

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Feriha ÇİLLİ

**KORNEA ÖRNEKLERİNDE ETKEN MANTARLARIN
KLASİK ve MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Muhammed SOYLAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Süleyha HİLMİOĞLU POLAT

İZMİR 2015

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Feriha ÇİLLİ

KORNEA ÖRNEKLERİNDE ETKEN MANTARLARIN
KLASİK ve MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Muhammed SOYLAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Süleyha HİLMİOĞLU POLAT

İZMİR 2015

Teşekkür

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine, tez çalışmamda bilgisi ve desteğiyle yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Süleyha HİLMİOĞLU POLAT 'a, tezimde kullandığım kornea örneklerinin alınmasında destekleri olan Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki uzman ve asistan doktor arkadaşlarıma, her zaman desteklerini aldığım asistan doktor arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı sağlık çalışanlarına ve ayrıca uzmanlık eğitimim süresince ve yaşam boyu hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Sibel SOYLAR 'a teşekkür ederim.

İzmir 2015

Dr. Muhammed Soyler

İçindekiler

TABLO DİZİNİ	V
ŞEKİL DİZİNİ	VI
KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kornea Hakkında Genel Bilgiler	3
2.2. Kornea Anatomisi	4
2.2.1. Epithelium anterius (Epitel)	4
2.2.2. Lamina limitans anterior (Bowman membranı)	4
2.2.3. Substantia propria (Stroma)	5
2.2.4. Lamina limitans posterior (Descement membranı)	5
2.2.5. Epithelium posterius (Endotel)	5
2.3. Kornea Fizyolojisi	5
2.4. Oküler Savunma Mekanizmaları	6
2.5. Korneanın Savunma Mekanizmaları	7
2.6. Mikrobiyolojik Tanıda Genel Prensipler	8
2.7. Gözün Mantar Enfeksiyonlarında Mikrobiyolojik İnceleme	9
2.8. Fungal Keratitler	9
2.8.1. Normal Fungal Flora	10
2.8.2. Etkenler	11
2.8.2.1. Filamentöz mantarlar	11

2.8.2.2. Esmer mantarlar	11
2.8.2.3. Maya mantarları ve zigomiçetler	11
2.8.2.4. Dimorfik mantarlar	11
2.8.2.5. Tam olarak sınıflandırılmayanlar	11
2.8.3. Predispozan Faktörler	12
2.8.4. Tanı Yöntemleri	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1. Hastaların seçilmesi	15
3.2. Örneklerin alınması	15
3.3. Örneklerin mikroskopik incelemesi	15
3.4. Örneklerin kültürü	15
3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu	17
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR	34
7. ÖZET	40
8. ABSTRACT	42
9. ÖZGEÇMİŞ	44

Tablo Dizini

Tablo 1. Kornea kazıntı örneği direkt mikroskopik inceleme, kültür ve konvansiyonel PCR ile pozitif bulunan hastaların yaş, cinsiyet ve mikrobiyolojik özellikleri.....	21
---	----



Şekil Dizini

Şekil 1. Antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki yarım ay şeklinde ekim ve üreme.....	16
Şekil 2. Antibiyotikli SDA (26°C) ve KKA (35°C) besiyerindeki örnekten üç damla damlatılarak ekim ve üreme.....	16
Şekil 3. Kültüründe <i>Fusarium spp.</i> üremesi olan kornea kazıntı örneğinin, koloniden %10'luk KOH ile hazırlanan preparatının mikroskopik incelemesinde hiyalen mantar hiflerinin görünümü (40X).....	19
Şekil 4. Kültüründe <i>Fusarium spp.</i> üremesi olan kornea kazıntı örneğinin Gram boyalı mikroskopik incelemesinde enleri düzensiz ve bölmeli mantar hiflerinin görünümü (100X).....	20
Şekil 5. <i>Candida albicans</i> saptanan örneğin antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki koloni görünümü.....	22
Şekil 6. <i>Alternaria alternata</i> üremesi olan örneğin antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki koloni görünümü.....	23
Şekil 7. <i>Alternaria alternata</i> olarak adlandırılan koloniden yapılan selofan bant yöntemi ile Laktofenol pamuk mavisı preparatının mikroskopik görünümü (40X).....	23
Şekil 8. <i>Fusarium spp.</i> üremesi olan örneğin antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki koloni görünümü.....	24
Şekil 9. <i>Fusarium spp.</i> olarak adlandırılan koloniden yapılan selofan bant yöntemi ile Laktofenol pamuk mavisı preparatının mikroskopik görünümü (40X).....	25
Şekil 10. ITS1 ve ITS4 primerleriyle amplifikasyon sonrası jel elektroforez görüntüsü.....	26

Kısaltmalar

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Na-K ATP'az: Sodyum-potasyum adenozin trifosfataz

Ig: İmmunglobulin

IL-1 α : İnterlökin - 1 α

IL-6: İnterlökin - 6

IL-8: İnterlökin - 8

HCl: Hidroklorikasit

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

PK: Penetran keratoplasti

KL: Kontakt lens

KOH: Potasyum hidroksit

GMS: Modifiye Gomori methenamine gümüşleme yöntemi

PAS: Periodic acid-Schiff

HE: Hematoksilen-eozin

DNA: Deoksiribonükleik asit

KKA: Koyun kanlı agar

EMB: Eosin-methylene-blue

SDA: Saboraud dekstroza agar

ITS: Internal transcribed spacers

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kornea hastalıkları, görme kaybının katarakttan sonraki ikinci en önemli nedenidir. Bu hastalıklar içinde keratit (fungal keratit, keratomikoz, mikotik keratit) 'ler, sıklığı giderek artmakla birlikte tıbbi tedavilerdeki gelişmeler nedeniyle tedavisi mümkün olan hastalıklardır. Fungal keratitler ilk defa 1870'li yılların sonlarına doğru tanımlanmıştır. Gelişmekte olan ülkeler ve tropikal bölgelerde keratitlerin %50'den fazlasını fungal keratitler oluşturur. Fungal keratitler oküler travmalara, topikal antibiyotiklerin ve steroidlerin uzun süre kullanımına, kontak lens kullanımına, cerrahi girişimlere ve kemoterapi nedeniyle vücut direncinin zayıflamasına bağlı olarak gelişebilirler (1, 2).

Fungal keratitler son 20-30 yıldır daha sık görülmeye başlanmıştır. Bunun nedeni hem tanı yöntemlerinin gelişmesi, hem de kortikosteroid ve bağışıklığı baskılayıcı ilaçların kullanımının artmasıdır. Fungal keratit insidansı %17-36 arasında değişmektedir (3).

Normal göz florasında *Candida* türleri en sık görülen mantarlardır (4). Sağlam kornea epiteli mantarlara karşı dirençlidir. Kornea için etken 100'den daha fazla mantar türü tanımlanmıştır (5). En sık saptanan etkenler *Fusarium* türleri, *Aspergillus* türleri ve *Candida* türleridir (3, 6, 7). Özellikle *Fusarium* türleri ve *Aspergillus* türleri fungal keratitli olguların %70'inden sorumludur (8).

Tanının erken dönemde konması ve uygun antifungal tedaviye gecikilmeden başlanması iyileşmenin gerçekleşmesinde çok önemlidir (9). Akut kornea perforasyonu olanlarda cerrahi tedavi etkili iken fungal keratitte en önemli tedavi seçeneği hala tek başına antifungal ilaçlardır (10).

İnvazif mantar hastalıklarının tanımlanmasında direkt mikroskopik inceleme ve kültür, klasik konvansiyonel yöntemlerdir. Ancak gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri ve bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olmaları nedeniyle, bu yöntemlerin yanı sıra hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir (11). Son

yıllarda moleküler yöntemlerin giderek artan oranlarda uygulanması, bu güçlüklerin çözümlenmesinde önemli bir adımdır (11).

Bu çalışmada, bir yıl boyunca Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda fungal keratit kuşkusu ile izlenen hastaların, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'na gönderilen kornea kazıntı örneklerinde; mikroskopik inceleme ile mantar ve mantarlara ait yapıları görmek, örneklerden klasik konvansiyonel yöntemler ile etken mantarları üretmek ve direkt örnekten konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile mantarları saptamak amaçlanmıştır. İkincil olarak kornea kazıntı örneklerinde, klasik konvansiyonel yöntemlere ek olarak konvansiyonel PCR yöntemi ile mantar aranmasının mikoloji rutininde uygulanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kornea Hakkında Genel Bilgiler

Kornea, göz küresinin öndeki dış tabakasının (*tunica fibrosa bulbi*) saydam bölümü olup, göz küresinin ön 1/6'sını oluşturur (12). Geride sklera ve konjonktiva ile devam eder ve güçlü bir mekanik bariyer olmasının yanında, gözün kırma gücü en fazla olan yapısıdır (13). Kornea bu özelliğini epitelinin düzenli dizilimine, epitelin yüzeyini örten düzgün gözyaşı tabakasına, içinden geçen ışığın dağılmasına izin vermeyen stroma yapısı ile stromanın bu özelliğini korumasında en büyük yardımcı olan endotel hücrelerine borçludur. Önden bakıldığı zaman kornea tam bir daire şeklinde olmayıp biraz oval biçimdedir (12).

Korneanın en önemli özellikleri saydam olması, sert olması ve konveks yüzey yapısından dolayı da büyük bir kırıcılığa sahip olmasıdır. Göze ulaşan ışığın ilk temas ettiği yer kornea yüzeyidir. Bu nedenle kornea yüzeyinin son derece düzgün olması gerekir. Çok katlı kornea epitelinin en dış kısmında oluşan mikro düzeydeki düzensizlikler, onun ideal bir optik yüzey oluşturmasını engeller. Bu nedenle yüzeyindeki 7 µm kalınlığında gözyaşı tabakası bu düzensizlikleri örttüğü için korneanın iyi bir optik yüzey oluşturmasında son derece önemli bir rol oynar. Korneaya ulaşan ışık stromanın düzenli yapısı nedeniyle dağılmadan korneayı geçerek, gözün içine doğru yönelir (13).

Kornea yüzeyinin bu kadar düzgün olmasını bazı korunma mekanizmalarına sahip olması sağlar. Bunlardan bir tanesi kornea epitelinde sonlanan serbest sinir uçlarının en ufak bir dış uyaranda göz kapaklarının hızla kapanmasını sağlayarak gözü her türlü travmadan korumasıdır. Herhangi bir epitel hasarı ortaya çıktığı zaman da epitel hücreleri hızla yer değiştirip oluşmuş epitel boşluğunu doldururlar. Daha sonra da hızlı bir mitoz safhasına girerek, eksik hücrelerin yerine yenilerini oluştururlar ve epitelin bütünlüğünü sağlarlar. Kornea epitel hücrelerinin mitoz faaliyeti özellikle limbus bölgesinde çok belirgindir. Limbustaki hızlı mitoz faaliyeti ile yeniden bu epitel deposu doldurulmuş olur (13).

2.2. Kornea Anatomisi

Korneanın çapı arka yüzünde her yönde 11,7 mm, ön yüzde ise transvers yönde 11,7 mm ve vertikal yönde de 10,6 mm kadardır (13). Konveks ön yüzü göz kapakları açıkken hava ile temastadır ve en çıkıntılı ön kısmına *vertex corneae* denir. Korneanın ince periferik kenarına *limbus cornea* denir. Korneanın orta kısmı 0,5-0,6 mm, periferik kısmı ise 1,2 mm kalınlığındadır. Korneanın konveksliği kişiden kişiye değişebildiği gibi, aynı kişinin değişik yaş periyodlarında da farklılık gösterir. Korneada kan ve lenf damarları bulunmaz (12). Bu nedenle beslenmesi lamellar arasındaki aralıklarda dolaşan doku sıvısı ile olur. Sinirleri de duyu siniri olup, nervus trigeminusun oftalmik dalından ve uzun silyer sinirler aracılığı ile gelen myelinsiz liflerdir. Ön stromada Bowman membranı altında ve epitelde sonlanırlar. Korneada ağrı ve soğuk reseptörleri daha fazla, ısı ve dokunma duyusu reseptörleri daha azdır. Bu nedenle kornea ağrıya çok duyarlı bir dokudur (13).

Korneanın anatomik yapısı birbirinden farklı 5 tabakadan oluşur:

2.2.1. Epithelium anterius (Epitel): 50-90 µ kalınlıkta olup, 5-6 katlı yassı epitel hücrelerinden oluşur ve korneanın ön yüzünü örter (12). En dışta, 2-3 sıra halinde yassı, horizontal nukleuslu ve zonula okludenslerle birbirine bağlı yüzey hücreleri bulunur. En dıştaki hücrelerin yüzeyi mikrovillus ve mikropililerle genişlemiştir ve bunun absorpsiyonunu kolaylaştırarak korneanın ıslanmasına yardım eder (13). Bu hücrelerin yaşam süreleri birkaç gündür. Nervus ophtalmicus'a ait bol miktarda sensitif sinir lifleri en yüzeyel epitel hücrelerine kadar sokulurlar. Bu nedenle kornea çok hassastır ve en ufak bir temasla dahi refleks olarak göz kapağını kapatır ve gerekirse gözyaşı salgılatır. Bu epitel hücrelerinin rejenerasyon kabiliyeti de yüksektir (12).

