



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ DE TLEMCEEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la
Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à
l'Environnement « LAMAABE »

MEMOIRE

Présenté par :

Bouzidi Ibtissem

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie appliquée et Contrôle de qualité

Thème

Étude du profil fongique des kératites infectieuses

Soutenu le // 2021 devant le jury composé de :

| | | | |
|-----------------|---------------------------|-----|---------------------|
| Encadrant | M'Hamedi Imane | MCB | U. de Tlemcen |
| Examinatrice 01 | Boudghene Stambouli Amina | MCA | U. d'Aïn Témouchent |
| Examinatrice 02 | Bouali Wafaa | MCA | U. de Tlemcen |

Année universitaire 2020-2021

ملخص

التهاب القرنية الفطري هو من أمراض العين التي تُعرَّف بأنها أحد التهابات القرنية النادرة والخطيرة، وقد تؤدي إلى العمى؛ تؤثر بشكل كبير على السكان المهمشين. يهدف عملنا إلى تقييم الجوانب السريرية لداء القرنية ودراسة التشخيص السريري من أجل اختيار أفضل استراتيجية علاجية وكذلك تحديد العوامل المسببة وبالتالي مراقبة تطوراتها. بناءً على نتائج تحليل المقالة لوحظ أنه غالبية الحالات المصابة بالتهاب القرنية الفطري كان *Aspergillus niger* ثم *Fusarium solani* سببه بدرجة أقل. إنَّ التهاب القرنية الفطري هو من الأمراض التي يمكن تجنب عواقبها من خلال استراتيجيات والتي يجب أن تكون متعددة الأبعاد.

الكلمات المفتاحية: القرنية، فطار القرنية، التهاب القرنية الفطري، الرشاشيات النيجر، فيوزاريوم سولاني، المبيضات البيضاء.

Résumé

Les kératites fongiques ou les kératomycoses sont des pathologies oculaires définies comme étant des infections cornéennes rares mais graves, potentiellement cécitantes ; affectant considérablement les populations marginalisées. Notre travail avait pour but d'évaluer les aspects cliniques des kératomycoses, étudier le diagnostic paraclinique pour un meilleur choix thérapeutique ainsi qu'identifier les facteurs prédisposants et par suite suivre leurs évolutions. En se basant sur les résultats de l'analyse d'article on a relevé la prédominance du genres *Aspergillus spp* suivis du *Fusarium spp* lors de la survenue des kératomycoses. La kératomycose est une pathologie dont les séquelles peuvent être évitées par le biais des stratégies qui devrez être multidimensionnelles.

Mots clés : La cornée, kératomycose, kératite fongique, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*.

Summary

Fungal keratitis or keratomycoses are ocular pathologies defined as rare but serious corneal infections, potentially blinding; affecting considerably marginalized populations. The aim of our work was to evaluate the clinical aspects of keratomycoses, to study the paraclinical diagnosis for a better therapeutic choice as well as to identify the predisposing factors and by following their evolutions. The results of the analysis of the article showed, the predominance of the genera *Aspergillus spp* followed by *Fusarium spp*. in the occurrence of keratomycosis was noted. Keratomycosis is a pathology whose sequelae can be avoided through strategies that should be multidimensional.

Key words: Cornea, keratomycosis, fungal keratitis, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage et la santé afin de mener ce modeste travail.

Je voudrais tout d'abord adresser tous mes remerciements, ma gratitude et ma reconnaissance à ma directrice de mémoire madame M'Hamedi Imène pour avoir accepté d'encadrer ce travail, ainsi que pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils et son énorme soutien et c'est grâce à vous que ce travail a pu être mené à terme.

J'adresse mes sincères remerciements à madame Boudghene Stambouli Amina Maître de Conférences « A » au département de biologie à L'université BELHADJ Bouchaib de Aïn Témouchent pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

J'exprime ma gratitude à Madame Bouali Wafaa Maître de Conférences « A » au département de biologie à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen d'avoir contribué à l'enrichissement de ce travail en l'examiner.

Je tiens à remercier également tous les professeurs de mon cursus éducatif et j'exprime ma gratitude à l'équipe de formation du master de microbiologie et contrôle de qualité qui ont enrichi mes savoirs et qui m'ont donné de leurs expériences et leurs conseils judicieux durant ces deux dernières années.

Dédicace

C'est avec une profonde gratitude que je dédie ce modeste travail à la source de mon existence, mes plus grandes idoles. Merci mes chers parents pour votre amour, votre confiance, et pour votre encouragement et soutien ainsi que votre compréhension, et d'avoir toujours cru en moi. Merci d'avoir toujours été présent pourtant qu'aucun remerciement ou dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers vous. Tout simplement, je vous dédie ce travail et merci d'avoir fait de moi ce que je suis.

Je n'oublie pas à dédie ce travail à mes deux chères sœurs Samah et Sadjida vous êtes le modèle de bonté, je vous remercie pour toute la joie que vous m'apportez, ma tendresse et mon amour envers vous ne peuvent être ni exprimées ni traduites par ces quelques mots imparfaits que Dieu nous garde unis dans la gaieté, la santé et la prospérité

A ma grande mère « Hbibba » pour son amour, sa prière et pour son étonnant encouragement et soutien.

A tous mes amis et camarades de promotion « Amina, Ikram D, Ikram T, Nour El Houda, Sara, Selma et Oussama » vous êtes pour moi des sœurs et frère et des amis, à tous ceux que j'ai omis d'écrire leurs noms, merci d'avoir été là durant les bons et les moins bons moments. En témoignage de l'amitié qui nous uni et les souvenirs inoubliables durant mon cursus universitaire je vous dédie ce travail.

Et à tous ceux qui me sont chers mes deux familles « Bouzidi » et « Bachiri » merci pour tous, pour votre amour et votre encouragement.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| I. Synthèse bibliographique | 4 |
| Chapitre 01 : Description et structure de l'œil | 5 |
| 1 Structure de l'œil | 6 |
| 2 Définition de la cornée | 7 |
| 3 Les couches de la cornée | 7 |
| 3.1 Film lacrymal | 8 |
| 3.2 Epithélium cornéen | 8 |
| 3.3 Membrane de Bowman | 9 |
| 3.4 Le stroma | 9 |
| 3.5 Membrane de Descemet | 9 |
| 3.6 L'endothélium | 9 |
| 4 La pathogénie de la cornée | 10 |
| 4.1 Pathologies non infectieuses | 10 |
| 4.2 Les kératites infectieuses | 10 |
| 4.2.1 Les kératites bactériennes | 10 |
| 4.2.2 Les kératites virales | 11 |
| 4.2.3 Les kératites fongiques | 11 |
| 4.2.4 Les kératites amibiennes | 12 |
| 4.3 La pathogénicité des facteurs de risques | 12 |

| | |
|---|----|
| Chapitre 02 : Les kératites fongiques | 13 |
| 1 Définition | 14 |
| 1.1 Pathogénie | 14 |
| 2 Les agents responsables | 15 |
| 2.1 Les champignons filamenteux | 15 |
| 2.1.1 <i>Fusarium solani</i> | 16 |
| 2.1.1.1 Les infections due à <i>Fusarium solani</i> | 16 |
| 2.1.2 <i>Aspergillus niger</i> | 17 |
| 2.1.2.1 Les infections due à <i>Aspergillus niger</i> | 18 |
| 2.2 Les levures (<i>Candida albicans</i>) | 19 |
| 2.2.1 Les infections due à <i>Candida albicans</i> | 20 |
| 2.3 Les champignons dimorphiques | 21 |
| 3 Diagnostic | 21 |
| 3.1 Diagnostic clinique | 21 |
| 3.2 Diagnostic paraclinique | 21 |
| 3.2.1 L'examen bio-microscopique | 21 |
| 3.2.2 Examen biologique | 22 |
| 3.2.2.1 Le prélèvement | 22 |
| 3.2.2.2 Examen direct | 22 |
| 3.2.2.3 Mise en culture | 23 |
| 4 Thérapeutique | 24 |
| 4.1 Traitement médicale | 24 |
| 4.2 Traitement chirurgical | 25 |
| 4.3 Cross-Linking | 26 |
| 5 L'évolution et les complications | 26 |

