤۷/۰٦٪). بقیه موارد شامل آسپرژیلوس (۱۷/٦۵٪)، میکروسپوروم (۵/۸۸٪) و پنی سیلیوم (۵/۸۸٪) بودند.

نتیجه گیری: از آنجایی که تاخیر در درمان کراتیت قارچی سبب کدورت قرنیه، کاهش بینایی و کوری مطلق می شود تشخیص به موقع و درمان سریع کراتیت قارچی ضروری است.

کلیدواژه ها: کراتیت قارچی، میکروسکوپ کانفوکال، کشت، PCR

مقدمه

کراتیت قارچی متعاقب ضربه و با تلقیح عوامل قارچی به قرنیه ایجاد می شود. این بیماری معمولا با التهاب شدید چشم، ایجاد زخم قرنیه با حضور هایف قارچ در استرومای قرنیه همراه است (۱۹).

هر دو دسته قارچ های رشته ای و مخمری می توانند عامل ابتلا باشند که بیشترین قارچ های جدا شده از عفونت های قرنیه،گونه های آسپرژیلوس و فوزاریوم در قارچ های رشته ای و مهم ترین قارچ های مخمری مسبب کراتیت گونه های کاندیدا به خصوص آلبیکنس می باشند (١٦).

از نظر کلینیکی کراتیت قارچی با کراتیت های دیگر اشتباه می شود از طرفی قارچ های مختلف پاسخ های درمانی متفاوتی دارند پس عدم تشخیص اولیه مناسب و مشکلات در جداسازی و شناسایی قارچ های مسبب و به دنبال آن عدم درمان موثر هنوز به عنوان یک چالش عظیم در رابطه با این بیماری مطرح است. چرا که هر گونه تاخیر در درمان آن باعث کدورت قرنیه، کاهش بینایی و کوری مطلق می شود(۱۱). در حال حاضرآزمایش مستقیم و کشت از نمونه های تراشه قرنیه از روش های رایج تشخیص می باشند و به عنوان استاندارد مرجع در تشخیص عامل کراتیت قارچی به حساب می آید. از این بین آزمایش مستقیم دارای نرخ تشخیصی بالاتری نسبت به کشت می باشد ولی این روش تشخیصی نیاز به تکنسین های با تجربه دارد. کشت روی محیط های قارچ شناسی نیز از روش های مرسوم به حساب می آید ولی نیاز به زمان طولانی حداقل ۵ تا ۱۰ روز را دارد. با توجه به این که کراتیت قارچی بسیار سریع منتشر می شود و براحتی سبب سوراخ شدن قرنیه چشم می گردد پس تشخیص درست و به موقع در اوایل بیماری برای درمان کراتیت قارچی مهم است.

میکروسکوپ کانفوکال نیز یک روش تشخیص غیر تهاجمی است که کل قرنیه را به سرعت و به صورت کیفی و کمی بررسی می کند و سبب تشخیص فوری بیماری قرنیه در بافت زنده می شود (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 (٦).

اگرچه بیش از ۷۰ گونه‌ی قارچی به‌عنوان عوامل اتیولوژیک کراتومایکوزیس گزارش شده‌اند اما جنس‌های فوزاریوم و آسپرژیلوس از جمله 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 افزون بر فاکتورهای آب و هوایی، وضعیت اقتصادی مردم و شغل غالب منطقه نیز می‌تواند تعیین کننده باشد (۱۷).

مواد و روش کار

پس از تکمیل پرسشنامه توسط بیماران شامل اطلاعات فردی (سن، جنس، شغل و میزان تحصیلات) و همچنین سابقه داشتن بیماری زمینه ای همچون دیابت، بیماری های نقص سیستم ایمنی، کورتون تراپی و یا استفاده از لنز و...، معاینه مجدد بیماران توسط پزشک متخصص و تعیین ناحیه مبتلا روی قرنیه انجام شد. سپس نمونه برداری از تراشه قرنیه توسط متخصص چشم انجام شد و آزمایش مستقیم برای تشخیص عناصر قارچی صورت گرفت. بدین منظور محلول شفاف کننده پتاس ۱۰٪ برای تهیه لام مستقیم استفاده گردید.