2.2.2. Lamina limitans anterior (Bowman membranı): Bazal membrana karşılık olan bu tabaka oldukça kalın olup, sık örgülü ağ şeklinde liflerden oluşur. Kornea stromasının modifikasyonu ile oluşan asellüler bir tabakadır (12). Epitelin bazal membranı bu kata düzensiz filamanlar ile sıkıca tutunur. Bir travmadan sonra bu bağlantının yeniden oluşması 6 hafta kadar sürebilir. Bu katın kendini onarma kapasitesi yoktur ve skar dokusu gelişir. Epiteldeki olayların stromaya geçişini engelleyen önemli bir bariyerdir (13).

2.2.3. Substantia propria (Stroma): Korneanın en kalın tabakası olup, yaklaşık 60 katlı lamel yapısındadır (12). Kornea kalınlığının %90'ını oluşturur. Kollajen lif demetlerinden meydana gelir. Çapları 1 μ olan ve lamel denilen bu lif demetleri birbirlerini dik açı ile çaprazlar ve mukoprotein ve glikoproteinden oluşan bir ara madde içinde yer alırlar (13). Lameller arasında korneayı besleyen sıvının dolaştığı dar aralıklar bulunur. Bu tabakadaki şeffaf lifler, aslında skleradan buraya kadar uzanan liflerdir. Korneada damar bulunmadığı için, bu aralıklarda dolaşan sıvı tarafından beslenir (12).

2.2.4. Lamina limitans posterior (Descement membranı): Stromanın arkasında amorf bir materyal ve altıgen şeklinde düzenlenmiş ince fibrillerden oluşan bir membrandır ve endotel hücrelerinin bazal laminasıdır. Elastik, homojen ve şeffaf çok ince bir tabakadır (13).

2.2.5. Epithelium posterius (Endotel): Merkezlerinde geniş ve oval nukleusları olan tek katlı poligonal yassı hücrelerden oluşan bir kattır. Makula okludenslerle birbirlerine sıkıca bağlıdırlar. Korneanın dehidrasyonunu sağlamada çok önemli bir rolü vardır. Yaşlanma ile sayıları gittikçe azalır ve rejenerasyon yetenekleri yoktur. Boş bölgeleri doldurmak için çevre hücreler yayılım gösterir (13).

2.3. Kornea Fizyolojisi

Korneanın stroma tabakasındaki kollajen fibrillerinin arasında stromaya ait hücreler yani keratositler yer alır. Keratositler stromanın hacminin %3-%5'i gibi küçük bir kısmını oluştururlar. Kornea stromasındaki kollajen fibrilleri tip I ve tip V kollajenden meydana gelir. Kollajen fibrillerinin arasında bulunan proteoglikanlar oldukça asidik makro moleküllerdir. Bunların başlıcaları keratan sülfat ile kondroitin sülfattır. Kollajen fibrillerinin arasında yer alan proteoglikanlar fibriller arası mesafeyi koruyarak, düzenli yapının korunmasını dolayısıyla korneanın saydamlığının devamını sağlarlar. Kornea endoteli de hümör aközün stromaya girişini, dolayısıyla stroma fibrillerinin düzeninin bozulmasını engeller. Bunu hem mekanik bir bariyer görevi görerek hem de metabolik bir pompa olarak faaliyet göstererek gerçekleştirir. Kornea endoteli bu görevini başarı ile yerine getirdiği sürece, stromanın su içeriği yaklaşık %78, kornea kalınlığı da 520 mikron civarında kalır. Endotel hücrelerinin bariyer fonksiyonlarının temelinde tight junctionlar ve gap

junctionlar rol oynar. Hücreler arası temas noktalarındaki önemli kısımları oluşturan bu bölgeler endotelin bariyer fonksiyonunu sağlarlar. Kornea endotelinde yer alan, metabolik pompayı, endotel hücrelerinin lateral membranlarında lokalize olan sodyum-potasyum adenozin trifosfataz (Na-K ATP'az) oluşturur. Sodyum-potasyum pompası, hücreler arası boşluğa sodyumun atılmasını sağlayarak sodyum ile birlikte su moleküllerinin de kornea dışına, kamaralar sıvısına atılmasını gerçekleştirir. Bu şekilde, stromadan kamaralar sıvısına doğru sürekli bir su akımı söz konusudur. Kamaralar sıvısından stromaya doğru olan su akımı ise tight junctionlar tarafından önlenmiş olur. Endoteldeki Na-K ATP'azın etkin biçimde çalışabilmesi için, endotel hücrelerinde bulunan karbonik anhidraz enziminin aracılık ettiği bir reaksiyonun gerçekleşmesi gerekir. Bu reaksiyonda karbondioksit ve su, karbonik anhidraz enzimi aracılığı ile hidrojen iyonu ve bikarbonat iyonuna ayrılır. Bikarbonat iyonu ile klor pompası devreye girer ve hücre içine klor girerken, hücre dışına hidrojen iyonu atılır. Aynı zamanda, bikarbonat iyonu da hücreler arası boşluğa atılmış olur. Meydana gelen bikarbonat iyonu Na-K ATP'az pompasının çalışması için gerekli olan ortamı sağlamış olur (13).

Kornea endotelinin bütünlüğünün korunması stromanın saydamlığının korunması açısından son derece önemlidir. Gençlerde mm²'ye düşen hücre sayısı 3500-4000 iken, bu rakam yaşlılarda 2500 civarındadır. Poligonal yapıdaki endotel hücreleri doğumdan sonra yeniden çoğalma özelliği göstermedikleri için, endotelde meydana gelebilecek bir hasar endotel hücrelerinin genişleyerek yayılmaları ve ortaya çıkan boşluğu doldurmalarıyla giderilmiş olur (13).

2.4. Oküler Savunma Mekanizmaları

Temel olarak mekanik, anatomik, immünolojik ve mikrobiyolojik faktörler; mikroorganizmaların kolonizasyonuna, enfeksiyon oluşturmaya ve yayılmasına karşı korumayı sağlar (14).

Oküler savunmanın ana kaynağı, konjonktiva, göz kapakları ve lakrimal glandın lakrimal arter, superior ve inferior medial palpebral arterler ve oftalmik arterlerin dalları tarafından beslenmesine bağlıdır. Göz enfeksiyonlarında vazodilatasyon sonucu lökositlerin migrasyonu gerçekleşir. Kornea ise kan

damarından yoksundur. Buna bağılı olarak immünolojik mekanizmalar korneada daha zayıftır (15, 16).

Kan damarlarına ek olarak lenfatik damarların da immün yanıtta rolü vardır. Bunlara ek olarak intakt epitelyal yüzey, düşük yüzey ısısı, düşük gözyaşı pH'ı, makrofajların varlığı ve göz kırpmaya hareketi doğal direnç mekanizmalarındandır. Bu mekanizmalar mikroorganizmaları hem oküler yüzeyden uzaklaştırıcı hem de mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etki gösterir (15, 17, 18).

Oküler yüzey, farklı mekanizmalar yoluyla mikrobiyal kolonizasyona karşı dirençlidir (19, 20). Gözkapığı yabancı maddelere karşı mekanik bir engel görevi görür. Göz kırpmaya refleksinin de gözyaşı musun tabakası ile temizlik görevi vardır. Gözyaşı film tabakasının en önemli fonksiyonu mekanik yıkama etkisidir. Göz küresi yüzeyinin devamlı yıkanması, kornea enfeksiyonlarının oluşmasında ilk adım kabul edilen mikroorganizmaların göze yapışmasını önlemektedir. Örneğin; gözyaşı içerisinde bulunan musun *Candida* türlerinin kontakt lenslere tutunmasını engeller (14, 17, 21, 22). Gözyaşı proteinleri hem koruyucu hem de immün yanıtı uyarıcı görev yapmaktadır. Önemli gözyaşı proteinleri arasında prealbumin, albümin, seruloplazmin, transferrin ya da laktoferrin, İmmünglobulin (Ig) A, IgG ve lizozim yer alır. Major gözyaşı proteinleri prealbumin, IgA, lizozim ve laktoferrindir. Ayrıca gözyaşı içerdiği laktoferrin, β -lizin ve IgA yardımıyla antimikrobiyal özellik göstermektedir. Laktoferrin, lakrimal bezlerden salgılanır ve granülosit ve makrofaj kaynaklı koloni stimule edici faktör salgılanmasında rol alır (23, 24). Lizozim, mikroorganizmaların agregasyonunu engeller ve IgA aracılığıyla bakteri lizisini kolaylaştırır. IgA da mikroorganizmaların oküler yüzeye penetrasyonunu engeller. Korneada IgG ve IgA düzeyleri eşittir ancak IgM düzeyi daha düşüktür.

Kornea yüzey epitel hücrelerinin fagositoz yeteneği bulunmaktadır. Albumin korneanın periferinde santrale göre daha fazla bulunur. İmmünglobulinler stromada epitele göre daha fazla bulunur (25).

2.5. Korneanın Savunma Mekanizmaları

Kornea yüzeyi keratinize olmayan çok katlı yassı epitel hücrelerinden oluşur. Limbus bölgesi dışında kornea dokusu avasküler yapıdadır ve lenfatik drenajı yoktur. Kornea epiteli bariyer fonksiyonunun yanı sıra göz yüzeyinin korunmasında da aktif

rol oynar. Kornea epitel hücreleri mikrobik invazyona karşı immün yanıtı aktive eden sitokinleri salgırlar. Sitokinlerden interlökin-1 α (IL-1 α) epitel hücreleri ve keratositler tarafından salgılanarak immün yanıtın artmasına yol açar. Epitel hücreleri içinde depolanan IL-1 α , hücrenin mikroorganizma veya travma sonucu hasar görmesi ile pasif olarak ortama salınır (17). IL-1 α 'nın aşırı salgılanması sonucu artmış immün cevaba bağılı olarak korneada neovaskülarizasyon ve kornea hasarı gelişebilir. Kornea epitel hücrelerinin aynı zamanda IL-1 α antagonisti olan IL-1 α reseptörünü salgılama fonksiyonu da mevcuttur. Kornea epitelinin IL-1 α 'nın etkisini değıştirebilmesi görmenin korunmasında önemli rol oynar (17).

Kornea stromasında yer alan keratositler interlökin-6 (IL-6) ve defensin salgırlar. Defensin bakteri, virus ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite gösterir ve epitel iyileşmesini hızlandırır. IL-6, IL-1 α ile sinerjik etki gösterir (17).

Kornea sinirleri de oküler yüzey savunmasında önemlidir. Korneadaki ağrı veya rahatsızlık hissi sitokin aktivitesini artıran nöropeptitlerin salınımına yol açar (17). Bu nöropeptitler insan kornea epitel hücrelerine bağılanarak interlökin-8 (IL-8) sentezini ve buna bağılı nötrofil miktarını artırır. Komplemanlar, kemotaksinler gibi aktif moleküllerin oluşmasına yol açan regülatör proteinlerdir. Komplemanlar kornea periferinde santral korneaya göre daha yoğun olarak bulunurlar (17).

2.6. Mikrobiyolojik Tanıda Genel Prensipler

Göz hekimleri genellikle enfeksiyonlara yaklaşımda önce ampirik tedavi ile başlamakta ve laboratuvarı pek kullanmamaktadırlar. Bunun nedenleri arasında laboratuvardan çıkan düşük yüzdeli sonuçlar, tedavi maliyetlerinin artması ve ampirik tedavi ile yüksek başarı oranlarına inanmak yer alır (26, 27).

Göz enfeksiyonlarında çok sayıda mikroorganizma etken olabilmektedir. Buna karşın alınabilecek örnek miktarı çok azdır ve hemen kuruma eğilimindedir. Bu nedenle mikrobiyolojik inceleme için örnek alınacağı zaman;

- Göz hekimi – mikrobiyolog iletişim içinde olmalı,
- Örnek, göz hekimi tarafından uygun tekniklerle alınmalı,

- Örnek, enfeksiyon gelişiminden hemen sonra antimikrobiyal yada steroid damlatılmadan hemen sonra alınmalı,
- Örnekler alındığı yerde (poliklinik, klinik, ameliyathane vs.) besiyerlerine ekilmeli ve hızlıca laboratuvara ulaştırılmalı,
- Hasta başı kültür işlemleri yapılamıyorsa, örnek laboratuvara gönderilirken içerdiği etkenin laboratuvara ulaşınca kadar canlı korunması için özen gösterilmeli ve hızlıca laboratuvara ulaştırılmalı,
- Çocuk ve genç erişkinlerde örnek alırken sedasyon gerekebilmekte. Koruyucu madde içermeyen topikal anestetik damlalar, çok kullanımlı lokal anestetiklere oranla daha az antiseptiktir. Oküler yüzeylerde kültür örneği alımı için proparacaine hidroklorikası (HCI) %0,5 tercih edilir.

Göz enfeksiyonlarında alınabilecek örnek miktarı genellikle çok az olduğundan, bu materyalden etkin bir şekilde yararlanmak gerekir. Miktarca az olan bu örnekler hemen kuruma eğilimindedir. Bu nedenle alınan örnekler alındığı yerde (poliklinik, klinik, ameliyathane vs.) besiyerine ekilmeli ve hızlıca laboratuvara ulaştırılmalıdır (26).