| | | |
|------------|---|----|
| II. | Analyse d'article | 27 |
| 1 | Présentation de l'article | 28 |
| | Study of pathogens of fungal keratitis and the sensitivity of pathogenic fungi to therapeutic agents with the disk diffusion method | 29 |
| 1.1 | Methodologies | 29 |
| 1.1.1 | Le prélèvement | 29 |
| 1.1.2 | La culture fongique | 29 |
| 1.1.3 | Test de sensibilité aux médicaments et traitement | 30 |
| 1.2 | Résultats et discussion | 31 |
| 1.2.1 | Le diagnostic microbiologique | 31 |
| 1.2.2 | Test de sensibilité et traitement | 32 |
| 1.2.3 | Suivie des patients | 33 |
| | Conclusion | 35 |
| | Références bibliographiques | 37 |
| | Annexe | |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Structuration anatomique de l'œil | 6 |
| Figure 2 : Structuration macroscopique de la corné..... | 7 |
| Figure 3 : Cascade inflammatoire des kératomycoses | 14 |
| Figure 4 : kératite à <i>Fusarium solani</i> | 17 |
| Figure 5 : Kératite à <i>Aspergillus niger</i> | 19 |
| Figure 6 : Kératite à <i>Candida albicans</i> | 20 |
| Figure 8 : L'anneau immunitaire dans le cas des kératomycoses | 22 |
| Figure 9 : Infiltrant stromal et hypopion | 22 |
| Figure 10 : Micro-abcès "Satellites" des kératomycoses | 22 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Principales bactéries qui causent les kératites bactériennes..... | 23 |
| Tableau 2 : Principales germes causant les kératites fongique..... | 15 |
| Tableau 3 : Avantages et limites de la culture mycologique dans les kératites fongiques..... | 23 |
| Tableau 4 : Protocole du traitement des kératomycozes..... | 25 |
| Tableau 5 : Les analyses statistiques..... | 31 |
| Tableau 6 : Les taille des zones d'inhibition des germes fongiques traité avec divers agents antifongiques en mm..... | 32 |

Introduction

Environ 80 % des informations du monde extérieur sont obtenus à l'aide de l'un des organes les plus perfectionnés du corps humain dont l'œil qui est capable de convertir les rayons lumineux captés et les transmettre au centre de la vision présent au niveau du cerveau afin qu'elles soient analysées, traitées et traduites et enfin renvoyer à l'œil qui va à son tour réagir avec le milieu extérieur [(Buil et al., 2002) ; (Semaha, 2020)]. Lors de ce contact permanent, cet organe est susceptible d'avoir des affections et des infections plus ou moins graves. Les kératites microbiennes dites infectieuses est définie comme étant une infection oculaire plus précisément cornéenne. Elles représentent une urgence diagnostique et thérapeutique afin d'éviter la survenue des conséquences anatomiques et fonctionnelles qui peuvent aller jusqu'à l'opacité cornéenne (Bourdais, 2016) qui constitue la cinquième (un taux d'environ les 4%) cause de perte de vision dans le monde.

Les kératites fongiques ou les kératomycoses correspondent à une prolifération des champignons filamenteux, levure ou un champignon dimorphique au niveau de la cornée. Elles sont potentiellement cécitantes avec des proportions plus importantes dans les pays où l'hygiène est insuffisante tels que les pays marginalisés en voie de développement (Foucaud, 2012). En Algérie, il n'y a pas d'estimations démographiques où elles sont rarement diagnostiquées (Chekiri-Talbi et Denning, 2017).

Le pronostic des kératites fongiques dépendra essentiellement sur la précocité du diagnostic et de la rapidité du traitement dont cette forme des kératites représente un pronostic plus réservé et sévère que celui de la forme bactérienne en raison des difficultés thérapeutiques tels que l'utilisation préalable de corticothérapie en automédication ; et donc la prise en charge des kératomycoses est un véritable challenge [(Benadada, 2017) (Laatfa, 2019)].

Dans ce sens, notre étude se répartit en 2 parties :

- La partie théorique incluant dans un premier temps des généralités sur la structure oculaire et cornéenne, ainsi que de mettre en lumière les kératites infectieuses d'une façon générale et plus spécifiquement la forme fongique. Cette partie est également intéressée au diagnostic des aspects cliniques d'une telle infection. Dans le but d'améliorer la prise en charge des patients, en choisissant une meilleure stratégie thérapeutique.

- Alors que la deuxième partie on a basé sur du l'analyse d'une étude scientifique qui a pour objectif d'identifier les germes causants une telle infection ainsi qu'étudier l'efficacité des agents antifongiques sur ces germes.

Synthèse bibliographique

Chapitre 01

Description et structure de l'œil

1 Structure de l'œil

L'œil est caractérisé par sa forme sphérique et un poids de 7 grammes ainsi qu'un diamètre de 24mm et un volume de 6.5mm (Feroui, 2014). D'un point de vue anatomique il se sépare en 2 constituants : le globe oculaire et les annexes (Figure 1) (les muscles extra-oculaire, les nerfs, la paupière) qui jouent un rôle protecteur contre le milieu extérieur (Feroui, 2014).

Le globe oculaire se différencie par la présence de 3 couches dite tunique qui se diversifie en 3 formes selon leur position (Zarour, 2016). La forme la plus externe étant la tunique fibreuse incluant à son tour la cornée et la sclérotique (Sclère) qui présente une structure membranaire responsable de la couleur blanche oculaire et qui joue un rôle dans la protection et la rigidité de l'œil ; la tunique moyenne dite vasculaire (l'uvée), constitué d'une couche très vascularisé composé de l'iris qui représente l'élément pigmenté de l'œil responsable de sa coloration, le corps ciliaire responsable de l'accommodation et de la courbature du cristallin, et le choroïde coloré en noir, riche en vascularisation et en vaisseaux permettant l'alimentation de la rétine (Dermu, 2014). Enfin la couche la plus interne nommé par « la tunique nerveuse » caractérisé par la présence de la rétine uniquement qui couvre le fonde d'œil et permet la transformation des flux lumineux en influx nerveux (Foucaud, 2012).

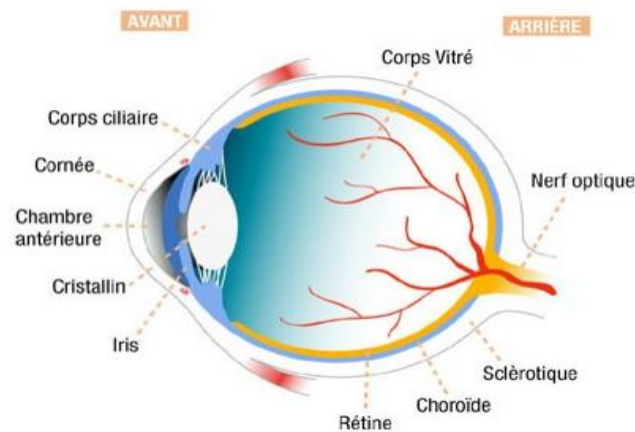


Figure 1 : Structuration anatomique de l'œil (Foucaud, 2012)

2 Définition de la cornée

La cornée est une lentille primordiale pour le système optique oculaire, son contact direct avec le milieu extérieur lui permet d'être qualifié comme étant une barrière protectrice contre les infections oculaires (Oubaaz, 2019).

Cette lentille humaine est un tissu solide transparent non vascularisé hautement innervé et caractérisée par sa forme convexe et non sphérique ainsi que prolate (Cuffaro, 2016). D'un point de vue microscopique la cornée est alimentée par les vaisseaux du limbe d'une part et de l'humeur aqueuse en arrière et les larmes en avant d'autre part (Schalk, 2017). Cependant d'un point de vue macroscopique la cornée est formée de 2 faces, une face antérieure convexe, asphérique et confronte au milieu extérieur à l'aide du film lacrymal, et une face postérieure concave et sphérique, en relation direct avec l'humeur aqueuse constituant la paroi de la chambre antérieure du globe oculaire (Cuffaro, 2016).

3 Les couches de la cornée

La cornée se distingue par la différenciation de 4 couches cellulaires se séparent 2 membrane acellulaire ordonner de l'extérieur vers l'intérieur comme suit : en premier lieu l'épithélium en contact avec film lacrymal suivie par la couche de Bowman puis le stroma ensuite la membrane de Descemet et enfin l'endothélium (Figure 2).