سپس کشت نمونه های بالینی در محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (شرکت کولب، مونترال کانادا) انجام شد.

تراشه‌ها روی محیط ساخته شده کشت داده شدند و در دمای ۲۵-۲۲ درجه برای مدت ۳ هفته نگهداری و بطور روزانه بررسی گردید. پس از ۳ روز پلیت ها را براساس مشخصات ظاهر کلنی و ویژگی های میکروسکوپی مورد بررسی قرار داده شد. در صورت رشد کلنی قارچ، به روش تیزدمانت، لام تهیه شد و دستگاه زایشی قارچ در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت. برای تهیه تیزدمانت از محلول لاکتوفنل کاتن بلو استفاده شد.

علاوه بر روش کشت، در این مطالعه، واکنش PCRمستقیما از کلنی قارچ و بدون استخراج DNA انجام گرفت.

٤ تا ٥ روز پس از کشت به وسیله سرمیکروپیپت، ۱ میلی متر مکعب از کلنی های فوزاریوم و آسپرژیلوس برداشته شد و در میکرو تیوب های جداگانه ریخته شد و به عنوان نمونه DNA جهت colony PCR استفاده شد. واکنش colony PCR در میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتری با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق پس از سفارش توسط شرکت سیناژن ساخته شد. پرایمر اختصاصی واکنش مد نظر در تحقیق، پرایمر رفت و برگشت ASP می باشد (جدول شماره ۱) که در اینجا پرایمر اختصاصی قادر به شناسایی قطعه bp ٦٥٨ از ژن ASPf1 می باشد.

علاوه بر پرایمر اختصاصی یکبار هم با پرایمر عمومی قارچ ها، ITS1,4 ، برای آسپرژیلوس و فوزاریوم PCR انجام شد که توالی آن مطابق جدول شماره ۱ می باشد.

جدول ۱ – توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
ASPf1	GTCGCAACCAAATAGGAA CTAAGGCATAATACCCAC	٦٥٨
ITS1,4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	٥٩٧

همانطور که گفته شد، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase ، ١٦/٥ 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.

میکروتیوب های حاوی مخلوط PCR بعد از تهیه، در دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad) با برنامه موجود در جدول شماره ۲ قرار داده شد.

جدول ۲ - پروتکل زمانی-دمایی PCR

			تعداد سیکل
	۹۵	۵ دقیقه	۱
دناتوره شدن	۹٤	٦۰ ثانیه	
	۵۸	٤۵ ثانیه	۳۸
	۷۲	٦۰ ثانیه	
سنتز نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جهت مشاهده نتایج،۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از بافر رنگ کننده مخلوط کرده و با احتیاط به داخل چاهک ژل الکتروفورز (۱/۵ درصد) منتقل شد. همچنین ٤ میکرولیتر مارکر مولکولی استاندارد در چاهک اول ژل ریخته شد. ولتاژ روی ۸۰ ولت تنظیم گردید و به مدت ٤۵ دقیقه الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (10µg/ml) قرار داده شد تا محصولات PCR تکثیر شده، رنگ شود. ژل روی صفحه ترانس الومیناتور UV قرار داده شد و عمل عکسبرداری از ژل انجام گردید.

نتایج

بر اساس نتایج کشت قارچی، از بین ۳٦٦ بیمار مشکوک به کراتیت عفونی از نظر بالینی، ۱۷ نفر(٤/٦٤ درصد) مبتلا به کراتیت قارچی بوده‌اند و ۳٤۹ نفر(۹۵/۳٦ درصد) به انواع دیگر کراتیت های عفونی مبتلا بودند. نوع قارچ جدا شده در 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) می باشد. همچنین در ٤ مورد (۲۳/۵۳ درصد) نتیجه کشت منفی بود.