2.7. Gözün Mantar Enfeksiyonlarında Mikrobiyolojik İnceleme

Oküler fungal enfeksiyonlar, görme açısından ve etiyolojide artan rol almaları nedeniyle, ayrıca bazı türlerinin hayatı tehdit edici yönü ile erken tanınmaları gerektiğinden, oftalmolojide acil hastalıklar grubunu oluşturur. Keratit en sık karşılaşılan enfeksiyon şekli olmakla birlikte, orbita, kapak, lakrimal bez, konjonktiva, sklera ve intraoküler enfeksiyonlara da rastlanmaktadır. Sağlıklı ve intakt oküler dokuda nadiren enfeksiyon yaptıklarından gözde fırsatçı enfeksiyonlar olarak yer alırlar (28).

2.8. Fungal Keratitler

İlk fungal keratit olgusunun 1879 yılında yayınlanmasına ve bundan sonraki süre içerisinde oküler enfeksiyonların tedavisi konusunda gerçekleşen tüm ilerlemelere rağmen, fungal keratitler oftalmolojinin halen en ürküten

hastalıklarındandır (29). Keratoplasti gerektiren mikrobiyal keratitlerin yaklaşık %50'sini fungal keratitler oluşturmaktadır (30).

Fungal keratit insidansı, risk faktörleri ve etkenin tipi coğrafi bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak bakteri keratitlerine göre daha az görülür (25). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'den bildirilen klinik serilerde kornea enfeksiyonlarının %5-10'undan daha azını oluşturmaktadır (31). Güney Hindistan'da ise görülme sıklığı belirgin bir şekilde yüksek olup en önemli körlük nedenidir (32). Ülkemizde Ege Bölgesi'ndeki 620 enfeksiyöz keratit olgusunun değerlendirildiği bir çalışmada, 225 olguda kültürde üreme olmuş ve bunun da %22,3'ünü fungal keratitler oluşturmuştur (33).

Özellikle son 40 yıl içerisinde fungal keratitlerin sıklığında artış olduğu gözlenmektedir. Bu durumdan geniş spektrumlu antibiyotik ve steroidlerin kullanımındaki artış, kontakt lens kullanım sıklığı ve süresindeki artış, kornea cerrahisi, özellikle de penetran keratoplasti (PK) uygulamalarındaki artış sorumlu tutulmaktadır. Göz hekimlerinin fungal keratit konusundaki bilgilerinin artmasının yanı sıra, fungal enfeksiyonların tanısında kullanılan laboratuvar tekniklerin gelişmesi de bildirilen olgu sayısındaki artışa katkıda bulunmuştur. Bununla birlikte, enfeksiyöz etkenin saptanması hiç de kolay olmamakta, tekrarlayan kazıntı veya biyopsi materyali gerekebilmektedir. En kesin tanı, PK sırasında çıkarılan korneanın histopatolojik incelenmesi ile konulmaktadır. Kornea kültüründe üreme günler hatta haftalar sürebilmektedir (29).

2.8.1. Normal Fungal Flora

Sağlam kornea epiteli mantarlara dirençlidir. Normal göz florasında *Candida* türleri en sık görülen mantarlardır (4). Gözün normal mantar florası genellikle çevresel koşullara göre değişmektedir ve kırsal kesimlerde yaşayanlarda daha fazla mantar izole edilmektedir. Ayrıca son yıllarda antibiyotik ve steroid kullanımındaki artışa bağlı olarak da normal mantar florasında artış görülmektedir. En sık görülen mantarlar *Aspergillus* türleri, *Rhodotorula* türleri, *Candida* türleri ve *Penicillium* türleridir (34, 35). *Fusarium* türleri ve *Cephalosporium* türlerinin de normal florada bulunduğunu bildiren yayınlar vardır (36).

2.8.2. Etkenler

İnsan korneası için etken sayılan yüzden fazla mantar türü bulunmaktadır (29). Bu mantar türleri başlıca beş gruba ayrılmaktadır (28):

2.8.2.1. Filamentöz mantarlar: *Fusarium* türleri, *Aspergillus* türleri, *Scedosporium* türleri, *Paecilomyces* türleri, *Acremonium* türleri.

2.8.2.2. Esmer mantarlar: *Bipolaris* türleri, *Curvularia* türleri, *Exophiala* türleri, *Lecytophora* türleri, *Lasioidiplodia theobroma*.

2.8.2.3. Maya mantarları ve zigomiçetler: *Candida* türleri, *Cryptococcus* türleri, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor ramosissimus*, *Rhizomucor pusillus*, *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*.

2.8.2.4. Dimorfik mantarlar: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*.

2.8.2.5. Tam olarak sınıflandırılmayanlar: *Pythium insidiosum*, *Rhinosporidium seeberi*, *Pneumocystitis carinii*.

Filamentöz mantarlar fungal keratitlerin en önemli etkenleridir. Bunlar arasında en sık görülenleri *Fusarium* ve *Aspergillus* türleridir (32, 37). *Curvularia* ve *Bipolaris* türleri birçok çalışmada fungal keratitlerin üçüncü önemli nedeni olarak sayılmaktadır (28, 37). Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada ise *Fusarium* türleri ilk sırayı alırken, bunu *Candida* ve *Aspergillus* türleri izlemiştir (33).

Enfeksiyona yol açan mantar türlerinin sıklığı ülkeye ve iklime göre değişmektedir. Dünya genelinde fungal keratitlerin en önemli sorumlusu olan *Aspergillus* türleri ılık, nemli iklimlerde ve tarım bölgelerinde daha fazladır. Maya mantarları, özellikle de *Candida* türleri ABD'nin kuzey ılıman bölgelerinde daha sık görülürken, tropikal bölgelerde *Aspergillus* veya *Fusarium* türleri gibi filamentöz mantarlar daha sık izole edilmektedir (3, 29).

Esmer mantar enfeksiyonlarının ise yaz aylarının sonlarında başlayıp sonbahar boyunca sürdüğü, *Curvularia* keratitinin nemli ve ılık aylarda artış gösterdiği bildirilmektedir (38).

2.8.3. Predispozan Faktörler

Bitkisel ve organik materyallerle olan travmalar fungal keratitlerin en sık nedeni olarak bildirilmektedir (3, 31, 32). Özellikle filamentöz mantarlardan kaynaklanan keratitlerin daha çok tarımla uğraşan veya dış ortamda çalışan sağlıklı erkeklerde bitki, hayvan veya toz kaynaklı travma sonucu geliştiği kabul edilmektedir (3).

Fungal keratit her tip kontakt lens (KL) kullanımı ile gelişebilir (32). Predispozan faktörler içerisinde KL kullanımı bazı çalışmalarda son sıralarda yer alırken, bazı çalışmalarda ise %29,2'ye varan yüksek oranlarda yer almaktadır (3, 29). KL kullanan kişilerin sayısının her geçen gün artmasının yanı sıra, gece boyu KL kullanımı, kullanıcıların yaşının küçülmesi ve buna bağlı olarak KL bakımının iyi yapılamaması sonucu enfeksiyon riskinde artışlar görülmektedir (37). KL kullanımına bağlı gelişen fungal keratitlerin çoğunluğunu *Fusarium* türlerinin oluşturduğu bildirilmektedir (39).

Topikal steroid kullanımı oküler fungal enfeksiyonu arttıran önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Mikrobiyal keratiti olan hastaların %30'a varan oranlarda hastalık öncesi bir topikal steroid kullanım öyküsü olduğu bildirilmiştir (25).

Kronik oküler yüzey hastalığı, kronik herpes simpleks keratiti, nörotrofik keratit, herpes zoster oftalmikus keratit, atopik konjonktivit, rekürren erozyon, kuru göz gibi çeşitli hastalıklar da fungal keratit gelişimi açısından risk faktörleri arasında yer almaktadır (29). Kornea yüzey hastalıkları daha çok *Candida* keratitlerine zemin hazırlamaktadır (40, 41).

Nem, yağmur, rüzgar vb. çevresel faktörlerin özellikle filamentöz keratitlerin görülme sıklığını etkilediği bildirilmektedir (3). Geçirilmiş göz cerrahisi sonrasında da fungal keratit gelişebilmektedir (42, 43, 44, 45). Postoperatif uzun süreli steroid ve antibiyotik kullanımı da diğer bir faktördür (25). İmmunolojik yetersizlik ve diyabet de risk oluşturur (3). Fungal keratitli olguların %6,4'ünde diyabet saptanmıştır (45). Diyabetik hastalarda keratitin seyri de daha ağır olmaktadır (46). Sistemik hastalıkla birliktelik erişkin hastalara göre çocuklarda daha sık görülür (45). Kollagen doku hastalığı, IgA yetmezliği, eritema multiforme gibi hastalıklarla birliktelik

gösterebilir. Bu olgularda gelişen fungal keratit genellikle maya mantarlarına bağlıdır (47).

Filamentöz keratitler daha çok bitkisel maddelerle travma ve KL kullanımı sonucu gelişirken, maya türünde olanlar mevcut oküler yüzey hastalıkları veya sistemik hastalıklar, geçirilmiş keratoplasti ve topikal steroid zemininde gelişirler (3, 29, 40, 41).

2.8.4. Tanı Yöntemleri

Fungal keratitler farklı klinik şekillerde görülmesi nedeniyle tanısı her zaman çok kolay olmamaktadır (25). Göz hekimleri tarafından klinik olarak konulan enfeksiyöz keratit tanısı ile mikrobiyolojik tanının karşılaştırıldığı bir çalışmada, etiolojide fungal etkenlerin sanıldığından daha az oranda tahmin edildiği ve klinik tanının mikrobiyolojik tanıdan daha üstün olmadığı sonucuna varılmıştır (48).

Örnek alma: Laboratuvar tanısı ilk olarak uygun örnek alınması ile başlar. Fungal keratit şüphesi halinde kapak ve konjonktivadan da eş zamanlı örnek alınması önerilir (25). Kornea kazıntı örneği topikal anestezi eşliğinde Kimura spatülü, Bard-Parker bistüri veya steril bir bistüri ile alınabilir. Ülserin hem tabanından hem de kenarlarından ve mümkünse birkaç defa tekrarlayan örnek alınması gereklidir. Bununla başarılı olunamaması halinde epitelyal biyopsi, trepan ile 0,2-0,3 mm derinlikte kornea biyopsisi veya yüzeysel keratektomi yoluyla da kornea örneği alınabilir. Tanımlanmış bir diğer yöntem ise süpüratif lezyon üzerindeki epitel ve nekrotik alan kaldırıldıktan sonra 15 numara Bard-Parker bistüri ve kornea forsepsi yardımıyla kornea kalınlığının yaklaşık yarısını çıkarmaktır (3, 28). Mantarlar sağlam descement membranını geçerek ön kamaraya girebildikleri için hipopiyondan yapılan yayma ve kültürde de mantar görülebilir (25).

Mikroskopik inceleme: Alınan örneklerden direkt mikroskopik inceleme, kültür ve histolojik boyamalar yapılır. Gram boyama yöntemi ile bakterilerin yanı sıra mayalar, küfler ve *Acanthamoeba* gibi protozoaların kistleri de görülebilir. Mantarların direkt mikroskopik incelemesi için %10'luk potasyum hidroksit (KOH), Giemsa boyası, Laktofenol pamuk mavisi, modifiye Gomori methenamine gümüşleme yöntemi (GMS), Kalkoflor beyazı, Periodic acid-Schiff (PAS) ve Hematoksilen-eozin (HE) boyası gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (28, 29).

Fungal elemanlar KOH ile %91, Kalkoflor beyazı ile %91,4, Gram boyası ile %88,2 ve Giemsa boyası ile %85,1 oranında görülebilir (45). Özellikle KL kullanımına bağlı gelişen fungal keratitlerde kornea kazıntı örneğinin GMS ile boyanmasını öneren yayınlar bulunmaktadır (37). Direkt mikroskopik inceleme için alınan kornea kazıntı örneği lamın yüzeyine mümkün olduğunca ince yayılmalıdır. Direkt mikroskopik incelemenin amacı hızlı bir ön tanı elde etmektir.

Kültür: Kesin tanı koymak için en önemli yöntem kültürdür (28, 29). Kültür amacıyla sıklıkla kullanılan besiyerleri Sabouraud glukoz-pepton agar, kanlı agar, çikolata agar, sistin tripton agar, beyin kalp infüzyon et suyu ve tiyoglukolat et suyudur. Katı besiyerlerine yapılan ekimler “C” şeklinde yapılır ve sadece bu “C” çizgisi üzerindeki üremeler anlamlı kabul edilir (28, 29). Yapılan bir çalışmada fungal keratitli olgularda ilk kültürde üreme oranı %90, üreme süresi ise %54 olguda iki gün, %83 olguda üç gün ve %97 olguda bir hafta olarak bildirilmiştir (49). Genel olarak önerilen inkübasyon süresi 4-6 haftadır. Kültürdeki üreme hastanın kliniğiyle uyumluysa, aynı fungal etken en az iki ayrı katı besiyerinde üremişse, katı besiyerinin ekim alanında kısmen birleşik bir üreme söz konusuysa kültürdeki üreme anlamlı kabul edilir (25).