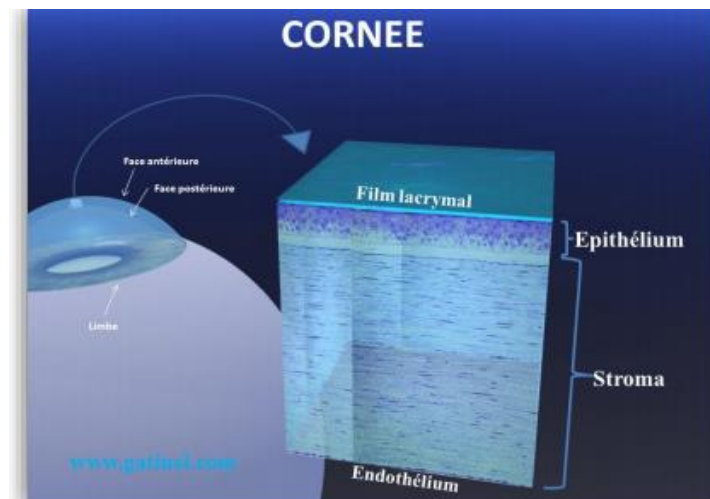


Figure 2 : Structuration macroscopique de la corné (Benadada, 2017)

3.1 Film lacrymal

Appelé aussi le film de larmes, c'est une mosaïque de fluide homogène, se localisant à la partie extérieure de la cornée et est inséparable de l'épithélium par le biais du glycocalyx (Benadada, 2017). Ce film est composé d'une variété de molécules tels que : le glucose, l'oxygène, les facteurs de croissances, les cytokines, les lysozymes (Benadada, 2017) et l'eau qui représente (98%) de son volume. D'un point de vue schématique il est constitué de 3 couches : la plus superficielle dite lipidique d'une épaisseur de $0.1\mu\text{m}$ protégeant la surface oculaire en faisant face aux conditions environnementales et en réduisant le taux d'évaporation des larmes tout en influant sur la qualité de la vision (Herbaut et al., 2019). La couche intermédiaire aqueuse qui représente la couche la plus importante suit à son immensité ($7\mu\text{m}$) mais aussi à son rôle protecteur et nutritif. Enfin la couche la plus profonde nommée mucineuse composée de plusieurs mucines, où elle joue un rôle important dans la formation de la zone hydrophile sur l'épithélium (Boro, 2014) et dans la protection de l'œil en excluant les microorganismes pathogènes (Cuffaro, 2016).

3.2 Epithélium cornéen

Est la couche de tissu la plus externe de la cornée, de nature pavimenteux, stratifié, non kératinisé [(Couture, 2016) ; (Rocher, 2016)]. Il représente 10% de l'épaisseur de la cornée entière, il est organisé sous forme de 5 à 7 couches cellulaires centrale et 8 à 10 couches périphérique. Ces cellules qui vont être régénérées chaque 7 jours, sont réparties en 3 formes cellulaires. Les cellules superficielles qui est une mosaïque cellulaire caractérisée par des cellules aplaties de forme polygonales (Lupasco, 2019) assurant l'imperméabilité de cette couche et formant ainsi une barrière qui va bloquer le passage des molécules d'un côté et leur pénétration au seuil du stroma d'un autre côté (Rocher, 2016). Les cellules intermédiaires dite cellules ailées, sont des cellules polyédriques transitoires formées d'un noyau allongé. Les cellules basales qui sont une monocouche de cellules caractérisées par une forme cylindrique ; reposent sur la membrane basale (fine couche larme a 80 \AA , séparatif de l'épithélium à la membrane de Bowman) (Benadada, 2017).

3.3 Membrane de Bowman

C'est une couche transitoire, dépourvue de cellules à l'exception de quelques expansions de cellule de Schwman (Cuffaro, 2016) ainsi que des fibres de collagènes (majoritairement de type I, III, V, VII), doué d'une certaine rigidité, ce qui favorise le maintien de la structure cornéenne et la protection contre les infections (Scholl Tilman, 2012). Elles sont non renouvelées tout au cours de la vie humaine (leur lésions est définitive et entraîne une opacité (Rocher, 2016)).

3.4 Le stroma

Est un tissu conjonctif non vascularisé, il est distingué par 3 composants essentiels il s'agit d'une matrice extra-cellulaire riche en eau, ion et en protéoglycane (Cuffaro, 2016), elle assure la cohésion des fibres et le maintien d'espaces interfibrillaire fixe (Tidu, 2016) qui est à son tour intervient dans la transparence de la cornée (Rocher, 2016). Les lamelles de collagènes (prédominance de collagène I) constitué par des fibrilles, ces derniers sont caractérisés par une organisation structurale spécifique dite contreplaqué, cette structuration permet une diffusion lumineuse minimales et une transparence cornéen maximale (Nazari, 2019). Les kératocytes qui sont des fibroblastes dispersés entre les lamelles de collagènes caractérisés par une forme plate et étroite (Benadada, 2017), et qui sont responsables de la régénération et le renouvellement des lamelles de collagènes et la matrice extra-cellulaire à la fois.

3.5 Membrane de Descemet

La membrane de Descemet est une fine couche membranaire de constitution collagénique (essentiellement I, VIII), de fibronectine, de laminine et protéoglycane (Poli, 2014), caractérisé par sa forte résistance, sa perméabilité à l'eau ainsi que leur amorphilité et élasticité (Laatfa, 2019).

3.6 L'endothélium

Délimité entre l'humeur aqueuse et la membrane de Descemet. Il s'agit d'une monocouche constituée par environ 400000 cellules amonialiques (non renouvelées) de forme plates, régulières et hexagonales, leur disposition est en forme de nid-d'abeilles (Boutkhil, 2010). L'endothélium assure des fonctions essentielles tels que la régulation et la maintenance de l'hydratation de la cornée ainsi que sa transparence. De plus, il agit comme une barrière grâce à ses jonctions serrées intercellulaires (Poli, 2014).

4 La pathogénie de la cornée

4.1 Pathologies non infectieuses

La cornée comme toute autre organe est susceptible d'avoir une diversité de pathologie, tels qu'une dilatation ou une diminution du diamètre de la cornée. Il s'agit d'une mégalo-cornée ou une micro-cornée ou un kératocône qu'est une déformation cornéenne au bout de l'adolescence, dans certains cas une sécheresse de globe oculaire peut être noté. Au niveau de cette lentille humaine il peut y avoir des inflammations traumatiques tels que : les ulcérations, les brûlures, les plaies, la présence d'un corps étranger (Boro, 2014) et des cas plus rares il aura des tumeurs.

4.2 Les kératites infectieuses

Ce terme désigne une inflammation oculaire plus précisément au niveau de la cornée, elle correspond à une prolifération de l'agent causale (microorganisme) dans la cornée (Semaha, 2020), si cette prolifération n'atteint que les couches superficielles de la cornée on parle des kératites superficielles ou kératites bénigne guérissable et sans séquelles. Cependant, si cette prolifération atteint les couches intérieurs de la cornée on parle des kératites profondes. Les kératites infectieuses sont responsables des inflammations cornéennes provoquant une réduction de la transparence de la cornée ainsi qu'une perturbation de l'acuité visuelle allant même à une opacité si celle-ci sont maltraitées (Abdou, 2001).

4.2.1 Les kératites bactériennes

Les kératites bactériennes sont la forme la plus abondante des kératites infectieuses avec 80% des cas. Elle se définit par la prolifération d'un agent bactérien au niveau de la cornée en formant un infiltrat locale associé d'une inflammation intense (Abdou, 2001) et d'une destruction tissulaire (Bourcier et al., 2007), ce qui constitue une véritable urgence thérapeutique (Boro, 2014) où la prise en charge au cours des stade débutante est nécessaire afin d'éviter des complication graves et des séquelles pouvant baisser l'acuité visuelles (Bourcier et al., 2007). Dans cette forme de kératite on distingue 4 familles dominante il s'agit de : *Staphylocoque*, *Streptocoque*, *Pseudomonas* et *Entérobactéries* (Tableau 1).

Tableau 1 : Principales bactéries qui causent les kératites bactériennes (Bourdais, 2016)

| Bactéries | Aérobie | Anaérobie |
|------------------------------|--|--|
| Cocci Gram (+) | <i>Staphylococcus aureus.</i> <i>Staphylococcus epidermidis.</i> <i>Streptococcus pneumonia.</i> <i>Entérocoques.</i> | |
| Cocci Gram (-) | <i>Branhamella.</i> <i>Neisseria gonorrhoea</i> et autres. | |
| Bacille Gram (+) | <i>Corynebacterium.</i> <i>Listeria.</i> | <i>Propionibacterium.</i> <i>Actinomyces.</i> |
| Bacille Gram (-) | <i>Pseudomonas aeruginosa.</i> <i>Entérobactéries (Serratia,</i> <i>Enterobacter, Klebsiella,</i> <i>Escherichia...).</i> <i>Haemophilus.</i> <i>Acinetobacter.</i> | <i>Fusobacterium.</i> |
| Coccobacille Gram (-) | <i>Moraxella</i> | |

4.2.2 Les kératites virales

Connu également sous le nom des kératites herpétique, elle est le plus souvent causée par le virus *Herpès Simplex-1* (HSV-1) ainsi que d'autres genres viraux tels que : le virus de l'hépatite B, virus *Varicelle-Zona* (VZN), l'Adénovirus et *Cytomégalovirus* (Schalk, 2017). Les kératites herpétiques sont présentées sous plusieurs formes à la base de la couche cornéenne altérer ; en effet, si la réplication de virus se situe au niveau de l'épithélium, on parle des kératites épithéliales (Semaha, 2020). Cependant si celle si pénètre le stroma, on parle des kératites stromales nécrotique ou non (Semaha, 2020).