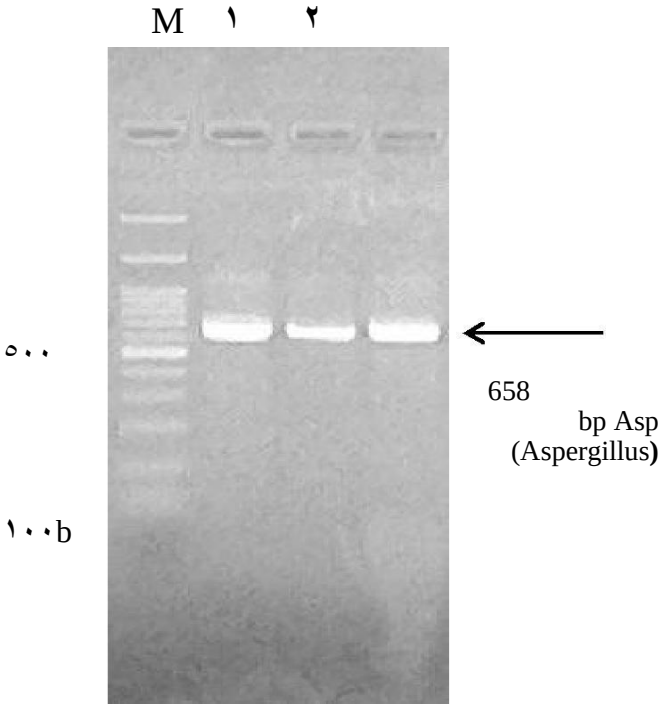
در مطالعه انجام گرفته کلیه بیماران قبل از نمونه گیری و تهیه تراشه قرنیه، در مقابل میکروسکوپ کانفوکال قرار گرفتند که در ۱۷ مورد آنها هایف های قارچی در زمینه دارک به خوبی قابل مشاهده بود

و آزمایش مستقیم و کشت این افراد نیز کراتیت قارچی را نشان می داد.

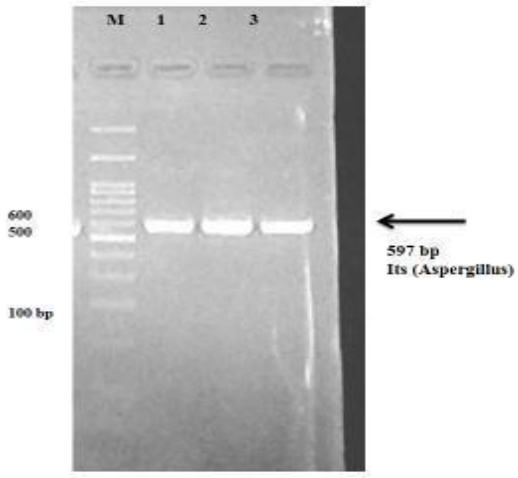
در PCR انجام شده در این تحقیق با پرایمر عمومی Its 1,4، فوزاریوم در باند (bp ٥٤٤) مشاهده و آسپرژیلوس در باند (bp ٥٩٧) مشاهده گردید و با پرایمر اختصاصی Aspf1 ، آسپرژیلوس در باند (bp ٦٥٨) مشاهده گردید.

در این تحقیق برای هر ۳ بیماری که در آزمایش مستقیم و کشت به آسپرژیلوس فومیگاتوس رسیده بودیم و همچنین از ۸ بیماری که تشخیص فوزاریوم را داده بودیم ٤ پلیت برای انجام colony PCR انتخاب شده بود که بعد از انجام PCR همگی تشکیل باند داده بودند و این نشان دهنده حساسیت بالای این روش در تشخیص قارچ ها می باشد.

