تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

شناسایی عوامل کراتیت قارچی به روش PCR و تعیین حساسیت دارویی

آیت الله نصرالهی عمران
دانشیار میکروبشناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران

شقایق نیک پور مقدم
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران

سعید مهدوی عمران
استادیار قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

نویسنده مسئول: شقایق نیک پورمقدم

پست الکترونیک: sh.nikpour@yahoo.com
تلفن : ۰۹۱۱۲۵۷۴۸۶۷
آدرس: مازندران- بابلسر- خیابان بهشتی – بهشتی۴۱

دریافت: ۹۲/۱۱/٦
ویرایش پایانی: ۹۳/۱/۲۰
پذیرش: ۹۳/۱/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: *کراتیت قارچی یکی از شایع ترین و شدیدترین زخم های عفونی قرنیه را ایجاد می کند که ممکن است منجر به کاهش بینایی بیمار و در موارد شدید منجر به کوری گردد. شایع ترین عامل زمینه ساز کراتیت قارچی، ضربه به چشم و ورود جسم خارجی به چشم و متعاقب آن آسیب به قرنیه است. در این مطالعه به ر شناسایی عوامل کراتیت قارچی جدا شده از قرنیه بیماران پرداخته شد.*

روش بررسی: *برای شناسایی از روش PCR به منظور تکثیر و شناسایی قطعه 18s ریبوزومی قارچ ها با استفاده از پرایمرهای ITS1-ITS4 و همچنین از روش کشت استفاده شد و نتایج به دست آمده با هم مقایسه شدند. ت*

یافته ها: *آزمون PCR برای ۲۲(۷۳.۳٪) مورد مثبت و ۸ مورد منفی بود. کشت قارچ در ۱۶(۵۳.۳٪) مورد از ۳۰نمونه مثبت گزارش شد که ۱۵ مورد PCR مثبت هم بودند. در ۷مورد هم PCR و هم کشت منفی بود، ۴مورد هم رشد باکتری نشان دادند.*

نتیجه گیری: *PCR یک روش تشخیصی نویددهنده برای شناسایی عوامل کراتیت قارچی است و دارای مزایای نظیر آنالیز سریع و توانایی بررسی نمونه ها در مکانی دورتر از مکان جمع آوری آنها می باشد.*

واژه های کلیدی: *کراتیت قارچی، واکنش زنجیره ای پلیمراز، حساسیت، کشت، شرق مازندران*

آدرس مقاله
نصرالهی عمران آ، نیک پور مقدم ش، مهدوی عمران س" شناسایی عوامل کراتیت قارچی به روش PCR و تعیین حساسیت دارویی" مجله علوم آزمایشگاهی، خرداد و تیر۹۴، دوره نهم (شماره ۲): ۱۹-۲۵

مقدمه

عفونت قارچی یکی از شایع ترین و شدیدترین زخم های عفونی قرنیه را ایجاد می کند که ممکن است منجر به کاهش بینایی بیمار و در موارد شدید منجر به کوری گردد(۱). عفونت های چشمی سبب ایجاد بیماری های سخت چشمی و کوری می شود که شامل Endophtalmit, Orbital cellulites, Dacryocystitis و Keratitis هستند(۲). عفونت قارچی قرنیه درمناطق گرمسیر و شرجی کشورهای درحال توسعه شایع تر است(۳). کراتیت قارچی بواسطه قارچ های رشته ای ایجاد می شوند و مخمرها مسئول درصدکمی از موارد بیماری می باشند(۴). عفونت یکی از چالش برانگیزترین علل التهاب و آسیب قرنیه از نقطه نظر تشخیص و درمان هستند(۵). در کراتیت قارچی تراشه (scraping) قرنیه، نمونه مناسبی است. اما در برخی موارد ممکن است نیاز به بیوپسی قرنیه یا تخلیه حفره جلویی نیز باشد(۶). شایع ترین عامل زمینه ساز کراتیت قارچی، ضربه به چشم و ورود جسم خارجی به چشم و متعاقب آن آسیب به قرنیه است(۷). کراتیت های قارچی با عامل قارچ های رشته ای در زمینه جسم خارجی و ضربه بیشتر ایجاد می شوند در حالی که کراتیت کاندیدایی در افراد دیابتی بیشتر مشاهده شده است. افزایش بروز کراتیت قارچی در طی سال های اخیر به عنوان خطری جدی و تهدید کننده بینایی در عفونت های قرنیه مطرح می باشد(۹،۸). هدف از انجام این مطالعه شناسایی عوامل کراتیت قارچی جدا شده از قرنیه می باشد.