4.2.3 Les kératites fongiques

Appelée aussi kératomycose, se sont des infections cornéennes d'origine fongique dont la gravité réside dans la difficulté du diagnostic qui est retardé à cause de l'asptomatologie des premiers stades de l'infection. Cette forme de kératite est dû à la pénétration des germes souvent opportunistes tels que les champignons filamenteux, les levures ou des champignons dimorphiques qui peuvent propager profondément et altérer la membrane de Descement et la chambre antérieure engendrant une endophtalmie (Semaha, 2020).

4.2.4 Les kératites amibiennes

Les kératites amibiennes représentent une infection récente (1cas en 1970), rare qui se définit comme étant une inflammation cornéenne caractérisé par des douleurs intenses, pouvant endommager la vision et mener à l'opacité suite à la pénétration d'une amibe souvent du genre *Acanthamoeba* qui envahie le stroma et provoque des endommagements au niveau de celui-ci, en détruisant les kératocytes (Coulon, 2011). La gravité de cette forme de kératite réside dans la difficulté du diagnostic d'un côté et la résistance des amibes aux traitement pendant quelque semaine d'un autre côté (Boro, 2014).

4.3 La pathogénicité des facteurs de risques

Une diversité de facteur est à l'origine de l'apparition et la survenue des kératites, cependant les germes causant cette infection oculaire est le plus souvent provienne de la flore commensale oculaire alors que dans les cas post-opératoires ou post-traumatique il s'agit généralement des germes inhabituels d'origine environnemental (Bourdais, 2016). La survenue des kératites est due principalement à la pathogénicité du germes causals d'un côté et l'état immunitaire de l'hôte d'autre côté où les taux de l'apparition chez les patients présentant des défaillances immunitaires est important, il s'agit des patients immunodéprimés ou ceux qui prennent des immunosuppresseurs tels que les corticoïdes dont l'utilisation abusif et intensif facilitent la propagation de l'agent causal d'un côté et bloquent l'initiation de la réaction inflammatoires d'un autre côté. Le port des lentilles de contact est le facteur de risque le plus identifié dans les dernières années à cause de l'augmentation des taux de leur utilisation. Cette infection oculaire peut se manifester après une chirurgie cornéenne tels que la greffe de la cornée ou chirurgie de la cataracte (T. Bourcier et al., 2011). L'intervention des kératites peut avoir lieu chez des patients ayant des pathologies chroniques oculaires ou traumatisme cornéen végétal (ou tellurique) (Boro, 2014)

Chapitre 02

Les kératites fongiques

1 Définition

Les kératites fongiques appelé aussi les kératomycoses sont des infections cornéennes qui surviennent lors de l'invasion des cornées lésées ou saines par des champignons. Il s'emble y'avoir une relation étroite entre les zones géographiques et l'apparition des kératites fongiques dont leurs taux d'apparition est plus importante dans les zones à climat tropicales tels que Amériques du Sud, Afrique, Moyen Orient et l'Asie (Bourdais, 2016) où se trouve les conditions favorables pour la multiplication et le développement fongiques.

1.1 Pathogénie

L'apparition des kératites fongiques se manifeste par l'altération des systèmes de défense anti-infectieux de la cornée tels que la barrière épithéliales, film lacrymal ou clignement palpébral (Laatfa, 2019). Après invasion fongique du stroma les cellules concernées par le système immunitaire innée dite phagocytaire interviennent pour se défendre. Dans un premier temps ces cellules immunitaires reconnaissent la paroi cellulaire des champignons (Semaha, 2020) en se basent lors de ce processus sur les récepteurs de types NOD (Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins) et les récepteurs de types Toll. Ce processus déclenche une réponse inflammatoire joignant le relargage des cytokines pro-inflammatoire il s'agit de MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2), TLR (Toll-like receptor) dont TLR2, TLR4 et TLR9 et une diversité des interleukine (IL-1, IL-16, IL-8, IL-17) (Semaha, 2020) ainsi que TNF- α (Tumornecrosis alpha) (Figure 3).

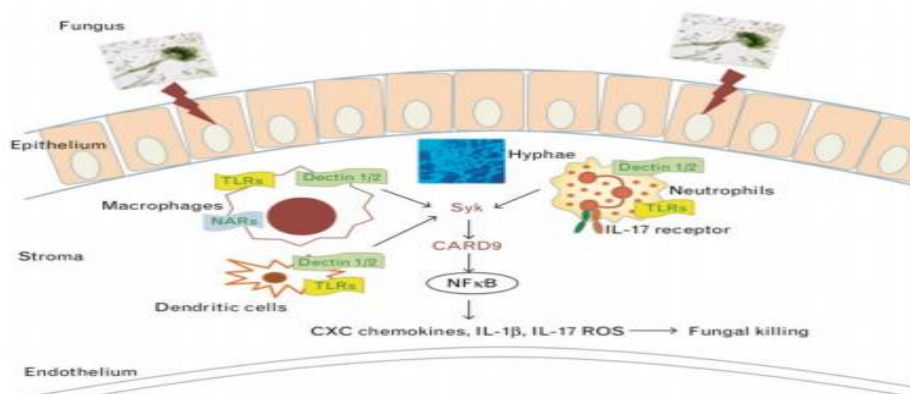


Figure 3 : Cascade inflammatoire des kératomycoses (Semaha, 2020)

Les agents fongiques causals peuvent entraîner une endophtalmie (Benoît, 2017) en pénétrant le stroma et la membrane de Descemet et enfin en se propageant dans la chambre antérieure (Benadada, 2017).

La formation du biofilm surtout lors de la survenue des champignons filamenteux (généralement dans le cas de *Fusarium*) représente un facteur primordial dans la pathogénicité.

2 Les agents responsables

Les genres des champignons les plus identifier et qui accusent les kératites fongiques sont regroupés dans le (Tableau 2).

Tableau 2 : Principales germes causant les kératites fongiques (Bourcier et al., 2007)

| Champignons filamenteux | | Levures | Di-morphiques |
|-------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|
| Non pigmentés | Pigmentés | | |
| <i>Fusarium</i> | <i>Curvularia</i> | <i>Candida</i> | <i>Blastomyces</i> |
| <i>Aspergillus</i> | <i>Alternaria</i> | <i>Cryptococcus</i> | <i>Coccidioides</i> |
| <i>Acremonium</i> | <i>Phialophora</i> | <i>Geotrichum</i> | <i>Paracoccidioides</i> |
| <i>Paecilomyces</i> | <i>Bipolaris</i> | <i>Malassezia</i> | <i>Sporothrix</i> |
| <i>Penicillium</i> | <i>Exserohilum</i> | <i>Rhodotorula</i> | <i>Histoplasma</i> |
| <i>Scedosporium</i> | <i>Cladosporium</i> | | |
| <i>Beauveria</i> | <i>Lasiodiplodia</i> | | |
| <i>Metarhizium</i> | <i>Phoma</i> | | |

2.1 Les champignons filamenteux

Comme leur nom l'indique ils sont formés d'un réseau de filaments ou hyphes appelé mycélium. Ce sont des organismes multicellulaires hétérotrophes, caractérisé par la présence d'un thalle. La forme sporadique des champignons filamenteux est retrouvée dans l'environnement (dans l'air, l'eau et même dans la nature) ce sont donc des organismes ubiquitaires. Leur présence est primordiale au cours du processus de recyclage des matières organiques (Lecellier, 2013). Les kératites fongiques due aux champignons filamenteux apparaissent à des taux plus importants dans les climats tropicaux. *Fusarium solani* ainsi que *Aspergillus niger* sont les agents causals les plus identifiés dans les kératomycooses à champignons filamenteux.

2.1.1 *Fusarium solani*

Fusarium solani est l'espèce la plus importante et la plus étudiée du genre *Fusarium*. C'est un champignon ubiquitaire retrouvés au niveau du sol, l'eau et même l'air. Ils sont identifiés le plus souvent dans les zones tropicales et subtropicales (Foucaud, 2012). Elle comporte 60 sous-espèces phylogénétiques connu par « Le complexe d'espèces *Fusarium solani* FSSC » (Ben-Amira, 2018). La culture de *Fusarium solani* est rapide et se fait sur milieu Oatmeal agar présentant des colonies duveteuses ou cotonneuses doté d'une couleur blanche à crèmes avec revers pale (Almi, 2016). Elle est morphologiquement caractérisée par la présence des conidiophores ramifié disposé sur les thalles des coussinets ainsi que la présence des macroconides et microconides sur les conidiophores :

- Macroconides : Fusiformes et cloisonnés (Almi, 2016) d'une épaisseur de 28 à 42µm sur 4 à 6µm, il s'agit généralement de 3 à 5 septa disposée sur des conidiophores courts et branché (Debourgogne, 2013).
- Microconides : Disposée en chainettes ou agglutinées en fausses tête (Ben-Amira, 2018) d'une épaisseur de 8 à 16µm sur 2 à 4,5µm, elles sont disposées sur des conidiophores plus allongés et verticilles (Debourgogne, 2013).

| Taxonomie du <i>Fusarium solani</i> (Debourgogne, 2013) | |
|---|--------------------|
| Règne | Fungi. |
| Division | Ascomycota. |
| Classe | Sordariomycetes. |
| Sous classe | Hypocreomycetidae. |
| Ordre | Hypocreales. |
| Famille | Nectriaceae. |
| Genre | Nectria. |

2.1.1.1 Les infections due à *Fusarium solani*

Fusarium solani est caractérisé par un pouvoir pathogène assez important vers différents organismes vivants (végétaux, animaux et l'homme) cette pathogénicité est due à la synthèse de mycotoxines. En effet, *Fusarium solani* peut contribuer à une diversité d'infections qui

peuvent être superficielles tels que les infections fongiques ongulaires appelée onychomycose. Ou les infections fongiques du pied appelée mycétomes (Benoît, 2017). Dans d'autres cas ces infections peuvent être profondes tels que les infections cutanées chez les diabétiques et les brûlés.