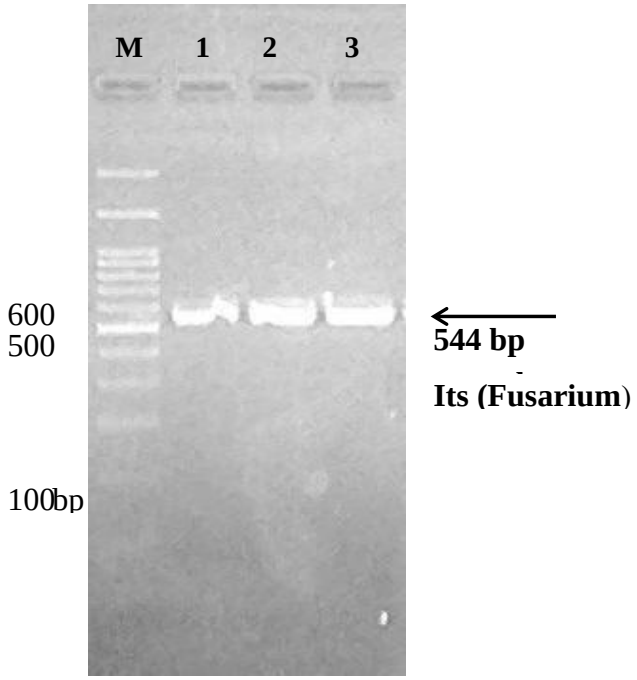
نتایج حاصل از Colony PCR در DNA جنس آسپرژیلوس با پرایمر اختصاصی (ASPf) قارچ آسپرژیلوس و پرایمر عمومی قارچ ها (ITS1,4) مطابق تصاویر زیر می باشد.



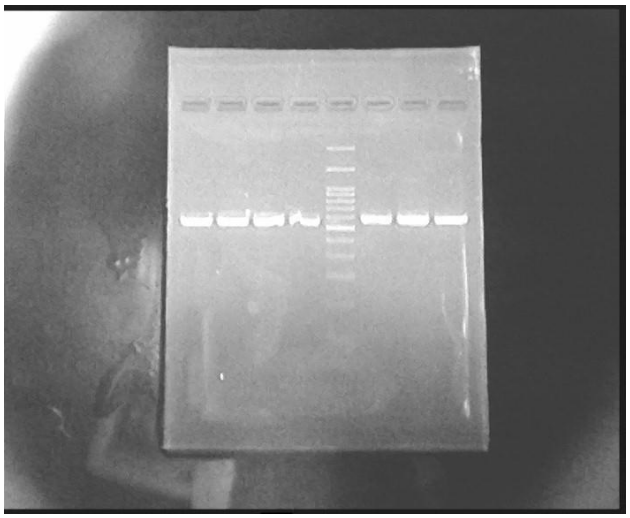
شکل ۱ – PCR آسپرژیلوس فومیگاتوس با پرایمر اختصاصی ASPf (658 bp). چاهک شماره ۱و۲و۳ نتایج حاصل از محصول PCR نمونه های ۱و۲و۳ نمونه بیماران است، چاهک M مارکر ۱۰۰bp است.



شکل ۲ – PCR آسپرژیلوس فومیگاتوس با پرایمرعمومی ITS1,4 (597 bp). **چاهک شماره ۱و۲و۳ نتایج حاصل از محصول** PCR **نمونه های ۱و۲و۳ نمونه بیماران است، جاهک** M **مارکر** bp۱۰۰ **است.**



شکل ۳ – ستون M: سایز مارکر (100bp) چاهک شماره ۱و۲و۳ نتایج حاصل از محصول، ستون ۱و۲و۳ : PCR فوزاریوم با ITS1,4 PCR (544bp) نمونه های ۱و۲و۳ نمونه بیماران است، جاهک 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 را برای توضیح بیشتر در بازه های سنی طبقه بندی نمودیم، در نتیجه کراتیت قارچی در زیر ۱۰ سال وجود ندارد، کمترین سن ابتلا ١٤ سال و بیشترین سن ۸۵ سال می باشد و درصد ابتلا به کراتیت قارچی در سنین بین ۳۱ تا ۵۰ سال بیشترین میزان (۵۲/۹ درصد) می باشد. در بین گروه های شغلی کارگران، زنان خانه دار و کشاورزان به ترتیب (٤٧/٠٦ درصد)، (۲۳/۵۳ درصد) و (١٧/٦٥ درصد) بیشترین آلودگی قارچی را به خود اختصاص داده اند.