روش بررسی

نمونه گیری از ۳۸ (۲۷مرد و ۱۱زن) بیماری که به مراکز درمانی و مطب چشم پزشکان در شرق مازندران از تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱ تا تاریخ ۱۳۹۱/۶/۱مراجعه کرده بودند، انجام شد. که از این تعداد ۸ نفر پس از انجام معاینات دقیق تر از مطالعه حذف شدند و مطالعه بر روی ۳۰ بیمار مشکوک به ابتلای عفونت کراتیت قارچی بودند انجام شد. همه بیمارانی که در این مطالعه وارد شدند، اذعان داشتند که از داروهای ضد قارچی استفاده نکرده بودند. تراشه برداری از قرنیه چشم بیماران پس از ریختن قطره تتراکائین ۰/۵ درصد و ایجاد بی حسی، توسط چشم پزشک به وسیله اسپاچولای پلاتینی استریل صورت گرفت و اسپاچولا بر روی محیط سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت داده شدند. این کار بر روی سه پلیت تکرار شد. پلیت ها در دمای ^{0}C ۲۵ به مدت ۷ تا ۱۴ روز انکوبه شدند(۴،۲). برای آزمون PCR دوباره نمونه گیری توسط اسپاچولای استریل صورت گرفت. اسپاچولا درون یک ویال ۱/۵ میلی لیتری از بافر PCR که حاوی ۲۵۰ میکرولیتر 1 × منیزیم (Mg) بود فرو برده شد و در دمای ۲۰ – درجه سانتی گراد تا زمان تجزیه و تحلیل نهایی قرار داده شدند(۱۴،۱۳). استخراج DNA با استفاده از روش فنل – کلروفرم – الکل انجام شد. از پرایمرهای عمومی ITS1- ITS4 (Internal transcribe Spacer) برای تکثیر قطعه 18s rDNA قارچ ها استفاده شد. توالی ITS1 به صورت 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCC G 3' و ITS2 به صورت 5`TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3` می باشد. شرایط دمایی PCR مرحله اول (Pre-denaturing) ۱ بار به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله دوم (denaturation) ۳۵ بار به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، مرحله سوم (Annealing) ۳۵ بار به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد ومرحله چهارم (Extension) ۳۵ بار به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله آخر (Final extension) ۱ دور به مدت ۶ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در این روش قطعات ۵۰۰–۸۰۰ جفت بازی تکثیر شدند. در کنترل منفی به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید(۱۶،۱۵). محصولات برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. برای تست تعیین حساسیت دارویی، سوسپانسیونی مطابق با غلظت ۰/۵ مک فارلند، از قارچ های رشد یافته با استفاده از ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و تریتون ۱۰۰× تهیه شد. برای تعیین حساسیت قارچ های جدا شده، به داروهای آمفوتریسین ب، ایتراکونازول، وریکونازول، پوزاکونازول از روش رقت سازی در حجم کم در محیط مایع از روش توصیه شده توسط کمیته ملی استاندارد سازی آزمایشگاه های بالینی یا NCCLS (National) Committee for Clinical Laboratory Standard استفاده شد. بر همین اساس محیط RPMI 1640 همراه با ال –

گلوتامین بدون بی کربنات و حاوی شاخص تعیین اسیدیته (شرکت Gibco، امریکا) به همراه ۲ گرم در لیتر بی کربنات سدیم (NaHCo3) (شرکت مرک آلمان) و بافر ۳- (ان – مورفولینو) پروپان سولفونیک اسید (N-Morpholino) propan sulfunic acid}{ 3- یا MOPS (شرکت سیگما 074K5448) به میزان ۳۴/۵۳ گرم درهر لیتر محیط کشت به کار گرفته شدند(۱۷-۲۰).