Fusarium solani est aussi impliquée dans l'apparition des kératites fongiques (Figure 4). En effet la particularité de cette espèce est la grande capacité à former des biofilms sur les lentilles de contacts (Benoît, 2017). De plus la richesse enzymatique de *Fusarium solani* provoque la lyse cellulaire et tissulaires ce qui rend sa propagation et son développement facile.

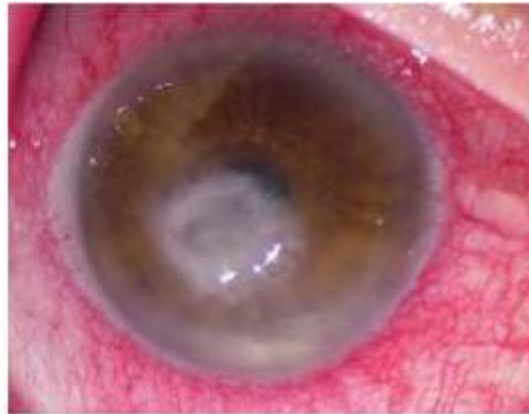


Figure 4 : kératite à *Fusarium solani* (Debourgogne, 2013)

2.1.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est l'espèce la plus répandue du genre *Aspergillus*. C'est une espèce cosmopolite et ubiquiste, formé par le cloisonnement des hyphes ce qui conduit par la suite à la formation du mycélium, caractérisé par une multiplication anamorphe (asexué). Connue aussi sous le nom d'*Aspergillus noir* cette appellation provient de l'apparition des colonies granuleuses noires lors de la culture qui est réalisée le plus souvent sur milieu Czapek (Quatresous, 2011). *Aspergillus niger* est également connu à l'échelle commerciale par une usine et joue un rôle important dans le recyclage et la dégradation de la biomasse végétale cette caractérisation est due principalement à la richesse de son système enzymatique (Hayer, 2013).

| Taxonomie d' <i>Aspergillus niger</i> (<i>Aspergillus niger</i> , 2020) | |
|--|----------------------|
| Règne | Fungi. |
| Division | Ascomycota. |
| Classe | Eurotomycetes. |
| Sous classe | Eurotomycetidae. |
| Ordre | Eurotiales. |
| Famille | Trichocomaceae. |
| Genre | <i>Aspergillus</i> . |

2.1.2.1 Les infections due à *Aspergillus niger*

La pathogénicité et le danger d'*Aspergillus niger* réside dans l'inhalation ou la digestion ou même le contact direct par contamination des matériaux tels que le cathéter ou les lentilles de contact par les spores fongiques (Quatresous, 2011). La contamination par *Aspergillus niger* peut aller d'une simple allergie à l'aspergillose pulmonaire invasive API (Melloul, 2015), cette dernière figure l'infection la plus grave et la plus redouté de l'ensemble des infections due à *Aspergillus niger*. Cette forme d'aspergillose est identifiée le plus souvent chez les patients présentant des défaillances immunitaires (Raynard, 2018).

Aspergillus niger peut aussi causer des infections oculaires, il s'agit généralement des kératomycoses (David M et al., 2008) (Figure 6) qui sont identifiés le plus souvent chez les agriculteurs ainsi que les personnes portant des lentilles de contact (Thomas P. A., 2003), dans ce cas une couleur noir est observée. Les kératites fongiques due à *Aspergillus niger* se manifeste en 2 formes :

- Kératites primitives qui peuvent être superficiel et qui provoque une réaction inflammatoire moindre que les kératites plus profondes, avec formation d'ulcère.
- Kératites secondaires survenue sur des sites de lésion préalables (Quatresous, 2011).

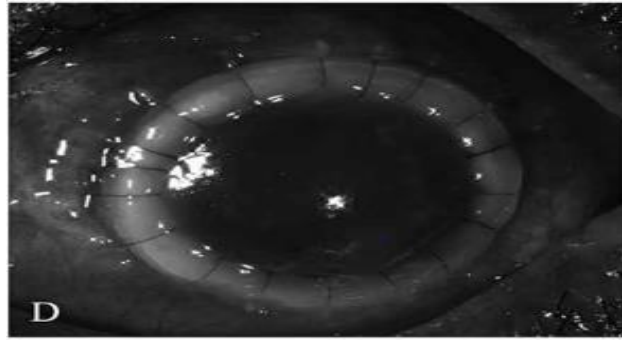


Figure 5 : Kératite à *Aspergillus niger* (David M et al., 2008)

2.2 Les levures (*Candida albicans*)

Les levures sont des microorganismes eucaryotiques unicellulaires immobiles, elles regroupent environ 600 espèces différents. Caractérisées par un système enzymatique très développés et une rapidité de reproduction. Les levures sont très répandues dans la nature. Ces microorganismes peuvent résister à des conditions extrêmes (pH, température et dessiccation). Dans les climats tropicaux, les kératites fongiques dues aux levures représentent 30% à 52% de la totalité des kératomycoses où le genre *Candida* représenté par *Candida albicans* est l'agent causal le plus identifié.

| Taxonomie de <i>Candida albicans</i> (YOUCEF-ALI, 2014) | |
|---|----------------------------|
| Règne | <i>Fungi.</i> |
| Division | <i>Ascomycota.</i> |
| Classe | <i>Saccharomycetes.</i> |
| Ordre | <i>Saccharomycetales.</i> |
| Famille | <i>Saccharomycetaceae.</i> |
| Genre | <i>Candida.</i> |
| Espèce | <i>Candida albicans.</i> |

Candida albicans est une levure dépourvue de capsule (El-Kirat-Chatel, 2010) aérobienne d'une forme ovoïde d'une largeur de 3 à 15µm qualifiée par un polymorphisme (transition morphologique de la forme levure et la forme hyphes) (Terki, 2015), et caractérisé

par un mode de reproduction asexué dite bourgeonnement de façon multilatérale. La mise en culture de *Candida albicans* peut se fait sur trois milieux différents ; (MemoBio, 2012): milieu Sabouraud additionné d'antibiotique, milieu Chromogène, ou milieu pauvre (RAT, PCB), où elles poussent en 24 à 48h et donne des colonies blanches et crémeuses.

2.2.1 Les infections due à *Candida albicans*

Candida albicans peut être à l'origine d'une variété d'infection qui peuvent être des candidoses superficielles tels que les candidoses digestives. Ou des candidoses unguéales généralement onyxis et périonyxis, il s'agit des contaminations des ongles (Lagane, 2007). *Candida albicans* peut contribue à des candidoses profondes qui sont plus rares, elles surviennent généralement au tant qu'infections liées aux soins dite nosocomiales (YOUCEF-ALI, 2014). L'évolution de cas peuvent conduire à des complications assez graves allant jusqu'au choc septique et le décès.

Candida albicans peut être à l'origine des kératites fongiques (Figure 7) avec des symptômes non différenciables d'autres formes des kératomycoses. La survenue des kératomycoses à *Candida albicans* est due généralement aux ports des lentilles de contact ce qui signifie l'implantation d'un matériau étranger qui est responsable de blocage de la réaction immunitaire de l'hôte d'un côté et la capacité de former un biofilm par *Candida albicans* d'un autre côté (Terki, 2015). La difficulté des kératomycose due à *Candida albicans* se réside dans l'acquisition du cette espèces à une résistance vis-à-vis des agents antifongiques.



Figure 6 : Kératite à *Candida albicans* (Regina et al., 2007)

2.3 Les champignons dimorphiques

Ce sont des champignons ubiquitaires possédant une particularité d'avoir à la fois une phase filamenteuse (production des spores) et une phase levure (Laatfa, 2019). Ils sont identifiés généralement dans des infections profondes dans des cas particuliers où les kératites fongiques ne présente aucune spécifié symptomatiques, se manifestant comme les autres formes des kératomycose filamenteuse ou non filamenteuse.