Kornea biyopsisi veya PK sırasında elde edilen korneanın histopatolojik incelemesi de diğer bir tanısal yöntemdir. Bazen kültürün negatif olduğu olgularda bile pozitif sonuç verebilir. Fungal keratitli hastalardan alınan kornea kazıntı örneğinin histopatolojik incelemesinde ağırlıklı olarak gözlenen inflamatuvar hücreler lenfosit ve plazma hücreleridir. Değişen derecelerde polimorfonükleer lökositler de gözlenir. Stromada koagülasyon nekrozu sonucu apse gelişimi vardır. Filamentöz mantarlar yüzeyde yer almaz, derinde stroma lamelleri arasında yerleşirler (25, 28).

Moleküler tanı: PCR yöntemi, doku örneklerinde etkeninin deoksiribonükleik asit (DNA) 'inin saptanmasını sağlayan hassas bir yöntemdir. Kültür ile tanısı zor olan mikroorganizmaları dahi hızlı bir şekilde saptar. Üstelik bunun için gerekli olan materyal miktarı da çok azdır. Örneğin 1-10 µl kadar hümor aköz, vitreus veya gözyaşı yeterli olabilmektedir. Bu yöntem daha çok fungal endoftalmilerin tanısında kullanılmaktadır (28). Canlı ve ölü organizmaları veya konjonktival forniksin normal florasında geçici olarak bulunabilen fungal etkenleri ayırt edememesi önemli bir dezavantajdır. Kültüre olan en önemli avantajı ise zamandır (28).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

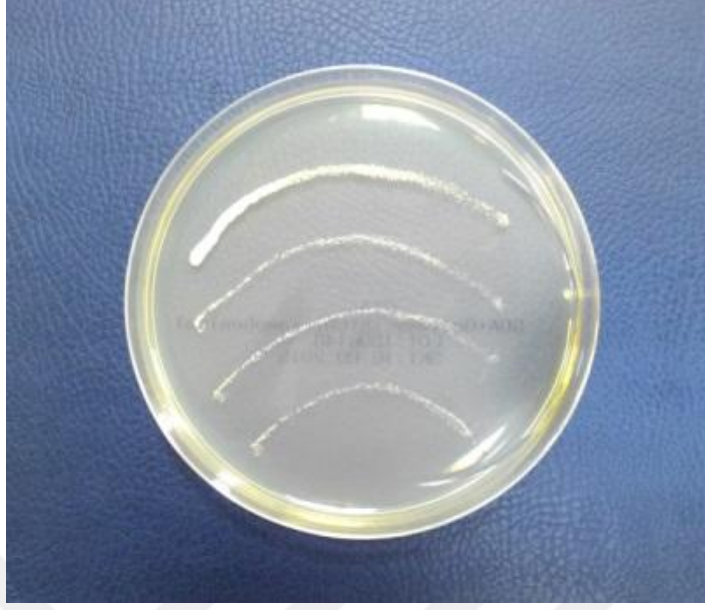
Temmuz 2014 ve Temmuz 2015 tarihleri arasındaki bir yıllık süre içerisinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvurup fungal keratit kuşkusu olan toplam 60 hastanın kornea kazıntı örneği çalışmaya dahil edildi.

3.1. Hastaların seçilmesi: Muayenesi sırasında fungal keratit kuşkusu duyulan hastalar çalışmaya alındı. Fungal keratit kuşkusu duyulduğunda, göz hastalıkları hekimi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'na telefonla haber verdi. Besiyerleri, lamlar ve 1,5 mL'lik kriyotüp alınarak hasta başına gidildi.

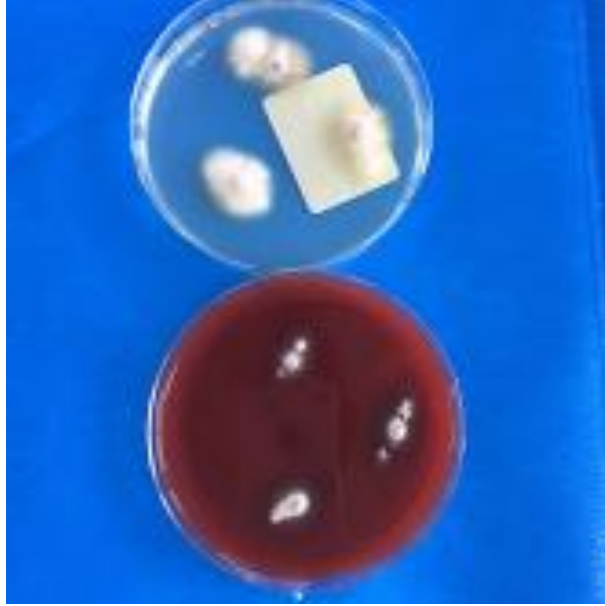
3.2. Örneklerin alınması: Kornea kazıntı örnekleri, göz hastalıkları hekimleri tarafından, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Kornea Birimi'nde %0,5 proparacaine HCI ile lokal anestezi uygulandıktan yaklaşık 15-20 dakika sonra biyomikroskop eşliğinde, steril bir bistüri ile kornea lezyonun kenarından kazınarak alındı.

3.3. Örneklerin mikroskopik incelemesi: Örneğin bir bölümünden bir miktar alınarak iki ayrı lamda mikroskopik inceleme için preparat hazırlandı. Lamlardan birine bir damla % 10'luk KOH damlatılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda 40X büyütmede incelenerek maya hücreleri ve küf hiflerinin varlığı araştırıldı. Varsa lökosit ve eritrosit varlığı da kaydedildi. Diğer lama hazırlanan preparat Gram boyama yöntemi ile boyanarak 100X büyütmede, hastaya ait hücreler, bakteri, maya hücreleri ve küf hifleri açısından değerlendirilerek görülen olası etkenler klinisyene hemen bildirildi.

3.4. Örneklerin kültürü: Örneğin bir bölümünden, hasta başında çukolata agar (bioMérieux, Fransa), koyun kanlı agar (KKA) (bioMérieux, Fransa), Eosin-methylene-blue (EMB) agar (bioMérieux, Fransa), iki tane (26°C ve 35°C'de inkübasyon için) antibiyotikli Saboraud dekstroza agar (SDA) (bioMérieux, Fransa) ve Staib agar (laboratuvarımızda hazırlanmıştır) besiyerlerine 'yarım ay' ya da 'C' şeklinde çizilerek ekimleri yapıldı (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. Antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki yarım ay şeklinde ekim ve üreme.



Şekil 2. Antibiyotikli SDA (26°C) ve KKA (35°C) besiyerindeki örnekten üç damla damlatılarak ekim ve üreme.

Laboratuvarında kültür plaklarının etrafı oksijen geçirgen bant ile sarılarak Staib besiyeri ve bir SDA plak 26°C’de, diğer plaklar 35°C’lik etüvde inkübe edildi.

Dördüncü hastaya kadar bu şekilde sürdürülen örnek alma ve işleme yöntemi, dördüncü hastadan itibaren değiştirildi. Alınabilen örnek miktarının çok az olması ve kültür amacı ile kullanılan besiyeri sayısının fazla olması nedeni ile alınan örnek miktarının direkt mikroskopik inceleme, kültür ve konvansiyonel PCR için yeterli olmadığı görüldü. Bundan sonra, alınabilen tüm örneklerin hasta başında 1 mL steril tuzlu su içeren 1,5 mL’lik kriyotüpe alınarak diğer işlemlerin laboratuvarında yapılmasına karar verildi ve bu şekilde devam edildi. Ayrıca ekimler ‘C’ şeklinde yapılmayıp, her besiyerinde eşit aralıklarla üç noktaya örnekten birer damla damlatılarak yapıldı ve sadece bu damlaların olduğu yerdeki üremeler etken kabul edildi.

Kültür plakları 10 gün inkübe edilerek üreme varlığı açısından gönaşırı değerlendirildi. Birden fazla kültür plağında aynı mikroorganizmanın üremesi, tek bir kültür plağında sadece ekim yerlerinde üremenin olması ve örneğin mikroskopik incelemesinin pozitif olması durumunda üreyen mikroorganizma etken olarak kabul edildi (8). Üreme saptandığında koloniler önce gözle değerlendirildi, sonra tuzlu suda preparatlar hazırlanarak üremenin bakteri veya maya olduğu ayırt edildi. Bakteriler ve mayalar Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak adlandırıldı. Küf kolonileri; koloni şekli, rengi, örgüsü üreme süresi açısından değerlendirildikten sonra koloniden selofan bant yöntemi ile Laktofenol pamuk mavisi preparatı hazırlanarak mikromorfolojileri (hiflerin bölmeli/bölmesiz olmaları, konidyum şekil ve yapıları) değerlendirilerek etkenler adlandırıldı. Üreyen mantarlar stoklandı.

3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu: Mikroskopik inceleme ve kültür işleminden sonra kalan örnek, 1 mL steril distile su içeren 1,5 mL’lik kriyotüpe alınarak konvansiyonel PCR yöntemi uygulanıncaya kadar -80°C’de saklandı.

Çalışma gününe kadar -80°C’de saklanan örnekler dondurucudan çıkarıldı. Örneklerden DNA ekstraksiyonu için Fluorion® i12 Nükleik Asit İzolasyon Kiti (İontek, Türkiye) kullanıldı ve üretici firma önerileri doğrultusunda ekstraksiyon uygulandı. Primer olarak panfungal primerler, Internal transcribed spacers-1 (ITS1)

(5'TCC GTA GGT GAACCT GCG G-3') ve ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (İontek, Türkiye) seçildi (50).

PCR karışımı örnek başına toplam 25 µl olacak şekilde; 12,5 µl QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen, Almanya), 2,5 µl ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3') primeri, 2,5 µl ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3') primeri, 5 µl kalıp DNA ve 2,5 µl steril nükleaz içermeyen distile su kullanılarak hazırlandı.

PCR tüpleri ısı döngü cihazına (Applied Biosystems Veriti®96-Well Thermal Cycler, ABD) yerleştirildi. PCR için ısı döngü programı; 94°C'de 15 dakikalık bir döngü başlangıç denatürasyonunu takiben, 95°C'de 40 saniye denatürasyon, 59°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 40 saniye uzama olmak üzere toplam 45 döngü ve 72°C'de 5 dakikalık bir döngü son uzama şeklinde uygulandı. PCR ürünleri 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %1,5'lik agaroz jelde 100 volt gücünde yaklaşık 50 dakika elektroforeze tabi tutularak mantarlara özgü DNA bantları ultraviyole ışık altında incelendi.

Standart kontroller; negatif kontrol olarak steril nükleaz içermeyen distile su ve *Staphylococcus aureus* kolonilerinden 10⁶ CFU/mL yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan süspansiyondan, pozitif kontrol olarak da hasta örneklerinin kültüründe üreyen *Fusarium spp.*, *Alternaria alternata*, *Candida albicans* kolonilerinden hazırlanan süspansiyonlardan DNA izolasyonu yapılarak kullanıldı.

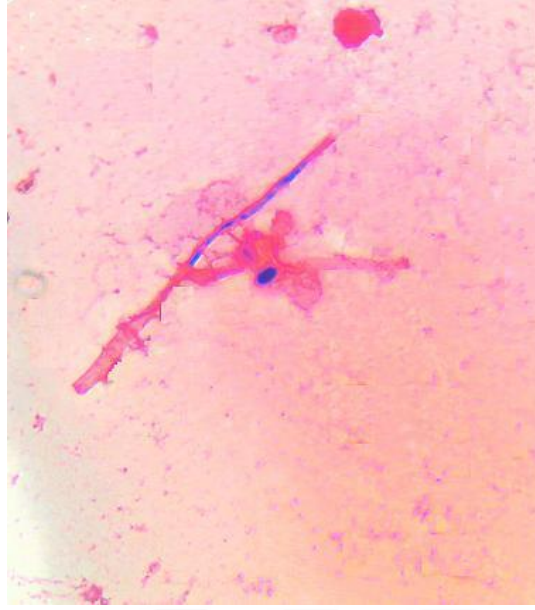
4. BULGULAR

Temmuz 2014 ve Temmuz 2015 tarihleri arasındaki bir yıllık sürede 60 kornea kazıntı örneği çalışmaya dahil edildi. Kornea kazıntı örneği alınan toplam 60 hastanın 23 (%38,4)'ü kadın, 37 (%61,6)'si erkekti. Hastaların yaş ortancası 49 (3-85) olarak bulundu.

Altmış örneğin beş (%8,3) tanesinin direkt ve gram boyalı preparatlarının mikroskopik incelemesinde bol lökosit ve hiyalen, bölmeli, enleri eşit genişlikte olmayan mantar hifleri görüldü (Şekil 3 ve 4).



Şekil 3. Kültüründe *Fusarium spp.* üremesi olan kornea kazıntı örneğinin, koloniden %10'luk KOH ile hazırlanan preparatının mikroskopik incelemesinde hiyalen mantar hiflerinin görünümü (40X).



Şekil 4. Kültüründe *Fusarium spp.* üremesi olan kornea kazıntı örneğinin Gram boyalı mikroskopik incelemesinde enleri düzensiz ve bölmeli mantar hiflerinin görünümü (100X).