بحث

در این تحقیق با استفاده از قارچ های فوزاریوم و آسپرژیلوس مشخص گردید که colony PCR تستی دقیق و قابل اعتماد جهت شناسایی قارچ های مورد نظر می باشد. این نتایج منطبق با نتایج حاصل از گاناسکاران و همکاران در سال ۲۰۲۱ می باشد. گاناسکاران در سال ۲۰۲۱ colony PCR را سریع ترین راه در مقایسه با PCR برای تکثیر مخمر گزارش داد و اعلام کرد که این روش قابل اعتمادی برای تست های تشخیصی می‌باشد (۹).

کراتیت های قارچی یکی از علل کوری در جهان است که به دنبال آسیب به قرنیه و عوامل مستعد کننده به وسیله قارچهای فرصت طلب ایجاد می شوند(۱۵).

در تحقیقی که توسط بهرا و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد، از ۵۹ بیمار مشکوک به کراتیت قارچی، ۳۸ نفر (٦٤.٤٠٪) با روش PCR مثبت بودند. ٤٠/٦٧ درصد نمونه ها با روش کشت، ۲۰/۳ درصد در گسترش مرطوب هیدروکسید پتاسیم و ۱۳/۵ درصد توسط رنگ آمیزی مثبت شدند که با PCR نیز مثبت بودند(٦). 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 (۵/۸۸) و پنی‌سیلیوم ۱ مورد (۵/۸۸) می باشد. همچنین در ٤ مورد (۲۳/۵۳ درصد) نتیجه کشت منفی بود.

در یک کار آزمایی 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 در بر داشتند (۵). در مطالعه ما در PCR انجام گرفته در این تحقیق با پرایمر عمومی Its 1,4، فوزاریوم در باند (٥٤٤ bp) مشاهده و آسپرژیلوس در باند (۵۹۷ bp) 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 به آسپرژیلوس فومیگاتوس رسیده بودیم و همچنین از ۸ بیماری که تشخیص فوزاریوم را داده بودیم ٤ پلیت برای انجام colony PCR انتخاب شده بود که بعد از انجام PCR همگی تشکیل باند داده بودند و این نشان دهنده حساسیت بالای این روش در تشخیص قارچ ها می باشد.

جعفری نسب و همکاران یک مورد گزارش از کراتیت ناشی از آسپرژیلوس فلاووس پیامد فوری DALK را در خانمی ۲۸ ساله گزارش کرد و ضمن پرداختن به خصوصیات کلینیکی، میکروبیولوژی و هیستوپاتولوژی و اسکن کانفوکال که با تشخیص سریع و درمان مناسب بهبودی کامل را در پی داشته است. در این بررسی بر اسکن کانفوکال به عنوان یک ابزار تشخیصی ارزشمند تاکید گردید(۸). در مطالعه ما 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 کلنی های رشد کرده روی محیط SC با هم مقایسه گردید. آزمایش مستقیم در ۱۰۰٪ موارد قارچ رشته ای را نشان می داد که کاملا منطبق با تشخیصی بود که از میکروسکوپ کانفوکال گرفته بودیم. ولی در ٤ مورد (۲۳/٦ درصد) نتیجه کشت منفی بود و این در حالی بود که در آزمایش مستقیم و میکروسکوپ کانفوکال ما به نتیجه قارچ رشته ای یا همان فیلامنتوس دست یافته بودیم.

البته مواردی هم بوده که برخلاف نتایج مطالعه ما کشت روشی مطمئن محسوب شده است. امیری نیا در سالهای ۹۱ و ۹۰ به مقایسه بین روش های 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 یک هفته بود. این بیماران از لحاظ تشخیص میکروسکوپی دارای عفونت قارچی شدید و در مرحله پیشرفته بیماری قرار داشتند. در حالی که بقیه بیمارانی که دارای کشت منفی بودند، در مرحله آغازین بیماری قرار داشتند. کشت منفی در این بیماران را می توان 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 می توان گفت که راه تشخیصی قطعی بیماری، تهیه لام مستقیم می باشد و علایم بالینی و کشت به تنهایی کمک کننده 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 نموده اند تنها ۱۷ نفر (٤/٦٤ درصد) مبتلا به کراتیت قارچی بوده اند و در بین گروه های شغلی کارگران و زنان خانه دار و کشاورزان بیشترین آلودگی قارچی را به خود اختصاص داده اند در مطالعه بهرا و همکاران نیز ۸۰/۲۷ درصد بیماران ساکن مناطق روستایی و کشاورز بوده اند (٦).