3 Diagnostic

3.1 Diagnostic clinique

Le diagnostic des kératomycoses est souvent tardif. La phase initiale du diagnostic clinique est l'étape interrogatrice du patient ce qui va orienter vers la forme fongique, la résistance et la survie de l'infection malgré le traitement antibiotique pré-able ainsi que l'existence de facteur de risque provoquant cette forme de kératite tels que le porte de lentilles de contact, le traumatisme cornéen (végétal), la greffe de cornée, les chirurgies cornéennes et les pathologie chronique (Laatfa, 2019). L'orientation du diagnostic clinique vers la forme fongique est basée aussi sur la diversité des symptômes qui vont apparaître de quelques heures allant à quelques jours qui suit l'invasion et le développement de l'agent responsable de cette infection cornéenne. Il s'agit généralement des douleurs oculaires, d'une rougeur locale associée à un larmoiement et une photophobie ainsi que la formation d'infiltrat satellite et des contraction involontaire de la paupière dite blépharospasme, et une diminution de l'acuité visuelle qui varie selon la couche cornéenne atteinte. Cette diversité et variété de symptômes ainsi que leur intensité est due principalement à la vulnérabilité du patient et à l'état oculaire avant la contamination ainsi que la pathogénicité de l'agent causal (Bourdais, 2016).

3.1 Diagnostic paraclinique

3.1.1 L'examen bio-microscopique

Cet examen permet de préciser les signes et les indications observés lors d'une inflammation cornéenne. Le premier signe à observer est la lésion épithéliale caractérisée par une couleur grisâtre ainsi qu'une certaine rugosité avec une difficulté de limiter la lésion à cause des infiltrats ou des ulcères présents. Dans le cas de champignons filamenteux, une visualisation à l'échelle stromal permet d'observer la présence d'infiltrats stromal à bord irrégulière avec un taux d'inflammation assez diminuer voir absente [(Foucaud, 2012) ; (Semaha, 2020)]. Dans le cas champignons filamenteux pigmenté il peut y avoir une pigmentation au fond de l'ulcère

avec observation de l'anneau immunitaire (Figure 7) de Wessely qui entoure l'infiltrat central (Semaha, 2020), alors qu'au niveau d'endothélium il y a formation des plaquette dite hypopion (Figure 8). Dans le cas de levures l'observation montre une formation de micro-ulcère (Figure 9) souvent superficielle de forme ovales doté d'une couleur blanc-jaune associé à un œdème stromal (Foucaud, 2012).

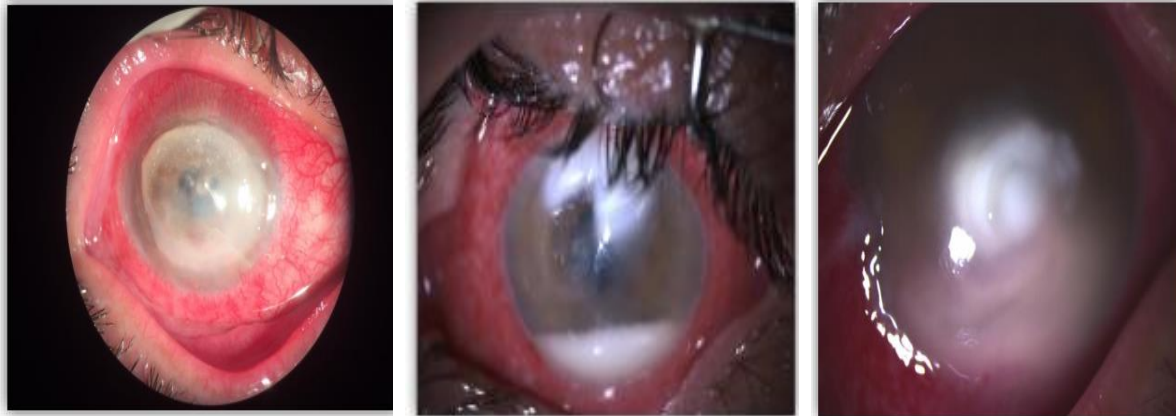


Figure 7 : L'anneau immunitaire dans le cas des kératomycoses (Benadada, 2017)

Figure 8 : Infiltrant stromal et hypopion (Benadada, 2017)

Figure 7 : Micro-abcès "Satellites" des kératomycoses (Benadada, 2017)

3.1.2 Examen biologique

Il s'agit d'une succession d'étape initié par un prélèvement qui va être soit destiné vers le diagnostic direct soit la mise en culture pour effectuer par la suite une variété de tests.

3.1.2.1 Le prélèvement

Il s'agit de grattage de la cornée, c'est la technique référentielle qui s'effectue par un ophtalmologue en utilisant soit la lampe à fente soit le microscope opératoire dans le cas d'une intervention chirurgical (Benadada, 2017). Le grattage cornéen consiste à extraire les berges et la base de l'abcès en protégeant la conjonctive et les paupières qui ne doivent pas être affecter (Bourcier et al., 2007). Il est souhaitable de réaliser le procédé du prélèvement avant la prescription du traitement médical (Moufaddal, 2019).

3.1.2.2 Examen direct

Comme son nom l'indique c'est une méthode directe et plus rapide que la mise en culture. Il s'agit d'une variété de coloration faite soit par l'hydroxyde de potassium (KOH) ou le blanc de calcofluor, le May-Grunwald-Giemsa (MGG) ou le bleu au lac-tophénol (Laatfa, 2019). La coloration de gram peut être utilisée pour l'examen direct bactériologique.

Ces procédés sont effectués sur une lame contenant l'échantillon obtenue du grattage cornéen.

Malgré la rapidité de cette technique l'inconvénient de celle-ci réside dans la difficulté de détecter avec précision l'agent causal (Benoît, 2017).

3.1.2.3 Mise en culture

Le grattage dirigé pour la culture bactérienne ou fongique est réalisé à l'aide d'un écouvillon Eswab (Laatfa, 2019). Il faut toujours accoupler l'examen mycologique avec un autre bactériologique puisqu'il existe une coïnfection bactérienne dans 30% à 40% des cas (Benadada, 2017). Le milieu le plus utilisé dans la culture fongique est souvent le milieu Sabouraud dextrose (Semaha, 2020) et Chromold. Les résultats des cultures des kératomycoses filamenteux apparaissent entre 2 à 4 jours mais certains genres filamenteux tels que *Fusarium* nécessitent une durée d'incubation assez long qui peut atteindre les 3 semaines. Au contraire des levures nécessitent un temps d'incubation compris entre 24 et 48 heures (Semaha, 2020). L'identification de germes en cause peut être adaptée à partir d'une analyse morphologique suivie par une variété de tests tels que les tests biochimiques et les tests protéomiques. La réalisation d'un antifungigramme peut être entreprise mais la difficulté de déterminer les concentrations minimales inhibitrice CMI est due à la différenciation entre les résultats *in vitro* et leur efficacité clinique (Shapiro et al., 2010). Cette technique comme toutes les techniques ont des avantages et des inconvénients définies dans (Tableau 3) :

Tableau 3 : Avantages et limites de la culture mycologique dans les kératites fongiques (Semaha, 2020)

| Avantages | Limites |
|---|--|
| Simple, peu coûteux et facilement disponible | Prend du temps (nécessite des jours ou des semaines en fonction du champignon) |
| Différenciation des éléments fongiques morts et vivants | Faux négatif en raison d'un échantillon insuffisant, d'un échantillon provenant d'un site inapproprié, d'une utilisation antérieure d'antibiotiques, d'une atteinte cornéenne profonde, etc... |
| Détection des infections mixtes fongiques ou fongiques / bactériennes | Faux positif en raison de contaminants environnementaux |

| | |
|---|---|
| Différenciation des infections à moisissures et à levures | Faible sensibilité |
| Identification présomptive d'étiologies communes au genre et à l'espèce | Manque d'identification précise au niveau de l'espèce chez les espèces morphologiquement similaires |
| Isolement de champignons pour des études morphologiques et / ou moléculaires, tests de sensibilité antifongique | Manque d'identification dans les colonies sans sporulation |
| Évaluation des résultats du traitement avec des cultures répétées (par exemple Culture en 6 jours) | Besoin d'un microbiologiste expérimenté |

4 Thérapeutique

La kératomyose est une urgence thérapeutique difficile à traiter avec des résultats moins satisfaisantes que celles des autres kératites surtout bactériennes (Semaha, 2020). Le choix thérapeutique est défini selon le degré d'inflammation ainsi que le cas du patient.