Bunlardan üçünün kültüründe, inkübasyonun üçüncü gününde *Fusarium spp.* üredi, ikisinin kültüründe üreme olmadı. Üç örneğin mikroskopik incelemesinde sadece bol lökosit görüldü. Bu üç örnekte sırasıyla *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Streptococcus pneumonia* üredi. Bir örnekte bol lökosit ve bol eritrosit görüldü ve kültüründe *Escherichia coli* üredi. Bir örneğin mikroskopik incelemesinde bol lökositlerin yanında Gram (+) koklar görüldü ve kültüründe *Staphylococcus aureus* üredi. Dört örneğin mikroskopik incelemesinde hastaya ait hücre veya mikroorganizma görülmemesine rağmen kültürlerinde üreme oldu. Bu dört örnekten iki tanesinde *Pseudomonas aeruginosa*, diğer ikisinin birinde inkübasyonunun ikinci gününde *Candida albicans* ve diğerinde beşinci günde *Alternaria alternata* üredi (Tablo 1).

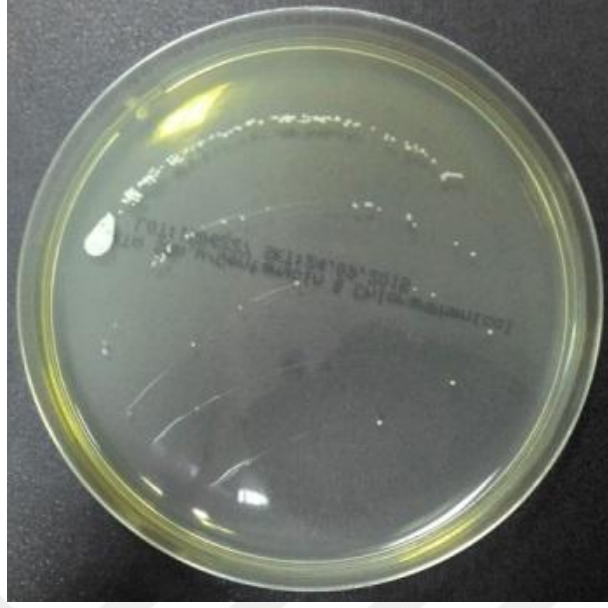
Tablo 1. Kornea kazıntı örneği direkt mikroskopik inceleme, kültür ve konvansiyonel PCR ile pozitif bulunan hastaların yaş, cinsiyet ve mikrobiyolojik özellikleri.

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Direkt ve Gram boyalı mikroskopik inceleme sonucu	Kültürde üreyen etkenler	PCR
1	K	78	-	<i>Candia albicans</i>	+
2	E	49	Bol lökosit ve hiyalen hifler	-	+
3	E	25	Bol lökosit ve hiyalen hifler	-	+
4	E	55	-	<i>Alternaria alternata</i>	+
5	E	31	Bol lökosit ve hiyalen hifler	<i>Fusarium spp</i>	+
6	E	56	Bol lökosit ve hiyalen hifler	<i>Fusarium spp</i>	+
7	K	74	Bol lökosit ve hiyalen hifler	<i>Fusarium spp</i>	+
8	E	84	Bol lökosit ve Gram (+) koklar	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
9	E	25	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
10	K	57	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
11	E	85	Bol lökosit	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
12	K	50	Bol lökosit	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
13	E	41	Bol lökosit	<i>Streptococcus pneumonia</i>	-
14	K	76	Bol lökosit ve bol eritrosit	<i>Escherichia coli</i>	-

(K: Kadın, E: Erkek, (+): Olumlu, (-): Olumsuz).

Altmış örnekten 12 (%20) tanesinin kültürlerinde üreme saptandı. Bunların yedi (%11,6) tanesinde KKA besiyerlerinde olan üremeler bakteri üremesi olarak değerlendirildi ve identifikasyonları Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda yapıldı (Üç örnekte *Pseudomonas aeruginosa*, bir örnekte *Staphylococcus aureus*, bir örnekte *Staphylococcus epidermidis*, bir örnekte *Streptococcus pneumoniae* ve bir örnekte *Escherichia coli* üredi).

Toplam beş (%8,3) örnekte antibiyotikli SDA besiyerlerinde (26°C ve 35°C) mantar (maya mantarı ve küf mantarı) üremesi oldu. Bunların bir tanesi Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak *Candida albicans* olarak tanımlandı (Şekil 5). Üç örneğin kültüründe *Fusarium spp.* ve bir örnekte *Alternaria alternata* üredi.

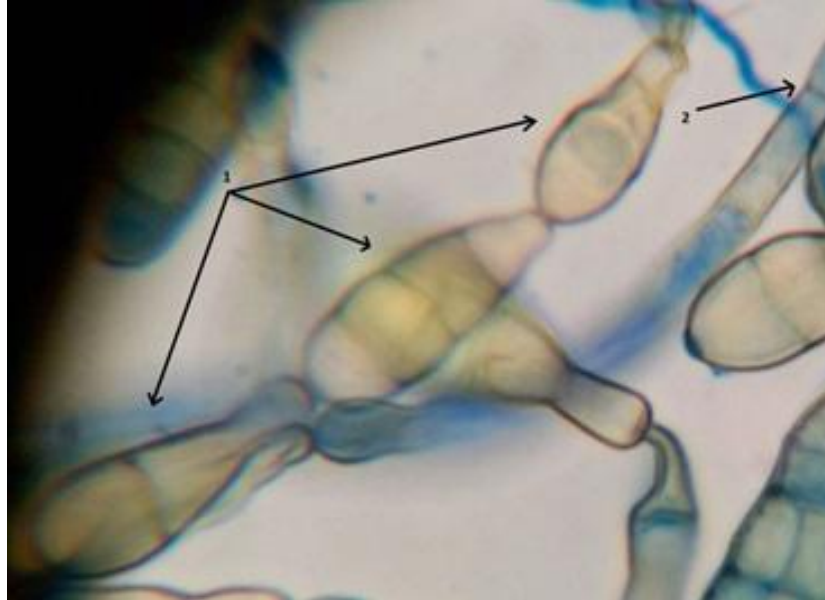


Şekil 5. *Candida albicans* saptanan örneğin antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki koloni görünümü.

Üreme yönünden gūnaşırı değēlendirilmesi yapılan kűltűr plaklarında űreyen kűf mantarı kolonilerinin űnce morfolojik tanımlamaları, daha sonra bu kolonilerden selofan bant yöntemi ile Laktofenol pamuk mavisi preparatları hazırlanarak mikromorfolojik incelemeleri yapıldı ve etkenler adlandırıldı. Dűrt numaralı űrneğın (Tablo 1) kűltűrűnde beşinci gűnde antibiyotikli SDA besiyerinde (26°C) kenarları beyaz, ortası yeşilimsi ve zamanla tűm koloni yűzeyi koyu yeşil-siyaha dűnűşen, koloni tabanı siyah renkte olan sık pamuğumsu űrgűde kűf kolonileri geliştı (Şekil 6). Koloninin mikromorfolojik incelemesinde; koyu renkli, bűlmeli hifler ve çok sayıda tek tek ya da ardışık dizilmiş, enine ve boyuna bűlmeli, iğsi yapıda, bir ucu daha yuvarlak olup diğē ucunda kısa gagamsı uzantıları olan kahverengi-siyah koyu renkli konidyumlar gűrűldű (Şekil 7). Bu makroskobik ve mikroskobik gűrűnűm ile etken *Alternaria alternata* olarak adlandırıldı.

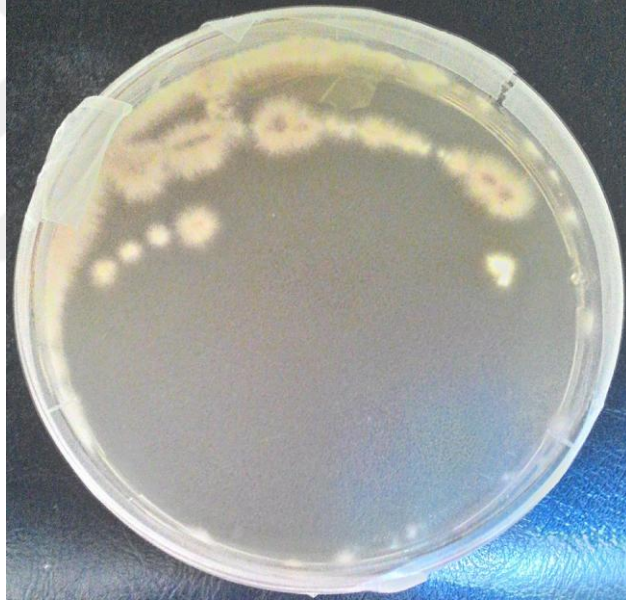


Şekil 6. *Alternaria alternata* üremesi olan örneğin antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki koloni görünümü.

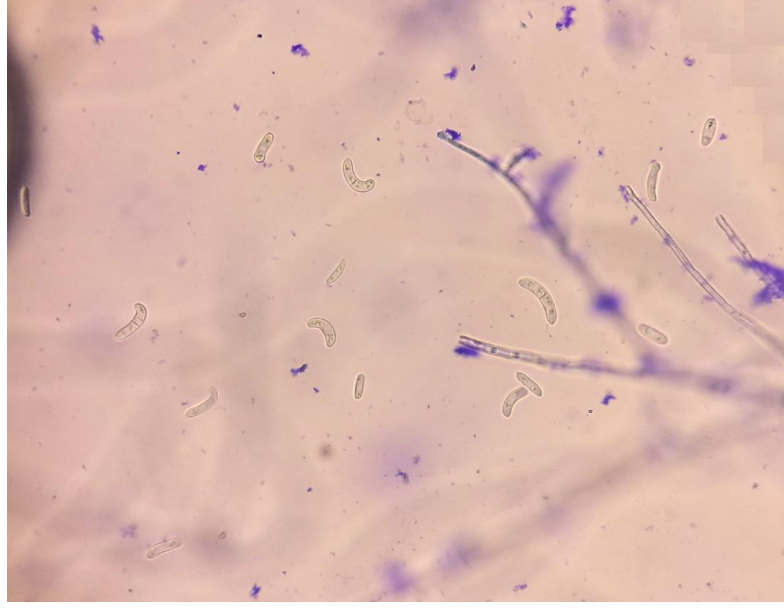


Şekil 7. *Alternaria alternata* olarak adlandırılan koloniden yapılan selofan bant yöntemi ile Laktofenol pamuk mavisi preparatının mikroskopik görünümü (40X).

Beş, altı ve yedi numaralı örneklerin (Tablo 1) kültürlerinde dördüncü günde antibiyotikli SDA besiyerinde (26°C) beyaz, gevşek pamuğumsu örgüde küf kolonileri görüldü (Şekil 8). Görünüm olarak başlangıçta *Acremonium* veya *Fusarium*'u anımsatan kolonilerin yüzeylerinde sonraki iki-üç günde morumsu renk oluştu. Koloniden yapılan selofan bant yöntemi ile Laktofenol pamuk mavisi preparatının mikromorfolojik incelemesinde; düzgün duvarlı, bölmeli, hiyalen hifler ve çok sayıda, iğsi-muzumsu yapıda, ikili ve beşli bölmeleri olan konidyumlar görüldü (Şekil 9). Bu makroskobik ve mikroskobik görünüm ile etkenler *Fusarium spp.* olarak adlandırıldı.



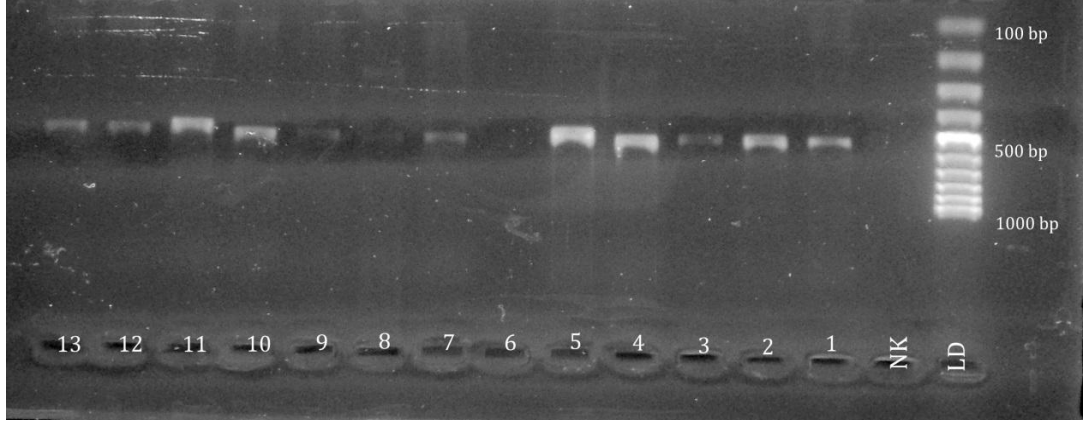
Şekil 8. *Fusarium spp.* üremesi olan örneğin antibiyotikli SDA (26°C) besiyerindeki koloni görünümü.



Şekil 9. *Fusarium spp.* olarak adlandırılan koloniden yapılan selofan bant yöntemi ile Laktofenol pamuk mavisi preparatının mikroskopik görünümü (40X).