یافته ها

میانگین سن آنها ۱۲±۴۱ سال (محدوده ۶ تا ۸۰ ساله) و از این تعداد ۲۱ نفر(۷۰٪) مرد و ۹ نفر (۳۰٪) زن بودند. از بین ۳۰ بیمار، ۱۶ بیمار(۵۳/۳٪) دارای نتایج کشت مثبت و ۱۴بیمار(۴۶/۶٪) دارای نتایج کشت منفی از نظر عفونت قارچی گردیدند. نتایج در جدول۱ آمده است. از ۱۶ نمونه کشت مثبت، ۷ پلیت (۴۳/۷۵٪) حاوی آسپرژیلوس و ۹ پلیت (۵۶/۲۵٪) دیگر شامل فوزاریوم بودند. نتایج آزمون PCR از ۳۰ نمونه مورد بررسی، در ۲۲ مورد (۷۳/۳ ٪) مثبت بود و برای ۸ مورد (۲۶/۶٪) باندی تشکیل نشد. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، شناسایی ایزوله ها را در سطح جنس و گونه با تعیین توالی به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژنی NCBI انجام شد. گونه *های* *Aspergillus niger* strain 13 Harike (GU004290.1) و *Fusarium solani* strain FUS (HQ384397.1) شناسایی شدند. آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی برای قارچ های ایزوله و خالص سازی شده بر روی پلیت ها انجام شد. میانگین اثر داروها و نتایج حاصله در جدول ۲ آمده است. پوزاکونازول دارای پایین ترین MICs و آمفوتریسین دارای بالاترین MICs بر *آسپرژیلوس نایجر* بودند. ایتراکونازول هیچ اثر مهاری مهارکنندگی بر فوزاریوم نداشت (MIC_{90} > 8). وریکونازول و آمفوتریسین B پایین ترین MICs را علیه *فوزاریوم سولانی* داشتند. نتایج تجزیه واریانس اثر دارو های ضدقارچی بر روی قارچ آسپرژیلوس و فوزاریوم نشان می دهد اثر مهاری دارو ها معنی دار است.(P< ۰/۱۰۰۰). پس از دریافت نتایج تعیین توالی، شناسایی ایزوله ها را در سطح جنس و گونه با تعیین توالی به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژنی NCBI انجام شد. گونه*های* *Aspergillus niger* strain 13 Harike (GU004290.1) و *Fusarium solani* strain FUS (HQ384397.1) شناسایی شدند. آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی برای قارچ های جدا شده و خالص سازی شده بر روی پلیت ها انجام شد(جدول۱). پوزاکونازول دارای پایین ترین MICs و آمفوتریسین دارای بالاترین MICs بر *آسپرژیلوس نایجر* بودند. ایتراکونازول هیچ اثر مهاری مهارکنندگی بر فوزاریوم نداشت (MIC_{90} > 8). وریکونازول و آمفوتریسین B پایین ترین MICs را علیه *فوزاریوم سولانی* داشتند. نتایج تجزیه واریانس اثر دارو های ضدقارچی بر روی قارچ آسپرژیلوس و فوزاریوم نشان می دهد اثر مهاری دارو ها معنی دار است.(P< ۰/۱۰۰۰).

جدول ۱ – MIC_{50} و MIC_{90} قارچ های جدا شده از نمونه های کراتیت قارچ

گونه	داروهای ضد قارچی	حداقل غلظت مهارکنندگی /MIC(mgr)	٪۵۰
آسپرژیلوس نایجر (تعداد=۷)	آمفوتریسین ب	۱ (±۰/٤٦)	۲(±۰/۹۲)
	ایتراکونازول	۰/۱۲۵ (±۰/۰۷)	۰/۲۵(±۰/۱۳)
	وروکونازول	۰/۲۵(±۰/۱۰)	۰/۵(±۰/۲٦)
	پوزاکونازول	۰/۰٦(±۰/۰۲)	۰/۱۲۵(±۰/۰٤)
فوزاریوم سولانی (تعداد=۹)	آمفوتریسین ب	۲(±۰/۸)	٤(±۱/٦)
	ایتراکونازول	>۸	>۸
	وروکونازول	۲(±۰/۸۷)	٤(±۱/۷٤)
	پوزاکونازول	٤(±۱/٦۳)	۸(±۳/۲٦)