4.1 Traitement médicale

Le traitement médical des kératites fongiques est basé dans un premier lieu sur les différents types d'antifongiques associé à des traitements antibactériens à large spectre pour assurer le non survenu des infections bactériennes secondaires (Dermu, 2014) et éviter la formation des biofilms. Il y a une différenciation de 4 familles d'antifongiques dont chacune regroupe plusieurs classes il s'agit de :

- Groupe de Polyènes : il s'agit d'amphotéricine B (FUNGIZONE®) et natamycine.
- Groupe des azolés : comporte 2 classes différents d'antifongiques les imidazolés et les tri-azolés qui comporte à son tour une variété de molécules, il s'agit de :
 - Itraconazole (SPORANOX®).
 - Fluconazole (TRIFLUCAN®).
 - Voriconazole (V-FEND®).
 - Posaconazole.
- Groupe de pyrimidine : il s'agit de flucytosine sous forme de 5FC, ANCOTIL®.
- Groupe des échinocandines : il se différencie en 3 formes ; Caspofungine (CANCIDAS®), micafungine (MYCAMINE®) ainsi qu'anidulafungine (ECALTA).

Le tableau ci-dessus (Tableau 4) est un Protocol thérapeutique dans le traitement des kératomycoses.

Tableau 4 : Protocole du traitement des kératomycoses(Semaha, 2020)

| Aspect clinique | Traitement médicamenteux |
|--|--|
| Kératomycose épithélial au stade débutant : traitement local par collyre seulement. | Levure identifiée : Amphotéricine B ± Fluconazole |
| | Filament identifié : Amphotéricine B + Voriconazole |
| En cas d'atteinte cornéenne profonde : Traitement général à ajouter | Filament identifié : Voriconazole per os (Vfend®) |
| | Levure identifiée : Fluconazole per os (Triflucan®) Sauf <i>Candida krusei</i> , <i>Candida glabrata</i> : Voriconazole (Vfend®) |
| En cas d'endophtalmie ou d'évolution défavorable | Discuter cas par cas : <ul style="list-style-type: none"> ➤ Caspofungine (Cancidas®) intraveineuse ➤ Injection intra-stromale de voriconazole (50µg/0,1ml) ➤ Injection intra-caméculaire de voriconazole (100µg/0,1ml) ➤ Injection intravitréenne ou intra-caméculaire d'Amphotéricine B (5µg/0,1ml) |

4.2 Traitement chirurgical

La thérapie chirurgicale est la solution qui vient après une évolution ou des complications des kératomycoses ou simplement dit si le traitement médical n'a pas donné de résultats satisfaisants. Malgré cela, l'utilisation du traitement médical sera toujours faisable dans le cadre de la diminution de la pathogénicité et la toxicité du germe avant l'affectation de la chirurgie. Dans un premier temps un débridement quotidienne de l'ulcère sera nécessaire afin de diminuer le taux de germes infectant et éliminer le matériel nécrotique (Foucaud, 2012). Dans le but d'améliorer l'efficacité du traitement médical ; une variété de technique et de méthodes est employer, la plus connu est la greffe cornéenne qui sera réalisé sous 2 formes; la première forme qu'est une kératectomie ou une greffe lamellaire où il s'agit d'échanger

seulement la partie cornéenne altérer (antérieur ou postérieur) (Mella, 2017), la deuxième forme est une greffe transfixante dont la totalité de la cornée est ponctionnée (Massoudi, 2011).

4.3 Cross-Linking

Est une technique en cours d'évaluation surtout dans le cas des kératomycoses il s'agit de faire une séance d'UVA (ultraviolets longs) après l'utilisation de Riboflavine (produit photosensible) dans le but de renforcer les liaisons entre des lamelles de collagènes intervenant dans le stroma cornéen (L. Jouve et al., 2015).

5 L'évolution et les complications

L'évolution de ce type des kératites est plus lente en comparant aux celles des kératites bactériennes qui peut durer plusieurs semaines à plusieurs mois, la cinétique de cette infection repose nécessairement sur la défense et la résistance de l'hôte ainsi que la nature de l'agent responsable et la densité de l'inoculum et sa virulence (Laatfa, 2019). Le pronostic de cette infection fongique de la cornée est mauvais, leur évolution est favorable dans 50 à 70% des cas à cause du traitement médical (Bourcier et al., 2007). Dans 10 à 25% des cas il y a une perte totale du globe oculaire alors que dans 30% des cas une greffe de la cornée est nécessaire. Ces pourcentages varient en fonction des centres et des pays (Foucaud, 2012). Les kératomycoses peuvent contribuer à des complications plus ou moins graves soit fonctionnelles ou anatomiques, tels que : Descemetocèle, Leucomes, des fontes purulentes du globe, l'hypertonie oculaire, les sclérites, l'astigmatisme résiduel, la perforation cornéenne ainsi que l'endophtalmie.

Analyse d'article

1 Présentation de l'article

L'augmentation des taux d'apparition des kératites fongiques au cours des dernières années a permis l'orientation de la communauté scientifiques vers la réalisation de recherches afin d'analyser les facteurs contribuant à l'apparition de cette infection et sa manifestation et par la suite l'amélioration des aspects thérapeutiques. Cette partie du manuscrit a été réaliser en se basant sur l'analyse d'une étude fait l'objet d'une publication scientifique intitulé « Study of pathogens of fungal keratitis and the sensitivity of pathogenic fungi to therapeutic agents with the disk diffusion method » a été réalisé par Wanga et al en 2015 au niveau du département d'ophtalmologie, de l'hôpital populaire de l'université Zhengzhou "Chine". Cette étude à l'objet d'une publication dans le journal « Current Eye research » et qui a pour identifier et de déterminer les germes fongiques responsables de la survenu de kératite et de tester l'efficacité des agents antifongiques sur ces germes.

Study of pathogens of fungal keratitis and the sensitivity of pathogenic fungi to therapeutic agents with the disk diffusion method

Lulu Wanga, Liya Wanga, Lei Hana et Weijing Yina

Rappelons que cet article a pour but d'identifier et de déterminer les germes fongiques causant les kératomycoses en analysant et étudiant les relations entre ces microorganismes et de tester l'efficacité des agents antifongiques sur ces germes par l'utilisation de la méthode de diffusion sur gélose.

1.1 Methodologies

1.1.1 Le prélèvement

Cette étude a été menée au cours d'une période allant d'octobre 2013 à mars 2014, où 1000 patients ont subi un examen biologique initial par un diagnostic clinique en utilisant le microscope à lampe à fente, qui permet de tester la vision des patients, de spécifier la taille de l'infection et de l'ulcère ainsi que de déterminer avec précision la profondeur de l'infiltration au niveau de la chambre antérieure.

Ce diagnostic microscopique a été suivi d'un grattage cornéen qui a été réalisé par l'application d'un collyre anesthésique « chlorhydrate d'oxybuprocaine à 0,4 % » à l'aide d'une lame chirurgicale microscopique à usage unique.

Le tissu prélevé a été directement étalé sur une lame étiquetée pour un montage humide au KOH à 10% et une coloration de Gram.

1.1.2 La culture fongique

Sur les 1000 patients inclus dans cette étude ; les chercheurs ont considéré que 535 patients répondaient aux critères spécifiés à savoir un diamètre de lésions supérieur ou égale à 2 mm × 2 mm, des résultats fongiques positifs et des résultats bactériens négatifs. Les patients exclus étaient ceux qui présentaient une perforation cornéenne ou une défaillance immunitaires tels que les maladies auto-immunes, le diabète, ou les femmes enceintes.

Le grattage cornéen du 535 patient faisant partie de la suite de l'étude ont été ensemencés sur le milieu Sabouraud ou gélose dextrosé à la pomme de terre. Le résultat a été considéré comme positif si le champignon s'est développé dans les deux milieux ou l'un de deux milieux.

L'identification des germes a été basée sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

1.1.3 Test de sensibilité aux médicaments et traitement

Dans un premier temps les chercheurs ont traité les patients tout au long d'une semaine par différents collyres il s'agit de natamycine à 5 %, voriconazole à 0,5 % et de terbinafine à 0,25 %. Après l'obtention des résultats une orientation du traitement a été effectuée suivant la sensibilité du germe aux agents antifongiques.

Les chercheurs ont établi une variété de tests *in vitro* afin d'évaluer l'efficacité des agents antifongiques sur les germes causant les kératomycoses. La méthode utilisée était celle de diffusion sur gélose, selon les normes établies par le CLSI (Espinel-Ingroff et al., 2010). Les germes ont été considérés comme étant sensible si la zone d'inhibition était supérieure à 20 mm de diamètre.

Le suivi des patients a été réalisé chaque semaine allant jusqu'à trois mois après guérison. Lors de ce suivi plusieurs examens ont été réalisés tels que la mesure de la taille et la profondeur de l'infiltration à l'aide de microscope à lampe à fente, et microscope confocale qui mène à l'observation des changements dans les mycéliums fongiques. Les cas représentaient aucun signe de guérissons ou d'amélioration après un mois de traitement médical ont subi une intervention chirurgicale. Cependant le traitement médical était considéré comme efficace s'il y avait récupération de l'épithélium cornéen sur la lésion infectée, absence de perforation cornéenne, ainsi qu'une absence de mycélium fongique.