در مطالعه انجام گرفته کلیه بیماران قبل از نمونه گیری و تهیه تراشه قرنیه، در مقابل میکروسکوپ کانفوکال قرار گرفتند که در ۱۷ مورد آنها هایف های قارچی در زمینه دارک به خوبی قابل مشاهده بود و آزمایش مستقیم و کشت این افراد نیز کراتیت قارچی را نشان می داد. در مطالعه رضایی کنوی و همکاران نیز به سودمندی روش تشخیص اسکن کانفوکال اشاره گردیده است و حساسیت این روش ۹۳/٤ ٪ بیان شده است (۲).

میسلیوم در تمامی قارچ های جدا شده دراین مطالعه از نوع شفاف می باشند و هیچ مورد قارچ دماتیاسه(سیاه) از بیماران جدا نگردید. در مطالعه فتی و همکارانش نیز همین نتیجه به دست آمد(۳). در حالیکه در سایر مطالعات انجام شده، قارچ های سیاه نیز از مبتلایان به کراتیت قارچی جدا شده است. توماس نیزدر سال ۲۰۰۳ درهند علاوه بر 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 بیمارانش گزارش نموده است(۱۸).

مجموعا با توجه به نتایج بدست آمده در تحقیق و همچنین نتایج حاصل از سایر تحقیق ها آزمایش مستقیم با پتاس حساسیت بسیار بالایی را در هر دو مرحله آغازین و پیشرفته کراتیت قارچی دارا می باشد و ارزش پیش گویی مثبت و منفی بالایی در تشخیص دارند (١٤).

در مقالاتی که در این مورد نوشته شده است به خوبی می توان رشد چشمگیر موارد گزارش شده را در دهه اخیر مشاهده نمود. افزایش زمینه های مساعد کننده مانند بیماریهای نقص ایمنی و دیابت، تغییر

شرایط و رفتارها در زندگی روزمره مانند استفاده از لنز های طبی و زیبایی، کثرت و سهولت اعمال جراحی و افزایش داوطلبین انجام برخی اعمال زیبایی چشم می تواند دلیل رشد بیماران مبتلا به کراتیت قارچی باشد (٤).

لازم به ذکر است از آنجایی که روش کشت، ارگانیسمهای زنده و زایا را مشخص می کند، معمولا در قالب روشی استاندارد برای تشخیص عفونتهای میکروبی از جمله کراتیت قارچی و به عنوان روش ارجح مطرح می گردد. به علاوه سرعت و دقت روش PCR در تعیین حضور ژنهای میکروبی قابل توجه است لیکن باید در نظر داشت حضور ژنهای مربوطه را می توان از عوامل قارچی مرده نیز تایید کرد. بنابراین به دلیل اهمیت تشخیص عفونت فعال بالینی، اولویت روش کشت بر PCR قابل اهمیت می باشد (٦،٧).

منابع

١) امیری نیا فاطمه، شکوهی طاهره، نوروزپوردیلمی کیومرث، حقانی ایمان.١٣٩٣. مروری بر کراتیت قارچی، تشخیص، درمان با تاکید بر اپیدمیولوژی بیماری در ایران. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ١١٩ :٢٣٥-٢٥٩.

٢) رضایی کنوی مژگان،جعفرنژادی عباس علی،جوادی محمد علی.١٣٨٣.تشخیص دو مورد کراتیت آکانتاموبایی با اسکن کانفوکال و درمان موفق آن.مجله چشم پزشکی بینا،١٠: ١١٨-١٢٣.