بحث

اولین مورد کراتیت قارچی، توسط لیبر در سال ۱۸۷۹گزارش شد(۲). عفونت قارچی قرنیه یکی از علل مهم نابینایی در کشورهای در حال توسعه محسوب می شود(۳). درمان کامل این عفونت به تشخیص به موقع عامل ایجادکننده وابسته است(۵). از این بین عفونت قارچی، ۲۲ مورد (۷۳/۳٪) طبق نتایج آزمون PCR و ۱۶ مورد (۵۳/۳٪) طبق نتایج به دست آمده از آزمون کشت مورد تایید قرار گرفت. بروز کراتیت قارچی در جهان بین ۱۷ تا ۳۶ درصد از موارد زخم قرنیه را شامل می شود که این تخمین در هند به ۴۴ تا ۴۷ درصد هم می رسد(۲). در مطالعه ای که توسط شکوهی و همکاران انجام شد به بررسی شیوع کراتیت قارچی در مراجعه کنندگان با زخم قرنیه به بیمارستان بوعلی سینای ساری در سال ۱۳۸۳ پرداختند واز بررسی ۲۲ مورد، ۷ مورد (۳۱/۸٪) میسلیوم های قارچ رشته ای جداشدکه بیشتر آسپرژیلوس فومیگاتوس و فوزاریوم بودند و روش KOH+CFW نسبت به روش کشت و رنگ آمیزی به عنوان استاندارد طلایی با حساسیت ۷۱/۴٪ مورد ارزیابی قرار گرفت(۵). در مطالعه ی مشابه Gaudio و همکاران، در ۷۴٪ موارد PCR و کشت هردو مثبت یا هر دو منفی بود و تنها در دو مورد (۶٪) PCRمثبت و کشت منفی بود و در یک مورد(۳٪)، PCRمنفی و کشت مثبت بود. همچنین PCR به عنوان موثرترین روش در شناسایی کراتومایکوزیس شناخته شد. از مزایای PCR ،سرعت شناسایی ارگانیسم هایی است که به سختی کشت می یابند. حساسیت بالای PCR، که بین ۸۹-۹۴ درصد می باشد، آن را به عنوان استاندارد طلایی معرفی کرده است. اختصاصیت آن بین ۵۰-۸۸٪ است(۱۵). در مطالعه ای که توسط نجابت و همکاران بر روی بیماران مشکوک به عفونت قرنیه صورت گرفت، از پرایمرهای pffor و pfrev29 استفاده شد که نتایج مثبت توسط PCR، ۶۸ درصد و نتایج کشت، ۲۴ درصد و رنگ آمیزی و مشاهده با میکروسکوپ نوری ۴۰ درصد به دست آمد که تایید حساسیت بیشتر روش PCR نسبت به روش های رایج می باشد(۱۶). در مطالعه ای که توسط Shukla وKumar صورت گرفت و از پرایمرهای ITS1-ITS2-ITS3-ITS4 استفاده شد، روش PCR در مقایسه با روش های متعارف کشت، از دقت و حساسیت مناسب تری برخوردار بود(۲۱). در مطالعه Nayak (۲۰۱۱)، شناسایی عوامل قارچی ازطریق روش کشت و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای panfungal برای شناسایی قسمتی از ژن ۲۸S rRNA صورت گرفت و در ۷۴ درصد از موارد نتایج آزمون PCR و کشت قارچ ها، با هم مطابق بودند(۲۲). در تحقیقی که توسط Gehlot و همکارانش بر روی هشت گونه از قارچ آسپرژیلوس که از نمونه های بالینی بیماران جدا شده بود، صورت گرفت استفاده از پرایمرهای RAPD و تنوع در منطقه ITS از ۵/۸ S rRNA، ابزار مناسبی برای تشخیص سریع و تسهیل درمان زودرس مبتلایان به اختلالات aspergilosis شناخته شد(۲۳). Vinhod و همکاران مطالعه ی موردی را بر روی یک کشاورز ۳۹ ساله که چشم راستش در اثر اصابت با سیم آسیب دیده بود، انجام دادند. در معاینات اولیه حاشیه های پرمانند در اطراف زخم کاملا مشخص کننده کراتیت قارچی بود. طبق نمونه گیری انجام شده گونه *papulaspora* از طریق میکروسکوپی شناسایی شد. اما از بررسی توالی ITS آن مشخص کرد که متعلق به تیپ های معمول از نژاد Chaetomium نمی باشد. با انجام بررسی های ریخت شناسی و تشخیص ویژگی های تاکسون توانستند یک عضو جدید جنس Chaetomium را معرفی نمایند(۲۴). در یک مطالعه آینده نگر که توسط Vengayil و همکاران انجام گرفت حساسیت PCR در تشخیص عفونت قارچی قرنیه ۷۰ درصد محاسبه شد(۲۵). طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه از ۱۶ کشت مثبت، ۷ پلیت (۴۳/۷۵٪) حاوی آسپرژیلوس*Aspergillus* و ۹ پلیت (۵۶/۲۵٪) دیگر شامل فوزاریوم *Fusarium* بودند. محصولات PCR برای تعیین گونه به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند و در نتیجه گونه های *Aspergillus niger* strain 13 Harike (GU004290.1) و *Fusarium solani* strain FUS(HQ384397.1) شناسایی شدند. با توجه به اینکه تحقیق انجام شده در منطقه کوچکی (شرق مازندران) صورت پذیرفت و اینکه در اکثر موارد عامل اصلی ایجاد عفونت، ضربه به بافت قرنیه در اثر برخورد ساقه محصولات کشاورزی

