

## Identification of Fungal Species in Corneal Ulcers Samples Referring to Mycology Laboratory

Najibeh Asl Rahnamaei Akbari<sup>1\*</sup>, Asghar Salehpour Ranjdoust Fam<sup>1</sup>, Mehranghiz Rajaii Oskuii<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology & Mycology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Department of Immunology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 2 Dec, 2013      Accepted: 6 Mar, 2014

### Abstract

**Background and Objectives:** Fungal keratitis is known as an important underlying cause for ocular morbidity. Microbial keratitis is responsible for up to 30% of the prevalence of blindness in less developed societies. The aim of this study was to determine the fungal species in corneal scraping specimens that have been prepared from patient's suspected corneal fungal infection and have been sent to Mycology Laboratory in Faculty of Medicine in Tabriz.

**Materials & Methods:** In a cross-sectional study, 30 specimens of corneal scraping of patients, suspected with corneal fungal infection were collected. The specimens were examined by using KOH 10% and were cultured in Sabouraud Dextrose Agar (S) and Mycosel Agar without actidioun. Positive yeast samples were identified using the API32C kits, produce germ tube and chlamydoconidia. Morphology of colony, microscopic examination, and slid culture of species were used for identification of mold fungi.

**Results:** Men had infectious more than women (ratio: 2/1) in our study. 12 (40%) cases were positive in direct examination and 9 (30%) cases were positive in two both direct and culture methods. Fusarium, Aspergillus, Candida albicans and Curvularia were isolated from corneal ulcers specimens.

**Conclusion:** Fungal keratitis remains a diagnostic and therapeutic challenge to the ophthalmologist. Direct examination, by using KOH can be a most important, simple and sensitive test for diagnosis. In this study direct examination with KOH was 10% positive results than culture method. Fusarium and Aspergillus were common isolates in corneal ulcers specimens.

**Keywords:** Fungal Keratitis, Corneal Ulcer, Fungal Species, Diagnosis

\*Corresponding author:

**E-mail:** Nagibeh\_a@yahoo.com

## مقاله پژوهشی

# تعیین گونه های مختلف قارچی در نمونه های زخم قرنیه ارسالی به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده پزشکی تبریز

نجیبه اصل رهنمای اکبری<sup>۱</sup>، اصغر صالحپور رنج دوست فام<sup>۱</sup>، مهرانگیز رجایی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۲</sup>گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۲/۹/۱۱ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۵

## چکیده

**زمینه و اهداف:** کراتیت های قارچی یکی از مهمترین بیماری های چشمی هستند. در جوامع توسعه نیافته ۳۰٪ کوری های چشم را کراتیت های میکروبیال تشکیل می دهد. مطالعه حاضر بررسی گونه های قارچی در نمونه های زخم قرنیه است که از بیماران مشکوک به عفونت قارچی چشم تهیه و به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده پزشکی تبریز ارسال گردیده است.

**مواد و روش ها:** این بررسی یک مقطعی-توصیفی بوده و بر روی تعداد ۳۰ نمونه زخم قرنیه که از بیماران مشکوک به عفونت قارچی قرنیه چشم تهیه و به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده پزشکی تبریز ارسال شده بود، در طی دو سال انجام گرفته است. آزمایش مستقیم نمونه ها با استفاده از هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪ (KOH 10%) بعمل آمد و آزمایش کشت در محیط های سابرو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) و مایکوزیل آگار فاقد اکتیدینون (Mycosel Agar without actidioun SC) انجام گرفت. موارد مثبت مخمری توسط کیت API32C، ایجاد ژرم تیوب و کلامیدوکونیدی تعیین هویت شدند و مورفولوژی کلنی، بررسی میکروسکوپی، کشت روی لام (اسلاید کالچر) برای تعیین گونه های قارچ های رشته ای بکار گرفته شد.

**یافته ها:** در این مطالعه مردان بیش از دو برابر زنان مبتلا به عفونت های چشمی قارچی بودند. ۱۲ نمونه (۴۰ درصد) از نظر وجود قارچ در دید مستقیم و ۹ نمونه (۳۰ درصد) در کشت از نظر قارچ مثبت بود. گونه های فوزاریوم (*Fusarium*)، اسپرژیلوس (*Aspergillus*)، کاندیدا آلیکانس (*Candida albicans*) و کورولاریا (*Curvularia*) بترتیب بیشترین ارگانیزم های جدا شده از نمونه های زخم قرنیه ارسالی بودند.