Panfungal primerler ile yapılan konvansiyonel PCR sonucunda yedi (%11,6) örnekte mantar DNA'sı saptandı (Şekil 10). Moleküler ağırlık marker'ı ile karşılaştırıldığında 500-600 baz çifti büyüklüğünde PCR ürünleri elde edildi. Konvansiyonel PCR ile mantar DNA'sı saptanan yedi örneğin, beş tanesinin mikroskopik incelemelerinde bol lökosit ve hiyalen hifler görüldü. Bu beş örneğin; üç tanesinin (Kolon 7, 8, 9) kültüründe *Fusarium spp.* üredi ve iki tanesinin (Kolon 12, 13) kültüründe üreme olmadı. Konvansiyonel PCR ile mantar DNA'sı saptanan iki örneğin (Kolon 10, 11) mikroskopik incelemelerinde lökosit ve mantarlara ait hücreler görülmedi ancak bunların kültürlerinde; birinde *Candida albicans*, diğerinde *Alternaria alternata* üredi.

Direkt mikroskopik inceleme, kültür ve konvansiyonel PCR yöntemleri ile ortak olarak üç (%5) örnekte pozitiflik saptandı. Kültürde negatif olup, direkt mikroskopi ile konvansiyonel PCR pozitifliği olan iki örnek; direkt mikroskopisi negatif, kültür ile konvansiyonel PCR pozitifliği de olan iki örnek saptandı. Mikroskopik incelemesinde mantara ait yapılar görülmeyen ve kültüründe üreme olmayan diğer tüm örneklerde mantar DNA'sı saptanmadı.



Şekil 10. ITS1 ve ITS4 primerleriyle amplifikasyon sonrası jel elektroforez görüntüsü (LD: Moleküler ağırlık marker'ı; NK: Negatif kontrol; Kolon 1, 2 ve 3: Örneklerin kültüründe üreyen *Fusarium* kolonilerinden; Kolon 4: Örneğin kültüründe üreyen *Alternaria* kolonisinden; Kolon 5: Örneğin kültüründe üreyen *Candida albicans* kolonisinden; Kolon 6: Örneğin kültüründe üreyen *Staphylococcus aureus* kolonisinden hazırlanan süspansiyonlar; Kolon 7, 8 ve 9: Kültürlerinde *Fusarium spp.* üreyen; Kolon 10: Kültüründe *Alternaria alternata* üreyen; Kolon 11: Kültüründe *Candida albicans* üreyen; Kolon 12 ve 13: Mikroskopik bakılarında hif yapıları görülen ancak kültüründe üreme saptanmayan hasta örnekleri).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kornea hastalıkları, tüm dünyada görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir. Bu hastalıklar içinde keratitlerin sıklığı giderek artmakla birlikte erken tanı ve uygun ilaç seçeneği ile tedavisi mümkün olan hastalıklardır (1, 2).

Fungal keratitler herhangi bir yaşta ve cinsiyette gelişebilirler, ancak dış ortamda çalışan, 31-40 yaş arasındaki erkeklerin daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (7, 8, 51, 52). Olgu sayısı geniş bir çalışmada, 1352 hastada erkeklerin kadınlardan 2,5 kat fazla ve olguların %64,4'ünün 16-49 yaş arasında olduğu bildirilmiştir (45). Bizim çalışmamızda erkekler kadınlardan yaklaşık 1,5 kat fazladır ve hastaların yaş ortancası 49 (3-85) olarak bulunmuştur. Erkek hasta fazlalığı ve yaş ortalaması diğer çalışmalardaki bulgulara benzer olup, yaşamın aktif döneminde dış ortamda çalışma, travmaya daha fazla maruz kalma olasılığına bağlı olabilir.

Fungal keratitlerin tanısı, hastayı muayene eden göz hastalıkları hekiminin fungal keratitten kuşkulaması ile başlar. Keratit tanısının erken konulması ve tedaviye erken başlanması tam iyileşme şansını artırır. Mikrobiyolojik tanı, korneadaki ülserin tabanından ve kenarlarından alınan kazıntı örneklerinin boyasız ve boyalı mikroskopik incelemesi, örneklerden kültür yapılması ve son yıllarda kullanıma giren örnekten PCR ile yapılmaktadır (8, 21, 27, 32, 45, 50, 52-57). Kornea örneğinin mikroskopik incelemesi için KOH, Kalkoflor beyazı ile direkt veya Gram, Giemsa, methenamin gümüşleme yöntemleri ile hazırlanan boyalı preparatların incelenmesi önerilmektedir (3, 8, 21, 27, 32, 45, 52). Bu çalışmada kornea kazıntı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesi için KOH, boyalı mikroskopik incelemesi için ise Gram boyama yöntemi seçilmiştir. Örneğin KOH preparasyonu ile incelemesi; olabilen en hızlı, uygulanması en kolay, en ucuz tanı yöntemi olduğu ve ayrıca floresan mikroskop gerektirmediği için yeğlenmiştir. Gram boyama yöntemi ise, boyalı inceleme yöntemleri arasında en kolay, hızlı ve ucuz olması nedeni ile seçilmiştir.

Fungal keratitlere ilişkin yapılmış çalışmalarda KOH incelemesinin duyarlılığına ilişkin farklı sonuçlar bildirilmiştir (54). KOH incelemesinin duyarlılığını %33 (29) gibi çok düşük bulanlar yanında, %82 (52) ve %99 (8) gibi

çok yüksek bildirenler de vardır. Bu çalışmada beş örneğin KOH ile mikroskopik incelemesinde hiyalen hifler görülmüş; bunların üç tanesinin kültüründe *Fusarium spp.* üremiş, iki tanesinin kültüründe üreme olmamış, ancak tümünün konvansiyonel PCR incelemesinde mantar DNA'sı saptanmıştır. Bu beş örnek dışında, iki örnekte daha kültürde üreme olmasına (birinde *Candida albicans*, diğerinde *Alternaria alternata*) ve mantar DNA'sı saptanmasına rağmen KOH incelemelerinde mantar elemanı görülmemiştir. Eğer konvansiyonel PCR sonuçları altın standart olarak kabul edilirse, bu çalışmada KOH incelemesinin duyarlılığı %71,4; özgüllüğü %100 (pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %96,7) olmaktadır. Bu duyarlılık sonucu %33'e göre yüksek, %99'a göre düşüktür. Bunun nedeni, kornea kazıntı örneklerinin hastalığın erken başlangıç döneminde alınmış olması ile açıklanabilir. Hastalığın erken döneminde alınan kornea kazıntı örneklerinde, mikroskopik incelemede mantarların görülemeyebileceği gibi bazen de korneada epitel defektinin olması nedeni ile yeterli kazıntı materyali alınamayacağı da bildirilmektedir (3). Fungal keratitlerde Gram boyalı mikroskopik incelemenin duyarlılığının, KOH incelemesine göre düşük (%45-73) olduğu bildirilmektedir (3, 29, 52). Bu çalışmada fungal keratit saptanan olgularda Gram boyalı mikroskopik inceleme sonuçları da KOH incelemesi ile birebir aynı bulunmuştur.

Gram boyalı incelemede, kültürlerinde bakteri üremesi olan yedi örnekten üç tanesinde bol lökosit, birinde bol lökosit ve eritrositler, sadece bir tanesinde bol lökositler yanında gram (+) koklar görülmüş, iki tanesinde ne hastaya ait hücreler ne de mikroorganizma görülmemiştir. Bu sonuçlara göre bakteri keratitlerinde Gram boyalı incelemenin duyarlılığı %14,2 olup, fungal keratitlerdekine oranla oldukça düşük saptanmıştır.

Klinik değerlendirmede fungal keratitler çoğu zaman bakteri keratitlerine benzemektedir. Göz hekimleri tarafından klinik olarak konulan enfeksiyöz keratit tanısı ile mikrobiyolojik tanının karşılaştırıldığı bir çalışmada, fungal etkenlerin sanıldığından daha az oranda tahmin edildiği ve klinik tanının mikrobiyolojik tanıdan daha üstün olmadığı sonucuna varılmıştır (48). Bu çalışmadaki yedi olguda da klinisyen fungal keratitden kuşkulanan ancak kornea kazıntı örneklerinde bakteri üremesi olmuştur.

Bu çalışma sürecinde kornea kazıntı örnekleri laboratuvara ulaştıktan sonraki 30 dakika içinde KOH ve Gram boyalı preparatlarının mikroskopik incelemesi yapılmış, beş hastanın örneğinde hiyalen hiflerin, bir hastada Gram (+) kokların varlığı acilen hastanın hekimine iletilmiş ve tedaviye erken başlanılmasına yardımcı olunmuştur.

Fungal keratitlerin tanısında kültür, altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Etkenin kültürde üretilmesi, sağaltımın doğru ve etkin planlanması yanında, ilaç direncinin belirlenmesine, epidemiyolojik verilerin toplanmasına olanak sağlar. Çok sayıda mikroorganizma keratit etkeni olabilmektedir. Keratitlerin mikrobiyolojik tanısına ilişkin yapılan çalışmalarda kültür ekimlerinin, besiyeri plaklarına ‘yarım ay’ ya da ‘C’ şeklinde çizilerek yapılması önerilmektedir. Ancak, alınabilecek örnek miktarı genellikle çok az olduğundan hemen kuruma eğilimindedir. Bu nedenle alınan örnekler alındığı yerde (poliklinik, klinik, ameliyathane vs.) besiyerine ekilmeli ve hızlıca laboratuvara ulaştırılmalıdır (26, 27, 51, 54).

Bu çalışmada da alınan kornea kazıntı örneklerinin kültür ekimleri önce hasta başında yapılmaya başlanmıştır. Her örneğin çukulata agar, KKA, EMB agar, iki tane (26°C ve 35°C’de inkübasyon için) antibiyotikli SDA ve Staib agar besiyerlerine ‘yarım ay’ ya da ‘C’ şeklinde çizilerek ekimleri yapılmıştır. Ancak dördüncü hastaya kadar bu şekilde sürdürülen örnek alma ve ekim yöntemi, dördüncü hastadan itibaren değiştirilmiştir. Alınabilen örnek miktarının çok az olması ve kültür amacı ile kullanılan besiyeri sayısının fazla olması nedeni ile alınan örnek miktarının kültür ve diğer inceleme işlemleri için yeterli olmadığı görülmüştür. Bundan sonra, alınabilen tüm örnek miktarı hasta başında 1 mL steril tuzlu su içeren 1,5 mL’lik kriyotüpe konularak inceleme işlemlerinin laboratuvarında yapılmasına karar verilerek bu şekilde devam edilmiştir. Ayrıca ekimler ‘C’ şeklinde yapılmayıp, her besiyerinde eşit aralıklarla üç noktaya örnekten birer damla damlatılarak yapılmış ve sadece bu damlaların olduğu yerdeki üremeler etken kabul edilmiştir. Bu ekim yönteminin ‘C’ şeklinde ekimden daha kolay uygulanabilir olduğu, kontaminan üremesini değerlendirmede en az ‘C’ ekimi kadar etkili olduğu görülmüştür.

Kültür plaklarının 4-6 hafta süre ile inkübe edilmesi önerilmektedir (3, 20, 26, 27, 45). Bu çalışmada kültürler 10 gün inkübe edilmiştir. Dimorfik mantarlar

dışındaki fungal keratit etkenleri, kültürde 3-4 günde ürediğinden ve bizim bölgemiz dimorfik mantarlar için endemik bölge olmadığından inkübasyon 10 günde sonlandırılmıştır.

Fungal keratitler, ABD’de yapılan çalışmalarda kornea enfeksiyonlarının %5-10’undan daha azını oluşturmaktadır (31). Güney Hindistan’da ise görülme sıklığı çok daha yüksek olmakla birlikte en önemli körlük nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır (32). Gopinathan ve arkadaşlarının Güney Hindistan’da yaptığı bir çalışmada 3399 enfeksiyöz keratit olgusundan 1352 (%40) olgu fungal keratit tanısı almıştır (45). Ülkemizde Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki 620 enfeksiyöz keratit olgusunun 225’inde kültürde üreme olmuş ve bunun da %22,3’ünde fungal keratitler saptanmıştır (33). Bizim çalışmamızda sadece fungal keratit kuşkulu 60 örnekten, 12 (%20) tanesinin kültüründe üreme olmuş; bunların yedisinde (%11,6) fungal etken saptanmıştır.

Günümüze kadar 105’ten fazla mantar türü fungal keratitlerin etkeni olarak bildirilmiştir. Etkenlerin görülme sıklığı; ülkeler, bölgeler arasında, iklim koşullarına, hasta popülasyonuna göre değişmekle birlikte hiyalen küflerden *Fusarium* ve *Aspergillus* türleri, esmer mantarlardan *Curvularia* ve *Bipolaris* türleri, mayalardan *Candida albicans* en sık görülen etkenler arasında bildirilmişlerdir (3, 8, 29, 32, 37, 38, 50, 52, 54, 58). Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada ise *Fusarium* türleri ilk sırayı alırken, bunu *Candida* ve *Aspergillus* türleri izlemiştir (33). Birçok çalışmada fungal keratitlerin üçüncü önemli nedeni olarak *Bipolaris* türleri gösterilmektedir (28, 37). Tanure ve arkadaşlarının çalışmasında maya ve filamentöz mantarlar eşit oranda saptanmış, en sık görülen etken *Candida albicans* ve *Fusarium* türleri olarak saptanmıştır (29). Galarreta ve arkadaşlarının yaptığı geniş bir fungal keratit serisinde olguların %60,6’sında maya mantarları, %39,4’ünde filamentöz mantarlar saptanmıştır (40). Yılmaz ve arkadaşlarının Ege bölgesinde yaptığı çalışmada ilk sırada *Fusarium* türleri yer alırken ardından *Candida* ve *Aspergillus* türleri saptanmıştır (33). Bizim çalışmamızda en sık görülen etken *Fusarium* türleri olmuştur.