در حین برداشت محصول بوده است. شاید بتوان این دلایل را توجیه کننده تنوع کم گونه های شناسایی شده در این مطالعه بیان کرد. در مطالعات مشابه انجام شده (۲۶،۲۷)، علل عفونت قرنیه متنوع تر بوده و تعداد و تنوع گونه های ایزوله شده، بیشتراز مطالعه اخیر بوده است. در مطالعه Nayak و همکاران (۲۰۰۸) حساسیت گونه های قارچی مختلف جدا شده از عفونت کراتیتیس نسبت Voriconazo (VOR) ۱۰۰ درصد و برای ketoconazole ۸۲/۴ درصد، AmphotericinB(AMB) ۷۶/۵درصد, Itraconazole (ITR) ۶۷ درصد، Fluconazole ۶۰ درصد و 5-flurocytocin ۶۰ درصد بود. پایین ترین Voriconazole MIC(90) برای گونه های کاندیدا بود(۰/۰۱۶ mg/ml)(۲). در مطالعه ای مشابه که توسط Gul Ozdemir و همکاران انجام شد (۲۰۱۲) اثر(ITR) ، (VOR) ،(AMB) و caspofungin (CAS) بر روی ۲۹ نمونه ی قارچ چشمی جمع آوری شده از نقاط مختلف جهان بررسی کردند، AMB موثرترین دارو (۰/۴۹ µg/ml) و پس از آن CAS,VOR و ITR بود. ITR هیچ فعالیتی بر روی *Fusarium* نداشت (MIC ۳۲µg/ml) (۲۶). در تحقیق انجام شده توسط Lalitha و همکاران (۲۰۰۷) در بیمارستان چشم در جنوب هند، به بررسی حساسیت آنتی میکروبیال گونه های جدا شده از کراتیتیس پرداختند و از ۹۰ گونه جدا شده که شامل ۴۱ گونه *Aspergillus*، ۳۸ گونه *Fusarium* و ۱۱ جنس دیگر بودند. Triazole ها و دارای پایین ترین MIC علیه گونه های آسپرژیلوس بودند و amphotripsinB و Pozaconazole دارای حداقل MIC علیه گونه های *Fusarium* و هیچ گونه ای از آن توسط itraconazole یا caspofungin مهار نشد(۲۷).