**بحث:** تشخیص و درمان کراتیت های قارچی، هنوز هم مورد بحث و اختلاف نظر بین متخصصین چشم پزشکی است. آزمایش مستقیم با استفاده از هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪ می تواند یک روش بسیار مهم، ساده و تست حساس برای تشخیص کراتیت های قارچی باشد. در مطالعه حاضر، نیز آزمایش مستقیم بیشتر از روش کشت مثبت بوده و فوزاریوم (*Fusarium*) و اسپرژیلوس (*Aspergillus*) بیشتر از سایر گونه های قارچی از نمونه های زخم قرنیه جدا گردید.

**کلیدواژه ها:** کراتیت های قارچی، زخم قرنیه، گونه های قارچی، تشخیص

\* ایمیل نویسنده رابط: Nagibeh\_a@yahoo.com

## مقدمه

کورتیکواستروئیدهای موضعی، بالا رفتن شمار بیماران ایمنوساپرسیو، تکنیک های تشخیصی آزمایشگاهی بهتر برای شناسایی بیماری، استفاده از لنزهای تماسی در جوامع پیشرفته و جراحی های پیوند قرنیه در این امر مؤثر باشند (۱-۸). شیوع کراتیت های قارچی بسته به مناطق جغرافیایی فرق می کند. در آب و هوای گرمسیری استوایی و نیمه گرمسیری ۶۰-۵۰ درصد باکتریها و ۵۰-۳۵ درصد قارچها کراتیتها را ایجاد می کنند. بر طبق

کراتیت های قارچی یکی از مهمترین عارضه های بیماری های چشمی هستند. بعد از کاتاراکت، عفونت قرنیه دومین علت شایع کوری در کشورهای توسعه یافته است و در جوامع توسعه نیافته ۳۰ درصد کوری های چشم را کراتیت های میکروبی و قارچی تشکیل می دهد. هر چند در گذشته، کراتیت های قارچی بیماری کمیاب به حساب می آمد ولی در ۳۰ سال اخیر افزایش شیوع آن کاملاً آشکار است که شاید عواملی چون استفاده از آنتی بیوتیکها،

نمونه های زخم بطور مستقیم	تعداد	درصد
مثبت	۱۲	۴۰
منفی	۱۸	۶۰
جمع	۳۰	۱۰۰

نمونه زخم قرنیه	تعداد	درصد
مثبت	۹	۳۰
منفی	۲۱	۷۰
جمع	۳۰	۱۰۰

گونه های جدا شده	تعداد	درصد
فوزاریوم (Fusarium)	۴	۴۴/۴
آسپرژیلوس (Aspergillus)	۳	۳۳/۴
کاندیدا (Candida)	۱	۱۱/۱
کورولاریا (Curvularia)	۱	۱۱/۱
جمع	۹	۱۰۰

## بحث

تشخیص و درمان کراتیتهای قارچی بعلت مشکلاتی که در تشخیص آزمایشگاهی، جدا کردن قارچ عامل کراتیت و تشخیص کلینیکی آن وجود دارد، هنوز مورد بحث و کشمکش متخصصین چشم پزشکی است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸). مطالعاتی که طی ده سال در کشورهای هندوستان و شمال نیجریه انجام یافته است، نشان می-دهند ۵۰-۶۰ درصد مردان و ۴۰-۴۵ درصد زنان به عفونتهای قرنیه مبتلا می شوند (۲ و ۱۱ و ۱۲). در ایران نیز در بررسیهای انجام یافته در این زمینه تعداد مردان بیشتر از زنان بوده است (۱ و ۱۳). در مطالعه حاضر نمونه های زخم قرنیه ارسالی مربوط به مردان بیشتر از زنان بود. نمونه های تراشیده شده از زخم قرنیه در اغلب آزمایشگاههای روتین بطور مستقیم با تهیه اسمیر هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد مورد بررسی قرار می گیرد که یک روش بسیار مهم، ساده و حساس برای تشخیص سریع عفونتهای قارچی قرنیه محسوب می گردد (۱۴-۱۵). در سالهای اخیر روشهای جدید مولکولار نظیر PCR و دیگر تستهای جدید مولکولی با حساسیت و ویژگی بالا می توانند در مدت زمان کوتاه قارچها را بطور مستقیم در نمونه های بالینی ردیابی نمایند و حتی این روشها در بسیاری از مقالات بعنوان روش استاندارد طلایی نام برده می شوند (۱۶-۱۷). ولی از آنجایی که روشهای مولکولی گران هستند و در اغلب آزمایشگاههای روتین امکانات لازم وجود ندارد، روشهای بررسی مستقیم با هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد و کشت بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند و حتی آزمایش مستقیم را ترجیح می دهند. در این مطالعه نیز حدود ۱۰ درصد آزمایش مستقیم که با هیدروکسید پتاسیم تهیه شده بود بیشتر از کشت نتیجه مثبت داشت. در ایجاد عفونتهای قارچی قرنیه عوامل زیادی اعم از باکتریها، قارچها و حتی انگلها دخیل هستند. بر طبق گزارشات حاصله، چه در کشورهای توسعه یافته و چه در حال توسعه قارچهای رشته ای از مهمترین عوامل ایجاد زخم قرنیه می باشند که هنوز هم درمان آن با مشکل روبرو است. راجش کاترا و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه ای که در هندوستان انجام داده