٣) فتی سارا،درخشان اکبر،بلوریان علی اکبر،صداقت محمدرضا،خاکشور حمید،افضل آقائی منور،مشکات مجتبی.١٣٨٨.کراتیت های قارچی ،عوامل ، زمینه های مستعد کننده و نتایج پاسخ به درمان .مجله دانشکده دانشگاه علوم پزشکی مشهد،١: ١٦-٢٥.

4) Alshehri, B., & Palanisamy, M. (2020). Evaluation of molecular identification of Aspergillus species causing fungal keratitis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *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, H. S., & Srigyan, D. (2021). Evaluation of polymerase chain reaction over routine microbial diagnosis for the diagnosis of fungal keratitis. *Optometry and Vision Science*, *98*(3), 280-284.

7) Brown, L., Leck, A. K., Gichangi, M., Burton, M. J., & Denning, D. W. (2021). The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. *The Lancet Infectious Diseases*, *21*(3), e49-e57.

8) Jafarinasab MR, Feizi S, Yazdizadeh F, Rezaei Kanavi M, Moein HR.2012. Aspergillus flavus keratitis after deep anterior lamellar keratoplasty. J Ophthalmic Vis Res ,7: 167-171.

9) Gunasekaran, R., Janakiraman, D., Rajapandian, S. G. K., Appavu, S. P., Venkatesh, P. N., & Prajna, L. (2021). Periconia species-An unusual fungal pathogen causing mycotic keratitis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *39*(1), 36-40.

10) Hoffman, J. J., Burton, M. J., & Leck, A. (2021). Mycotic keratitis—a global threat from the filamentous fungi. *Journal of Fungi*, *7*(4), 273.

11) Hoffman, J. J., Dart, J. K., De, S. K., Carnt, N., Cleary, G., & Hau, S. (2022). Comparison of culture, confocal microscopy and PCR in routine hospital use for microbial keratitis diagnosis. *Eye*, *36*(11), 2172-2178.

12) Hung, N., Yeh, L. K., Ma, D. H. K., Lin, H. C., Tan, H. Y., Chen, H. C., ... & Hsiao, C. H. (2020). Filamentous fungal keratitis in Taiwan: based on molecular diagnosis. *Translational Vision Science & Technology*, *9*(8), 32-32.

13) Kuo, M. T., Chen, J. L., Hsu, S. L., Chen, A., & You, H. L. (2019). An omics approach to diagnosing or investigating fungal keratitis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(15), 3631.

14) Mokhtar, W. A., Hemeda, S., & Mokhtar, G. A. (2021). Utility of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of paediatric fungal keratitis: A comparative study with conventional mycological work up. *Microbes & Infectious Diseases*, *2*(1).

15) Ng, J. K., Fraunfelder, F. W., & Winthrop, K. L. (2013). Review and update on the epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment of fungal keratitis. *Current Fungal Infection Reports, 7*, 293-300.

16) Raj, N., Vanathi, M., Ahmed, N. H., Gupta, N., Lomi, N., & Tandon, R. (2021). Recent perspectives in the management of fungal keratitis. *Journal of Fungi*, *7*(11), 907.

17) Ting, D. S., Gopal, B. P., Deshmukh, R., Seitzman, G. D., Said, D. G., & Dua, H. S. (2022). Diagnostic armamentarium of infectious keratitis: A comprehensive review. *The Ocular Surface, 23*, 27-39.

18) Thomas PA.2003. Current perspectives on ophthalmic mycoses. Clin Microbiol Rev, 16: 730-797.

19) Thomas, P. A., & Kaliamurthy, J. (2013). Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(3), 210-220.

Investigating fungal keratitis using mycological and molecular methods

Abstract

Background: 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. The aim of this research is to achieve an accurate and correct method in the diagnosis of fungal keratitis.

Methods: In all patients with keratitis 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 was compared with direct examination and culture. Then, using the colonyPCR method from the colonies of Aspergillus and Fusarium fungi without DNA extraction, PCR was performed with the general primers of fungi (ITS1,4) and the specific primer of Aspergillus genus (ASPf1).

Results: 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 patients were workers. Fusarium was the most isolated species (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 quick treatment of fungal keratitis is necessary.

Keywords: fungal keratitis, confocal microscopy, culture, PCR