نتیجه گیری

از آنجا که تشخیص سریع و صحیح عوامل ایجادکننده عفونت های قرنیه (باکتریال یا قارچی) نقش مهمی در درمان و تجویز دارو دارد و می تواند از تجویز و مصرف اشتباه و یا بی رویه آنتی بیوتیک ها جلوگیری کند. در نتیجه PCR یک روش تشخیصی نوید دهنده برای تشخیص کراتیت قارچی است و دارای مزایایی نسبت به روش کشت می باشد. نتیجه سریع تر نسبت به روش کشت و توانایی بررسی نمونه ها در مکانی دورتر از مکان جمع آوری آنها اشاره کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می باشد که به راهنمایی دکتر آیت الله نصرالهی عمران بوده و در تاریخ ۱۳۹۱/۰۶/۲۰ به پایان رسیده است. همه هزینه های مالی این طرح توسط دانشجو تأمین شده است. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران و کارکنان آزمایشگاه قارچ شناسی و میکروبشناسی و مولکولی دانشکده پزشکی بابل به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق اعلام می دارند.

References

1. Alfonso EC, Rosa RH, Miller D. *Fungal keratitis in Kerachme. J.Manni M, Holand E. Cornea fundamental diagnosis and management*. 2nd ed. Elsevier Mosby. 2005; 1101-1105.

2. Nayak N. *Fungal infections of the eye-laboratory diagnosis and treatment*.Nepal Med coll J. 2008; 10(1): 48-63.

3. Upadhyay MP1, Karmacharya PC, Koirala S, Tuladhar NR, Bryan LE, Smolin G, et al. *Epidemiologic characteristics predisposing factors and etiologic diagnosis of corneal ulceration in Nepal*. AM J Ophthalmol . 1991; 111(1): 92-99.

4. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology .1st ed, Elsevier Science, USA. 2003.

5. Nowroozpoor Dailami K, Shokohi T, hedayaty MT, Moaddele Haghighi T, Khalilian AR. *Fungal keratitis at Boo Ali Sina Hospital,Sari,Iran.* Bina J ophthalmol. 2005; 11(2): 191-198.

6. Okungbowa FI, Isikhuemhen OS, Dede AP. *The distribution frequency of candida species in the genitourinary tract a moung symptomatic individuals in Nigerian cities.* Rev Iberoam Micol. 2003; 20(2): 60-3.

7. Howard DH. Pathogenic fungi in humans and animals. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. USA. 2003.

8. Ellis D, Davis S, Alexious H, Handke RM, Bartley R. *Description of medical fungi*. School of Molecular & Biomedical science university of Adelaide. Australia. 2007.

9. Holand E. *Cornea fundamental diagnosis and management* 2nd ed. Elsevier Mosby; 2005; 1101-1105.

10. Choi DM, Goldstein MH, Salierno A, Driebe WT. *Fungal keratitis in a daily disposable soft contact lens wearer*. CLAO J. 2001; 27: 111-112.

11. Kuo IC, Margolis TP, Cevallos V, Hwang DG. *Aspergllus fumigatus keratitis after laser in situ keratomileusis.* Bina ophthalmol. 2007;12(4): 533-538.

12. Waknine Y. Fungal keratitis infections linked to contact lens use. Med scape Alert. 2008; 11: 230-235.

13. Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL. *Detection and Identification of fungal pathogen by PCR and by ITS2 and 5.8s Ribosomal Dna Typing in ocular Infections.* Jornal of clinical Microbiology. 2002; 39(8): 2873-2879.

14. Oferrer C, Cdom F, Frases S, et al. *Detection & identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8s ribosomal DNA Typing in oclar infections*. Journal of clinical microbiology. 2001; 2(2): 873-879.

15. Gaudio PA, Gopinathan U, Sangwan V, Hughes TE. *Polymerase chain reaction based detection of fungi in infected cornea*. Br J Ophthalmol. 2002; 86 (7): 755-760.

16. Nejabat M, Khalili MR, Badiei P, Keshavarz Fazl F, Alborzi A, Shadmani A. *Polymerase chain reaction versus conventional laboratory methods in the diagnosis of fungi keratitis*. Bina ophthalmol. 2009; 15(1): 63-67.

17. *NCCLS document M 27-A2 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast*. Approved standard second edition.Villanova, Pa, USA. 2002; 22(15): 1-59.

18. Holla BS, Mahalinga M, Karthikeyan MS, Poojari B, Akberali PM, Kumari NS. *Synthesis, characterization and antimicrobial activity some substituted 1,2,3-triazoles.* European Journal of Medicinal chemistery. 2005; 40(11): 1173-8.