گزارشاتی از جنوب، شمال و شمال شرق هندوستان شیوع کراتیتهای قارچی ۳۶/۷-۳۷ درصد را نشان می دهد در کشور امریکا از ۲ درصد در نیویورک تا ۳۵ درصد در فلوریدا متغیر است و حتی در بعضی مناطق به ۶۶-۴۵ درصد می رسد (۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸). عوامل بسیاری از جمله قارچها و باکتریها در ایجاد کراتیت و زخم قرنیه نقش دارند. بیش از ۸۰ گونه از قارچهای کپکی و مخمری به عنوان عامل بیماریزا در عفونتهای قارچی چشم گزارش شده اند، ولی فوزاریوم و آسپرژیلوس در درجه اول و گونه های کاندیدا در درجه دوم اهمیت قرار دارند (۱۰، ۱۱). اهمیت تشخیص و بکاربردن پروتکل صحیح درمانی در عفونتهای قرنیه اهمیت بسزایی دارد چرا که یک قرنیه طبیعی نسبت به عوامل قارچی و باکتریایی مقاوم است ولی وقتی در اثر تروما، آسیب وارده از مواد گیاهی، خاک، جراحی و یا سایر بیماریها گرفتار ضایعه شود، شدت آسیب پذیر شده و مقاومت خود را از دست خواهد داد و عفونت آغاز شده و به زخم منجر می گردد و نهایتا ممکن است به کوری منتهی شود. با یک ارزیابی صحیح آزمایشگاهی و تشخیص ارگانسیم عامل بیماری می توان با شروع یک درمان مناسب از وقوع چنین عوارض وخیم چشمی جلوگیری نمود (۱، ۱۰). در مطالعه حاضر نیز گونه های قارچی در نمونه های زخم قرنیه که از بیماران مشکوک به عفونت قارچی چشم تهیه و به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده پزشکی تبریز ارسال گردیده بود، بررسی شده و فراوانی آنها گزارش گردیده است.

## مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی و مقطعی می باشد و در بازه زمانی دو سال از ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۹ از بین ۳۰ نمونه ی ارسالی مربوط به بیمارانی که مبتلا به زخم قرنیه بوده و به مرکز آموزشی-درمانی نیکوکاری تبریز مراجعه کرده بودند، انجام یافته است. تراشه های زخم قرنیه در اطاق عمل توسط جراحان چشم از محل زخم موجود در قرنیه چشم تهیه شده و در ظروف استریل مخصوص نمونه گیری به آزمایشگاه قارچ شناسی ارسال شده بودند. برای بررسی نمونه ها بطور مستقیم، لام مرطوب با هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد تهیه گردید و قسمتی از نمونه ها در محیط سابوردکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) و سابوردکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SC) کشت داده شد. از آنجاییکه عوامل قارچی ساپروفیت در ایجاد کراتیتهای قارچی دخیل هستند، از محیط سابوردکستروز آگار حاوی سیکلوهاگزامید استفاده نگردید. نمونه های مثبت مخمری توسط کیت API32C تعیین هویت شدند. نمونه هایی که از نظر قارچهای ساپروفیت رشته ای مثبت بودند، از طریق مشخصات کلنی و دید میکروسکوپی و اسلاید کالچر مورد شناسایی قرار گرفتند.

## یافته ها

از کل بیماران، ۲۲ نفر (۷۳/۴ درصد) مرد و ۸ نفر (۲۶/۶ درصد) بیماران زن بودند. ۱۲ نمونه (۴۰ درصد) از نظر وجود قارچ در دید مستقیم و ۹ نمونه (۳۰ درصد) در کشت از نظر قارچ مثبت بود (جدول شماره ۲). فوزاریوم، آسپرژیلوس، کاندیدا و کورولاریا، گونه های جدا شده در این مطالعه بودند. جدول شماره ۳ گونه های ایزوله شده را در این مطالعه نشان می دهد.