Bu çalışmada, örneklerinde *Fusarium* üremesi olan hastalarda tipik fungal keratit klinik bulguları saptanmış, örneklerin mikroskopik incelemesinde enfeksiyon göstergesi olan bol lökositler yanında hiyalen mantar hifleri görülmüş,

konvansiyonel PCR incelemelerinde mantar DNA'sı saptanmış ve antifungal sağaltıma iyi yanıt vererek tedavi sonrası keratitleri iyileşmiştir. Mikroskopik incelemesi olumsuz olan iki hastanın örneklerinin kültürlerinde; birinde *Candida albicans*, diğesinde *Alternaria alternata* üremiş ve konvansiyonel PCR incelemelerinde mantar DNA'sı saptanmıştır. Bu hastalarda da tipik fungal keratit klinik bulguları saptanmış ve antifungal sağaltıma iyi yanıt alınmıştır.

Yedi hastanın örneğinin kültürlerinde 18-24 saat içinde bakteri üremesi olmuş ve sonuçlar klinisyene acilen bildirilerek bu hastaların gereksiz antifungal tedavi almaları önlenmiş ve tüm hastalar uygun antibiyotik sağaltımı ile iyileşmişlerdir.

Fungal keratitler, göz kaybına kadar gidebilen ve acil tanı gerektiren ciddi enfeksiyonlardır. Klasik konvansiyonel tanı yöntemleri olan, kornea örneğinin mikrobiyolojik incelemesi ve kültür, hala tanıda altın standartı oluşturmalarına rağmen bazı dezavantajları bulunmaktadır. Klasik konvansiyonel testlerle olguların %31-50'sinde herhangi bir sonuç elde edilemeyebilmektedir (55). Bunun yanında mikroskopik incelemede maya hücreleri veya hifler görülse bile mantarın tür düzeyinde tanınması olanaksızdır. Kültürün sonuçlanması ise günler alabilmektedir (27, 45, 53, 54, 57). Tanıdaki bu kısıtlılıklar son yıllarda moleküler yöntemlerin, özellikle PCR'in tanıda kullanılmasını gündeme getirmiştir (53, 54, 55, 57, 59). Fungal keratitlerin moleküler tanısında, örnekte hangi DNA'nın aranacağına karar vermek önemlidir (56). Göz örneğinden DNA saptanmasına ilişkin ilk çalışmada *F. solani*'nin 'cutinase geni' araştırılmıştır (60). Daha sonraki çalışmaların büyük çoğunluğunda, ribozomal ribonükleik asit (rRNA) gen bölgesi ve universal (panfungal) ITS primerleri tercih edilmiştir (50, 53, 54, 55, 57). Fungal keratitlerin tanınması amacı ile en çok önerilen PCR yöntemi, konvansiyonel PCR'dır. Bu yöntemle DNA elde edildikten sonra etkenin tür düzeyinde tanımlanması için ise sekans önerilmektedir (56, 61, 62, 63). Fungal keratitlerin tanısı için 'nested PCR', 'DNA microarray' ve 'real time PCR' gibi yöntemler de önerilmektedir. Ancak bu yöntemlerde panfungal primerler kullanılmamakta, özel primerler kullanılması gerekmektedir. Fungal keratite neden olan etken spektrumu çok geniş olduğundan, eğer etken doğru öngörülüp uygun primer seçilmez ise keratitin etkeni tanımlanamaz (53, 55, 56).

Bizim çalışmamızda da kornea kazıntı örneklerinde mantar aranması için konvansiyonel PCR yöntemi seçilmiş ve bunun için panfungal ITS1 ve ITS4 primerleri tercih edilmiştir. Konvansiyonel PCR sonrası elde edilen ürünler %1,5'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve Moleküler ağırlık marker'ı ile karşılaştırıldığında 500-600 baz çifti büyüklüğünde PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 10). Mikroskopik incelemesi veya kültüründen herhangi biri veya her ikisi de olumlu yedi hastalık örneğinin hepsinde (Kolon 7-13) konvansiyonel PCR olumlu bulunmuştur. Örneklerin kültüründe üreyen mantar kolonilerinden hazırlanan mantar süspansiyonları pozitif kontroller olarak (Kolonlar 1-5) kullanılmış, bunlarda da PCR ürünleri elde edilmiştir. Örneğin kültüründe *Staphylococcus aureus* üreyen bakteri kolonisinden hazırlanan bakteri süspansiyonu ve steril nükleaz içermeyen distile su (Kolon 6 ve NK) negatif kontrol olarak kullanılmış ve bunlarda bant elde edilmemiştir. Bu sonuçlara göre konvansiyonel PCR'ın duyarlılığı mikroskopik incelemeden ve kültürden daha yüksek olarak %100 gibi görülmektedir. Ancak kornea örneklerinin klinik olarak fungal keratit kuşkuyla hastalardan alınması ve örnek sayısının az olması nedeni ile bunun yanıltıcı bir sonuç olabileceğinin göz ardı edilmemesi gerekir.

Sonuç olarak; bu çalışmada,

i) Fungal keratit kuşkusu olduğunda, klinisyenin laboratuvara telefon ederek bilgilendirmesinin, klinik örneğin alındıktan sonra hızla laboratuvara ulaştırılmasını ve işlenmesini hızlandırdığı ve klinisyen-laboratuvar iletişimi ve işbirliğinin tanıyı hızlandırmada en önemli faktörlerden biri olduğu görülmüştür.

ii) Fungal keratitlerin tanısı açısından kolay ve hızlı tanı yöntemleri arasında olan KOH ve Gram boyalı mikroskopik incelemenin duyarlılıkları eşit olup %71,4 olarak bulunmuştur. KOH ile inceleme yönteminin özgüllüğünün ise % 100 olarak fungal keratitlerin tanısında güvenilir bir yöntem olduğu görülmüştür.

iii) Fungal keratit oranı kültür ile %8,3 ve konvansiyonel PCR yöntemi ile %11,6 olarak bulunmuştur. Altmış kornea kazıntı örneğinde *Fusarium* türleri en fazla üreyen etken olarak ilk sırada yer alırken, *Candida albicans* ve *Alternaria alternata* ikinci sıklıktaki etkenler olarak görülmüştür.

Kültür, tanıda altın standart tanı yöntemi olmasına rağmen zaman alıcı bir yöntemdir. Sonuçlar en erken 24 saatte, yaklaşık 3-5 gün gibi bir sürede verilmektedir. Keratit gibi körlüğe neden olabilen ciddi bir enfeksiyonda zaman dezavantajı olmaktadır. PCR ise, hızlı olmasına rağmen uygulaması kolay olmayan, pahalı, deneyimli ve iyi eğitilmiş personel gerektiren bir yöntemdir ancak; konvansiyonel PCR yöntemi ile kornea örneğinde mantar varlığının gösterilmesi; tanı süresini klasik konvansiyonel yöntemlere göre kısaltmıştır.

PCR yönteminin rutin uygulamaya konulması ile, hastaya antifungal tedavinin erken başlanmasını sağlayarak göz kaybının ve ayrıca mikolojik bulgu saptanmayan hastalarda gereksiz antifungal uygulamasının önüne geçilebileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda başta hedeflendiği gibi, konvansiyonel PCR ile sadece örnekte mantar DNA'sının varlığı gösterilmiş, etkenin tür düzeyinde adlandırılması yapılmamıştır ancak; örnekten mantar DNA'sının elde edilmesinin, daha sonra diğer moleküler yöntemlerle mantarın adlandırılmasına da olanak sağlandığı görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001; 79(3): 214-221.
2. Hagan M, Wright E, Newman M, Dolin P, Johnson G. Causes of suppurative keratitis in Ghana. *Br J Ophthalmol.* 1995 Nov; 79(11): 1024-1028.
3. Thomas PA. Fungal infections of the cornea. *Eye.* 2003; 17(8): 852-862.
4. Harissi-Dagher M, Colby K. Fungal Infections of Cornea. *Contemporary Ophthalmology.* 2006; 5(20): 1-7.
5. Ritterband DC, Seedor JA, Shah MK, Koplin RS, McCormick SA. Fungal keratitis at the New York Eye and Ear Infirmary. *Cornea.* 2006; 25(3): 264-267.
6. Thielen TL, Castle SS, Terry JE. Anterior ocular infections: a overview of pathophysiology and treatment. *Ann Pharmacother.* 2000; 34(2): 235-246.
7. Basak SK, Basak S, Mohanta A, Bhowmick A. Epidemiological and microbiological diagnosis of suppurative keratitis in Gangetic WestBengal, Eastern India. *Indian J Ophthalmol.* 2005; 53(1): 17-22.
8. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Vasu S, Meenakshi R, Palaniappan R. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis: a three-year study. *Indian J Ophthalmol.* 2003; 51(4): 315-321.
9. Manzouri B, Vafidis G, Wyse R. Pharmacotherapy of fungal eye infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2001; 2(11): 1849-1857.
10. FlorCruz NV, Peczon Jr I. Medical interventions for fungal keratitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; 23(1): CD004241.
11. Valente P, Ramos JP, Leoncini O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can J Microbiol.* 1999; 45(11): 949-958.
12. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi Cilt 2.* 2001: 354-369.

13. Aydın P, Akova Y. Temel Göz Hastalıkları. 2001: 3-51.
14. McClellan KA. Mucosal defense of the Outer Eye. *Surv Ophthalmol.* 1997; 42(3): 233-246.
15. Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy.* 2007; 92: 36-49.
16. Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR. Ocular infection and immunity. Mosby. 1988.
17. Akpek EK, Gottsch JD. Immune defense at the ocular surface. *Eye.* 2003; 17: 949-956.
18. Pleyer U, Baatz H. Antibacterial protection of the ocular surface. *Ophthalmologica.* 1997; 211 Suppl 1: 2-8.
19. Farjo A, Soong HK. Corneal epithelium. In: Yanoff M, Duker JS, eds. *Ophthalmology.* St Louis: Mosby. 2004: 413-422.
20. McLeod SD. Infectious keratitis. In: Yanoff M, Duker JS, eds. *Ophthalmology.* St Louis: Mosby. 2004: 466-491.
21. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(4): 662-685.
22. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucins. *Vet Ophthalmol.* 2004; 7(2): 71-77.
23. Arnold RR, Cole FF, McGhee JR. A bacterial effect for human lactoferrin. *Science* 1977; 197: 263-265.
24. Lemp MA, Blackman HJ. Ocular surface defense mechanisms. *Ann Ophthalmol.* 1981; 13: 61-63.
25. Oküler Enfeksiyon Hastalıkları. *Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları* No:8. 2008: 1-244.

26. Miller D. Ocular Infection Part III, Laboratory diagnosis of infectious disease: An Organ System Approach. In Mahon CR, Manuselin G eds. Textbook of Diagnostic Microbiology. Saunders 2nd Edition Philadelphia. 2000. Chapter 35: 1086-1089.
27. Wilhelmus KR, Liesegang TG, Osatoth G, Jones DB. Laboratory diagnosis of ocular infections. Washington DC. Cumitech 13A. 1994: 1-39.
28. Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. Clin Microbiol Rev. 2003; 16: 730-797.
29. Tanure MA, Cohen EJ, Sudesh S, Rapuano CJ, Laibson PR. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania. Cornea. 2000; 19: 307-312.
30. Jurkunas UV, Langston DP, Colby K. Use of voriconazole in the treatment of fungal keratitis. Int Ophthalmol Clin. 2007; 47: 47-59.
31. Microbial and parasitic infections of the cornea and sclera. In: American Academy of Ophthalmology. Basic and Clinical Science Course. External Disease and Cornea. Section 8. San Fransisco. 2003. P: 173-175.
32. Srinivasan M. Fungal keratitis. Curr Opin Ophthalmol. 2004; 15: 321-327.
33. Yilmaz S, Ozturk I, Maden A. Microbial keratitis in West Anatolia, Turkey: a retrospective review. Int Ophthalmol. 2007; 27: 261-268.
34. Mohanty PK, Ambekar VA, Deodhar LP. Prevalence of mycotic infections of external eye. Indian J Ophthalmol. 1984; 32(3): 153-155.
35. Liotet S, Krzywkowski JC, Warnet VN, Jacq C. Conjunctival fungal flora of healthy people. J Fr Ophtalmol. 1980; 3(10): 557-560.
36. Trindade Rde C, Bonfim ACR, Resende MA. Conjunctival microbial flora of clinically normal persons who work in a hospital environment. Braz. J. Microbiol. 2000; 31(1): 12-16.
37. Iyer SA, Tuli SS, Wagoner RC. Fungal keratitis: emerging trends and treatment outcomes. Eye Contact Lens. 2006; 32: 267-271.