19. Makimura K, Sudo T, Kudo M, Uchida K. *Development of Reference procedures for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeast with standardized end point determination.* Microbial Immunol. 1998; 42(1): 55-59.

20. Thomas PA, Kaliamurthy J. *Keratomycosis caused by Aspergillus viridinutans :an Aspergillus fumigates-resembling mold presenting distinct clinical and antifungal susceptibility patterns*. Clin Microbiol Infect. 2013; 19: 210-220.

21. Kumari M, Shukla PK. *Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rrn genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis*. J Clin microbial. 2005; 43(2): 662-668.

22. Nayak N, Satpathy G, Prasad S, Titiyal JS, Pandey RM, Vajpayee RB. *Molecular characterization of drug-resistance and drug-sensitive Aspergillus isolates causing infectious keratitis.* Indian J Ophtlalmol . 2011; 59(5): 373-377.

23. Gehlot P, Purohit DK, Singh SK. *Molecular diagnostics of human pathogenic Aspergillus species.* Indian Journal of Biotecnology. 2011; 10: 207-211.

24. Vinod Mootha V, Shahinpoor P, Sutton DA, Xin L, Najafzadeh MJ, de Hoog GS. *Identification problems with sterile fungi ,illustrated by a keratitis due to a non- sporulating Chaetomium.like species*. Medical Mycology. 2012; 50(4): 361-367.

25. Vengayil S, Panda A, Satpathy G, Nayak N, Ghose S, Patanaik D, et al. *Polymerase chain reaction guided diagnosis of mycotic keratitis a prospective evaluation of its efficacy and limitations*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009; 50(1):152-156.

26. Ozdemir HG, Oz Y, Ilkit M, Kiraz N. *Antifungal susceptibility of oclar fungal pathogens recovered from around the world against itraconazole, votriconazole, amphotericinB, and caspofungin*. Medical Mycology. 2012; 50(2): 130-135.

27. Lalitha P, Shapiro BL, Srinivasan M, Prajna NV, Acharya NR, Fothergill AW, et al. *Antimicrobial susceptibility of Fusarium, Aspergillus and other filamentous fungi isolated from keratitis.* Arch ophthalmol. 2007; 125(6): 789-793.

Identification of Keratitis Factors by PCR and Culture Method and Determination of Drug- Resistance in the East of Mazandaran, Iran

Nasrollahi Omran, A. (PhD)
Associate Professor of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Nikpour, Sh. (Msc)
Master of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Mahdavi Omran, S. (PhD)
PhD of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Corresponding Author: Nikpour, Sh.

Email:sh.nikpour@yahoo.com

Received: 26 Jan 2013
Revised: 9 Apr 2013
Accepted: 12 Apr 2013

Abstract

Background and Objective: Fungal keratitis, one of the most common and most severe infectious corneal ulcers, may lead to decreased vision and in severe cases to blindness. The most common predisposing factor for fungal keratitis has been, eye trauma or entering a foreign body in the eye followed subsequent damage to the cornea. This study aimed to identify fungal keratitis factors isolated from cornea.

Material and Methods: PCR assay was developed to amplify a portion of the fungal 18s ribosome gene by using of ITS1-ITS4 primers as well as by culture technique.

Results: of 30 samples, PCR assay were positive in 22(73.3%) and negative in eight. fungal culture were positive in 16(53.3%) of 30 samples and 15 of them were PCR positive, too. Seven (23%) specimens were both PCR and culture negative. Bacterial growth was found in four cases.

Conclusion: PCR is a promising diagnostic method for fungal keratitis. It offers some advantages over culture methods, including rapid analysis and analysis of the specimens far from their collection.

Keywords: Fungal Keratit Infection, Polymerase Chain Reaction(PCR), Culture Test, East Of Mazandaran

This paper should be cited as: Nasrollahi Omran A, Nikpour Sh, Mahdavi omran S, Nikpour Sh. [Identification of Keratitis Factors by PCR and Culture Method and Determination of Drug- Resistance in the East of Mazandaran]. mljgoums. 2015; 9(2): 19-25[Article in Persian]