است، عامل ۲۶ درصد نمونه های زخم قرنیه بررسی شده را قارچهای رشته‌ای گزارش نموده است. در مطالعه‌ی آنها آسپرژیلوس نیجر (*Aspergillus niger*)، آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*)، آسپرژیلوس فلاووس (*A. flavus*) و گونه های فوزاریوم (*Fusarium*) بیشتر از سایر قارچها عوامل اتیولوژیک بودند. گونه های کانیدیدا (*Candida spp*) و قارچهای رشته‌ای سیاه در درجات بعدی قرار داشتند (۲). مطالعات مختلفی که از سال ۱۳۶۵ تا سالهای اخیر در ایران انجام یافته، نتایج مشابه داشته و گونه های فوزاریوم و اسپرژیلوس را شایعترین عوامل کراتیتها و زخم قرنیه گزارش نموده اند (۱ و ۱۳). در مطالعه حاضر نیز ما ۴ مورد فوزاریوم (*Fusarium*) و ۳ مورد آسپرژیلوس (*Aspergillus*) جدا کردیم. گونه های کانیدیدا (*Candida spp*) و کورولاریا (*Curvularia*) هر کدام یک مورد جدا گردید. مطالعات اخیر عفونتهای قارچی قرنیه نشان می دهد که لنزها و محلولهای نگهدارنده لنز ریسک فاکتورهای جدید برای ایجاد کراتیت قارچی در جوامع پیشرفته هستند (۱۸). در سال ۲۰۱۳ ایوانس و همکاران گزارش کردند در افرادی که از لنز استفاده می کنند کراتیتهای میکروبی بیشتر مشاهده می شود (۱۹). گونه های فوزاریوم شایعترین عامل کراتیت قارچی در افرادی است که از لنز استفاده می کنند. از بین گونه های فوزاریوم، بیشتر گونه های فوزاریوم سولانی (*Fusarium Solani*) و فوزاریوم اکسیپوروم (*Fusarium*)

است، عامل ۲۶ درصد نمونه های زخم قرنیه بررسی شده را قارچهای رشته‌ای گزارش نموده است. در مطالعه‌ی آنها آسپرژیلوس نیجر (*Aspergillus niger*)، آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*)، آسپرژیلوس فلاووس (*A. flavus*) و گونه های فوزاریوم (*Fusarium*) بیشتر از سایر قارچها عوامل اتیولوژیک بودند. گونه های کانیدیدا (*Candida spp*) و قارچهای رشته‌ای سیاه در درجات بعدی قرار داشتند (۲). مطالعات مختلفی که از سال ۱۳۶۵ تا سالهای اخیر در ایران انجام یافته، نتایج مشابه داشته و گونه های فوزاریوم و اسپرژیلوس را شایعترین عوامل کراتیتها و زخم قرنیه گزارش نموده اند (۱ و ۱۳). در مطالعه حاضر نیز ما ۴ مورد فوزاریوم (*Fusarium*) و ۳ مورد آسپرژیلوس (*Aspergillus*) جدا کردیم. گونه های کانیدیدا (*Candida spp*) و کورولاریا (*Curvularia*) هر کدام یک مورد جدا گردید. مطالعات اخیر عفونتهای قارچی قرنیه نشان می دهد که لنزها و محلولهای نگهدارنده لنز ریسک فاکتورهای جدید برای ایجاد کراتیت قارچی در جوامع پیشرفته هستند (۱۸). در سال ۲۰۱۳ ایوانس و همکاران گزارش کردند در افرادی که از لنز استفاده می کنند کراتیتهای میکروبی بیشتر مشاهده می شود (۱۹). گونه های فوزاریوم شایعترین عامل کراتیت قارچی در افرادی است که از لنز استفاده می کنند. از بین گونه های فوزاریوم، بیشتر گونه های فوزاریوم سولانی (*Fusarium Solani*) و فوزاریوم اکسیپوروم (*Fusarium*)

### نتیجه گیری

این مطالعه و سایر مطالعات در دنیا نشان می دهند که کراتیتهای قارچی با روشهای بالینی و آزمایشگاهی قابل شناسایی هستند. علی رغم اینکه روشهای مولکولی در تشخیص سریع، مفید و موثر می باشند، بعلت عدم دسترسی در هر آزمایشگاه به این روشها، آزمایش مستقیم تراشه های زخم قرنیه با هیدروکسید پتاسیم، بهترین روش در آزمایشگاه های روتین قارچ شناسی می باشد. قارچهای رشته ای مهمترین عوامل ایجاد کننده کراتیتهای قارچی، بوده و گونه های فوزاریوم و آسپرژیلوس بیشتر از سایر گونه های قارچی دخیل هستند. با تمام بررسیها و پیشرفت در طبابت بخصوص در زمینه عفونتهای قارچی چشمی، هنوز هم متخصصین چشم در روند درمانی این عفونتها با مشکلات عدیده مواجهند و در زمینه ی روشهای تشخیصی سریع و پروتکل های درمانی به بررسیهای بیشتر نیاز می باشد.