38. Wilhelmus KR, Climatology of dematiaceous fungal keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2005; 140: 1156-1157.
39. Alfonso EC, Miller D, Cantu-Dibildox J, O'Brien TP, Schein OD. Fungal keratitis associated with non-therapeutic soft contact lenses. *Am J Ophthalmol.* 2006; 142: 154-155.
40. Galarreta DJ, Tuft SJ, Ramsay A, Dart JK. Fungal keratitis in London: Microbiological and clinical evaluation. *Cornea.* 2007; 26: 1082-1086.
41. Sun RL, Jones DB, Wilhelmus KR. Clinical characteristics and outcome of *Candida* keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143: 1043-1045.
42. Verma S, Tuft SJ. *Fusarium solani* keratitis following LASIK for myopia. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 1190-1191.
43. Tuli SS, Yoo SH. *Curvularia* keratitis after laser in situ keratomileusis from a feline source. *J Cataract Refract Surg.* 2003; 29: 1019-1021.
44. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Fujishima H, Tsubota K. Successful topical application of a new antifungal agent, micafungin, in the treatment of refractory fungal corneal ulcers: report of three cases and literature review. *Cornea.* 2005; 24: 748-753.
45. Gopinathan U, Garg P, Fernandes M, Sharma S, Athmanathan S, Rao GN. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care center in South India. *Cornea.* 2002; 21: 555-559.
46. Wang MX, Shen DJ, Liu JC, Pflugfelder SC, Alfonso EC, Forster RK. Recurrent fungal keratitis and endophthalmitis. *Cornea.* 2000; 19: 558-560.
47. Yaycıoğlu RA, Turunç T, Savaş L, Yağmur M, Akova YA. *Aspergillus* keratitis in a diabetic case. *Turkish Journal of Ophthalmology.* 2005; 35: 523-526.
48. Dahlgren MA, Lingappan A, Wilhelmus KR. The clinical diagnosis of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143: 940-944.
49. Rosa RH Jr, Miller D, Alfonso EC. The changing spectrum of fungal keratitis in South Florida. *Ophthalmology.* 1994; 101: 1005-1013.

50. Tarai B, Gupta A, Ray P, Shivaprakash MR, Chakrabati A. Polymerase chain reaction for early diagnosis of post-operative fungal endophthalmitis. *Ind J Med Res.* 2006; 123: 671-678.
51. Tilak R, Singh A, Muarya OP, et al. Mycotic keratitis in India: a five years retrospective study. *J Infect Dev Ctries.* 2010; 4(3): 171-174.
52. Anusuya Devi D, Ambia R, Nagarathnamma T. The epidemiological features and laboratory diagnosis of keratomycosis: *Int J Biol Med Res.* 2013; 4(1): 2879-2883.
53. Thomas PA, Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19: 210-220.
54. Badiee P. Mycotic keratitis, a state-of-the-art review. *Jundishapur J Microbiol.* 2013; 6(5): e8561.
55. Thomas PA, Teresa PA, Theodore J, Geraldine P. PCR for the molecular diagnosis of mycotic keratitis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012; 12(7): 703-718.
56. Ferrer C, Alio JL. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. *J Ophthalm Inflamm Infect.* 2011; 1: 15-22.
57. Tananuvat N, Salakthuantee K, Vanittanakom N, Pongpom M, Ausayakhun S. Prospective comparison between conventional microbial work-up vs. PCR in the diagnosis of fungal keratitis. *Eye.* 2012; 26: 133-1343.
58. Shah A, Sachdev A, Coggon D, Hossain P. Geographic variations in microbial keratitis: An analysis of the peer-reviewed literature. *BJ Ophthalmol.* 2011; 6: 762.
59. Gaudio PA, Gopinathan U, Sangwan V, Hughes T E. Polymerase chain reaction based detection of fungi in infected corneas. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 755–760.
60. Alexandrakis G, Jalali S, Gloor P. Diagnosis of *Fusarium* keratitis in an animal model using the polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol.* 1998; 82: 306–311.
61. Kumar M, Mishra NK, Shukla PK. Sensitive and rapid polymerase chain reaction based diagnosis of mycotic keratitis through single stranded conformation polymorphism. *Am J Ophthalmol.* 2005; 140: 851–857.

62. Kumar 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 rna genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 662–668.

63. Kumar M, Shukla PK. Single-stranded conformation polymorphism of large subunit of ribosomal RNA is best suited to diagnosing fungal infections and differentiating fungi at species level. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 56: 45–51.



7. ÖZET

KORNEA ÖRNEKLERİNDE ETKEN MANTARLARIN KLASİK ve MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Giriş ve Amaç: Kornea hastalıkları, katarakttan sonraki en önemli körlük nedenidir. Bunlar içinde fungal keratitler son 20-30 yıldır daha sık görülmeye başlanmıştır. Hem tanı yöntemlerinin gelişmesi, hem de kortikosteroid ve bağışıklığı baskılayıcı ilaçların kullanımının artması bundan sorumlu etkenler arasındadır. Tanının erken dönemde konması ve uygun antifungal tedaviye gecikilmeden başlanması iyileşmenin gerçekleşmesinde çok önemlidir. Bu çalışmada bir yıl boyunca Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda fungal keratit kuşkusu ile izlenen hastaların, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'na gönderilen kornea kazıntı örneklerinde; mikroskopik inceleme ile mantar ve mantarlara ait yapıları görmek, örneklerden klasik konvansiyonel yöntemler ile etken mantarları üretmek ve direkt örnekten konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile mantarları saptamak amaçlanmıştır. İkincil olarak kornea kazıntı örneklerinde, klasik konvansiyonel yöntemlere ek olarak konvansiyonel PCR yöntemi ile mantar aranmasının mikoloji rutininde uygulanması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada fungal keratit kuşkulu hastalardan, göz hastalıkları hekimleri tarafından kornea kazıntı örnekleri alınmıştır. Örneğin bir bölümünden kültür için ekimler yapılmış, bir bölümü direkt ve boyalı mikroskopik incelemeler için, bir bölümü de moleküler incelemeler için kullanılmıştır. Örneklerin koyun kanlı agar (KKA) (bioMérieux, Fransa), Eosin-methylene-blue (EMB) agar (bioMérieux, Fransa), çukulata agar (bioMérieux, Fransa) ve antibiyotikli Sabouraud dekstrozu agar (SDA) (bioMérieux, Fransa) ile Staib agar (laboratuvarımızda hazırlanmıştır) besiyerlerine yarım ay şeklinde çizilerek ekimleri yapılmış ve 10 gün inkübe edilmiştir. Mikroskopik inceleme, %10'luk potasyum hidroksit (KOH) ve Gram boyama yöntemleri ile yapılmış, direkt mikroskopik incelemede mantara ait yapıların

görülmesi durumunda kliniğe acilen bilgi verilmiştir. Kültürde üreyen mantarlar klasik konvansiyonel yöntemler ve Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile tanımlanmıştır. Son olarak örneklerle konvansiyonel PCR yöntemi uygulanmıştır.

Bulgular: Bir yıllık sürede kornea kazıntı örneği alınan 60 hastanın 23 (%38,4)'ü kadın, 37 (%61,6)'si erkekti. Hastaların yaş ortancası 49 (3-85) olarak bulundu. Altmış örneğin beş (%8,3) tanesinin direkt mikroskopik incelemesinde mantar hifleri görüldü. Örneklerin 12 (%20)'sinde kültürde üreme saptandı. Bunların yedi (%11,6) tanesinde KKA (35°C) besiyerlerinde olan üremeler bakteri üremesi olarak değerlendirildi. Beş (%8,3) örnekte antibiyotikli SDA (26°C) besiyerlerinde olan üremeler mantar (maya mantarı ve küf mantarı) üremesi olarak değerlendirildi. Çalışmaya alınan 60 örneğin panfungal primerler ile yapılan konvansiyonel PCR sonucunda yedisinde (%11,6) mantara ait deoksiribonükleik asit (DNA) saptandı. Direkt mikroskopik inceleme ile mantar hifleri görülen beş örneğin, üçünde hem kültür hem de konvansiyonel PCR yöntemi ile pozitiflik saptandı; iki örneğin kültüründe üreme olmadı ancak konvansiyonel PCR yöntemi ile mantar DNA'sı saptandı. Kültüründe üreme olan ve konvansiyonel PCR yöntemi ile mantar DNA'sı saptanan iki örneğin de direkt mikroskopisinde mantar hifleri görülmedi.

Sonuç: Bu çalışmada hastaların yaklaşık %12'sinde fungal keratit saptanmıştır. Direkt mikroskopik inceleme, kültür ve konvansiyonel PCR yöntemleri ile bulunan sonuçlar birbirleriyle uyumlu bulunmuştur. Kornea kazıntı örneğinde mantar varlığının konvansiyonel PCR yöntemi ile gösterilmesi, hem kültürde üretilmeyen etkenlerin saptanmasını sağlamış hem de tanı süresini klasik konvansiyonel yöntemlere göre kısaltmıştır. Bu yöntemin klinik mikrobiyoloji pratiğinde kullanılması, hastaya mikolojik tedavinin erken başlanmasını sağlayarak göz kaybını önleyecektir.

Anahtar Kelimeler: Keratit; Fungal keratit; Direkt mikroskopik inceleme; KOH; Kültür; Konvansiyonel PCR.

8. ABSTRACT

INVESTIGATION OF FUNGAL AGENTS ON CORNEAL SAMPLES BY CLASSICAL AND MOLECULAR METHODS

Introduction and Aim: Corneal diseases are the second major cause of blindness other than cataracts. Among corneal diseases, fungal cataracts have been more frequently encountered for the last 20-30 years. Advances in diagnostic procedures and increased usage of corticosteroids or immun suppressive agents are thought to be responsible for this condition. Early diagnosis and early initiation of proper antifungal treatment are very important for the recovery of the disease. The aim of this study was to detect fungal agents and fungal particules by microscopic evaluation, to grow fungal agents by classical conventional methods and to identify fungal agents directly by polimerase chain reaction (PCR), from the samples obtained with the suspicion of fungal keratitis and evaluated in Micology Laboratory of Ege University School of Medicine Department of Medical Microbiology in one year period. In addition to conventional methods, routine application of the PCR method for searching fungus in micology labarotory practice was the secondary aim of the study.

Methods: In this study, corneal samples were obtained by ophtalmologists, from the patients with the suspicion of fungal keratitis. The samples were used in three ways; for culture inoculation, for direct or stained microscopic evaluations and for molecular methods. Conjunctival swabs collected from eyes were inoculated in the shape of halfmoon onto sheep blood agar (bioMérieux, France), chocolate agar (bioMérieux, France), Eosin methylene blue agar (bioMérieux, France), Sabouraud dextrose agar (SDA) with antibiotic (bioMérieux, France) and Staib agar (in house) and all were incubated for 10 days. Microscopic evaluation was made by potassium hydroxide (KOH) 10% and Gram staining, in the Micology Laboratory of Ege University School of Medicine Department of Medical Microbiology. In case of detecting fungal agents on direct microscopic evaluations, clinicians were informed

emergantly. Fungal agents growing in the culture were described by conventional methods and Vitek-MS (bioMérieux, France) automatized system. Lastly, conventional PCR method was applied to the samples.

Results: In a one year period, corneal scraping specimens were obtained from 60 patients, 37 (61,6%) of them were male and 23 (38,4%) were female. The median age of the patients was 49 (3-85). In direct microscopic evaluation of 5 (8,3%) of the 60 patients fungal hyphae were found. Growing in the culture was detected on 12 (20%) of the 60 samples. Seven (11,6%) of these growings on sheep blood agar (35°C) were considered as bacteria. On the five (8,3%) samples, growings in the SDA (26°C) with antibiotics were considered as fungal agents (yeasts and molds). By the PCR with parafungal primers of 60 samples, fungal deoxyribonucleic acid (DNA) were detected in the seven (11,6%) of them. In three of the five samples with fungal hyphae detected by direct evaluation, fungal agents were detected both by culture and conventional PCR method; in the rest of two samples fungal agents did not grow in culture but fungal DNA of them were detected by conventional PCR method. In two of the samples, in which fungal agents grew in the culture and fungal DNA's were be detected by conventional PCR, fungal hyphae could not be demonstrated by direct microscopic evaluation.

Conclusion: In this study, fungal keratitis were demonstrated in nearly 12% of the patients. The results of direct microscopic evaluation, culture and conventional PCR were found compatible. Demonstration of fungal existence by conventional PCR method in corneal samples, caused determination of fungal agents which did not grow in the culture and moreover shortened the time passed for diagnosis in comparison with the classical conventional methods. The usage of this method in clinical microbiology practice will protect from eye loss by early initiaion of antimicotic treatment.

Key words: Keratitis; Fungal keratitis; Direct microscopic evaluation; KOH; Culture; Conventional PCR.

9. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Muhammed SOYLAR

Doğum Yılı : 1982

Doğum Yeri : Denizli

Yabancı Dil : İngilizce

Mezun Olunan Fakülte : Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mezuniyet Tarihi : 2007

Çalışılan Kurumlar :

Sarıkamış Merkez Sağlık Ocağı, Kars (2007-2008)

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Edirne
(2008-2009)

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Manisa
(2009-2011)

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir (2011-
2015)