### References

- Zaini F, Mehbod A, Emami M. Mycotic keratitis. In: *Comprehensive Medical Mycology*. 2<sup>nd</sup> ed. University of Tehran Press, 2004; PP: 453-456.
- Rajeash Somabhai Katara R, Dhanjibhai Patel N, Sinha M. A clinical microbiological study of corneal ulcer patients at Western gujart, India. *Acta Med Iran* 2013; **13**(6): 399-403.
- Fadzilla Mohd Tahir, Norhayati A, Siti Raihan Ishak, Ibrahim M. A 5-Year Retrospective Review of Fungal Keratitis at Hospital University Sains Malaysia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012; **10**: 1-6
- Rautaraya B, Sharma S, Kar S, Das S, Sahu SK. Diagnosis and treatment outcome of mycotic keratitis at a tertiary eye care center in eastern India. *BMC Ophthalmol* 2011; **22**(11): 39-46.
- Gopinathan U, Sarma S, Garg P, Rao GN. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol* 2009; **57**(4): 273-279.
- Daljit Singh, Hampton Roy SR. Fungal Keratitis. 2013; Available from: [http:// medicine. medscape. com /articale/119467-overview](http://medicine.medscape.com/articale/119467-overview).
- Yildiz EH, Abdalla YF, Elsahn AF, Rapuano CJ, Hammersmith KM, Laibson PR, et.al. Update on fungal keratitis from 1999-2008. *Cornea* 2010; **29**(12): 1406-1411.
- Sharma S. Diagnosis of fungal keratitis: current options. *Expert Opin Med Diagn* 2012; **6**(5): 449-455.
- Shihadeh WA. *Aspergillus fumigatus* keratitis following intracorneal ring segment implantation. *BMC Ophthalmol* 2012; **6**: 12-19.
- Thomas PA, Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**(3): 210-220.
- Jeena Mascarenhas, Prajna Lalitha, Venkatesh Prajna, Muthiah Srinivasan, Manoranjan Das, Sean Dsilva, et.al. Acanthamoeba, Fungal and Bacteria Keratitis. *American Journal of Ophthalmology* 2014; **157**(1): 56-62.
- Kehinde Oladigblu, Abdulkadir Rafinndadi, Emmanuwl Abah, Elsie Samaila. Corneal ulcers in a tertiary hospital in Northern Nigeria. *Annals of African Medicine* 2013; **12**(3): 165-170.
- Shokohi T, Nowroozpoor-Dailami K, Moaddel-Haghighi T. Fungal keratitis in patients with corneal ulcer in Sari, Northern Iran. *Arch Iran Med* 2006; **9**(3): 222-227.
- Virginia Vanzzini Zago, Marino Alcantara Castro, Ramon Naranjo Tackman. Support of the laboratory in diagnosis of fungal ocular infections. *International Journal of Inflammation* 2012; **10**: 1-8.
- Nag Dr, Chatterjee S, Chatterjee S, Khan M. Role of potassium hydroxide mount in rapid diagnosis of fungal corneal ulcers. *J Indian Med Assoc* 2002; **100**(1): 18-20.
- Goldschmidt P, Degorge S, Che Sarria P, Benallaoua D, Semoun O, Borerie V. New strategy for rapid diagnosis and characterization of fungal infections: the example of corneal scrapings. *PLOS One* 2011.
- Ferrer C, Alio JL. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2011; **23**(1): 15-22.
- Behrens-Baumann W, Seibold M, Hofmuller W, Walter S, Haeblerie H, Wecke T, et.al. Benefit of polyhexamethylene biguanide in Fusarium Keratitis. *Ophthalmic Res* 2012; **48**(4): 171-176.
- Evans DJ, Fleiszig SM. Microbial Keratitis: could contact lens material affect disease pathogenesis? *Eye Contact Lens* 2013; **39**(1): 73-78.
- Hu S, Fan Vc, Koonapreddy C, Du TT, Asbell PA. Contact lens-related Fusarium infection: case series experience in New York City and review of fungal keratitis. *Eye Contact Lens* 2007; **33**(6): 322-823.
- Mahdhu Dyavaiah, Rama Ramani, David S Chu, David C Ritterband. Molecular characterizaion, biofilm analysis and experimental biofouling study of Fusarium isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. *BMC Ophthalmology* 2007; **7**: 1-9.