Les chercheurs ont réalisé une variété de tests statistiques par SPSS18.0 (IBM, USA) et qui sont décrits dans le tableau suivant (Tableau 5) :

Tableau 5 : Les analyses statistiques

| Analyse | Test statistique |
|---|---|
| Zones d'inhibition de divers germes fongiques traités avec différents agents antifongiques | Analyse de variance à deux voies (ANOVA). |
| Zones d'inhibition de divers germes fongiques traités avec le même antifongique | ANOVA à sens unique. |
| Les résultats cliniques de la kératite fongique multi-germiques | Le test du khi carré |
| Relation entre la taille de la zone d'inhibition et les résultats clinique de kératomycose traitée par l'agent antifongique | La régression logistique |

1.1 Résultats et discussion

1.1.1 Le diagnostic microbiologique

Sur les 1000 patients incluses dans cette étude, seul 535 patients répondaient aux critères spécifiés par les chercheurs. Ces patients englobent 365 hommes et 170 femmes avec un intervalle d'âge compris entre 6 et 82 ans dont la majorité (82,3 %) été comprise entre 40 et 70 ans.

Lors de diagnostic microbiologique, Wanga et al ont identifié une variété de germes fongiques (36) dépendant de la région géographique du prélèvement. *Aspergillus* étaient le germe dominant dans 288 cas, répartie en 159 cas causé par *Aspergillus flavus*, 45 cas par *Aspergillus fumigatus*, 43 cas par *Aspergillus oryzae* et 41 cas causé par d'autres espèces d'*Aspergillus*. Les kératomycoses due à *Fusarium* été retrouvé uniquement chez 103 cas alors que 144 cas été contaminé par différents germes fongiques. Selon les résultats les chercheurs ont prouvé que la prédominance du genre *Aspergillus spp* et *Fusarium spp* figurant 70 à 80 % et de 10 % respectivement des cas de kératite en Chine. Ces résultats ont été en concordance avec celles de (Xie et al., 2006), et divergente des autres rapports où *Fusarium spp* figure (49,7 %) et *Aspergillus spp* (17,6 %) dont les chercheurs ont rendu cette différence à la différence géographique et saisonnière du prélèvement.

1.1.2 Test de sensibilité et traitement

Wanga et al, ont appliqué la méthode de diffusion sur disque afin d'évaluer et de tester *in vitro* la sensibilité des germes causants aux différents agents antifongiques, où ces résultats ont été représenté par ANOVA bidirectionnelle. Les résultats des tests sont ordonnés dans le tableau ci-dessous (Tableau 6) :

Tableau 6 : Les taille des zones d'inhibition des germes fongiques traité avec divers agents antifongiques en mm :

| | <i>Aspergillus</i> | <i>Fusarium</i> | Autres champignons |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>Nombre d'isolats</i> | 288 | 103 | 144 |
| <i>Natamycine</i> | 22.95±9.00 ^{a, b} | 25.34±7.70 ^b | 30.17±11.17 ^c |
| <i>Voriconazole</i> | 36.33±10.80 ^a | 25.34±7.70 ^b | 30.24±12.50 ^{c, d} |
| <i>Terbinafine</i> | 46.55±14.33 | 21.54±10.38 ^{a, e} | 36.54±16.14 ^a |
| <i>Amphotéricine B</i> | 13.37±5.40 ^a | 11.80±3.74 ^e | 18.75±7.93 ^c |
| <i>Kétoconazole</i> | 15.90±6.30 ^a | 10.79±4.23 ^e | 16.78±8.01 ^c |

p^a <0.000 Comparer avec *Aspergillus* traité par terbinafine.

p^b <0.000 Comparer avec d'autres champignons traités par natamycine.

p^c <0.000 Comparer avec d'autres champignons traités par terbinafine.

p^d <0.000 Comparer avec *Aspergillus* traité par voriconazole.

p^e <0.000 Comparer avec *Fusarium* traité par voriconazole.

Dans le cas du traitement des divers genres fongiques avec divers agents antifongiques, les chercheurs ont observés des différences importantes au niveau de la taille des zones, où lors du traitement avec la natamycine la zone d'inhibition d'*Aspergillus spp* étaient nettement plus petites que celles de *Fusarium spp* et d'autres champignons, alors que dans le cas du voriconazole, la zone d'inhibition d'*Aspergillus spp* était significativement plus grande que celles de *Fusarium spp* et d'autres champignons. Dans le cas du terbinafine la zone d'inhibition d'*Aspergillus ssp* été plus grande par rapport à celles du *Fusarium spp* et d'autres champignons. Dans les cas du traitement de la totalité des germes avec l'amphotéricine B et kétoconazole il y a observation des zones d'inhibition significativement petites par rapport aux autres molécules

antifongiques. A partir de ces résultats les auteurs ont conclu que le genre *Aspergillus spp* été le plus sensible à la terbinafine, puis au voriconazole, cependant les rapports de (Lalitha et al., 2006) ont démontré que la CMI50 de la natamycine était supérieure ou égale à celle du voriconazole, alors que la CMI90 de natamycine été plus élevée à celle du voriconazole (sauf pour le *Fusarium ssp* et *Bipolaris spp*).

Les résultats des tests réalisés par les auteurs été cohérente avec celle des rapport précédente (Lalitha et al., 2006) qui ont été réalisé en se basant sur la méthode conventionnelle de dilution en bouillon.

Les auteurs montraient que les résultats cliniques de la kératomycose étaient proportionnellement étroits à la sensibilité du pathogène traité par la natamycine *in vitro* cela signifie que lors du traitement par la natamycine plus la zone d'inhibition été grande plus la probabilité de guérissons été grandes et plus le taux d'éviscération été faible.

Cependant cette étude n'a pas montré une telle corrélation pour la terbinafine ou le voriconazole, de plus d'autres études montre que plus les CMI de la natamycine et du voriconazole sont élevées, plus la probabilité de perforation cornéenne est élevée. Wanga et al ont corréler les résultats cliniques par le nombre d'agents antifongiques auxquels les germes étaient sensibles malgré que cette corrélation n'ait pas grande comme celle entre la taille de la zone d'inhibition et les résultats cliniques lors des travaux *in vitro*.

1.1.3 Suivre des patients

Seul les patients (236) ayant complété leurs dossiers ont été suivis par les responsables pendant une période pas moins de 3 mois après la guérissons soit par traitement médical ou chirurgicales.

Les résultats de guérissons des patients atteints de kératite fongique lors de cette étude été importantes avec une proportion de 72,88% ce qui est supérieur à celle des études précédentes (Marlon Moraes et al., 2009). Wanga et al exprime que cette amélioration est due à la variété des souches fongiques et les stratégies thérapeutiques.

Wanga et al ont considéré leur étude comme étant limité à cause de l'incapacité de cultivé certains germes présents dans les isolats cornéen, cependant ces patients présentaient des résultats cliniques moins satisfaisantes. Les auteurs ont rendu la raison de ces résultats aux

erreurs de prélèvement ou à la difficulté de localisée la lésion et par la suite une inefficacité du traitement. Wanga et al ont conclu leur travail en déclarant qu'il y aura besoins d'autres techniques plus avancées et qui doivent être appliqué afin de dépasser ces limites ainsi qu'ils ont affirmé l'obligation d'une intervention chirurgicale dans le cas d'avoir moins d'agents sensibles.

Wanga et al ont énoncé que jusqu'à la date de l'étude aucun rapport n'été fait sur l'association entre la zone d'inhibition et l'évolution clinique tandis que l'étude de la sensibilité au agents antifongiques *in vitro* et de l'efficacité clinique du médicament dans le cas des kératomyose a été limitée.

Conclusion

Les kératites fongiques ou les kératomycoses sont des infections cornéennes sévères, redoutables et multifactorielles. Il en résulte des coûts de santé publique et socioéconomique vénérable. Leurs prises en charge est un véritable challenge puisqu'elles représentent l'une des principales causes de cécité au monde. Malgré l'apparition des nouveaux traitements antifongiques appropriés pour la plupart des agents pathogènes impliqués dans la survenue d'une telle infection, et l'amélioration considérable de ces traitements ainsi que la prise en charge au fil du temps, le pronostic et les résultats cliniques restent souvent médiocres suite à l'acquisition de la résistance des germes fongiques vis-à-vis des différentes molécules antifongiques, ce qui représente un défi supplémentaire.

Notre étude a permis de connaître la forme fongique des kératites "kératomyose" qui est caractérisé par sa complexité et sa sévérité ainsi que de mettre en lumière les facteurs favorisants et aggravants la survenue de celle-ci où elle est causée par une variété de germes fongiques dont leur identification est une condition nécessaire pour le choix thérapeutique.

Au terme de cette étude et en se basant sur les résultats de l'analyse d'articles nous avons relevé que les genres pathogènes prédominants à la survenue des kératomycoses étaient significativement *Aspergillus* et *Fusarium* ; dont les infections dues à *Aspergillus spp* étaient présente les pires résultats. A partir des résultats des isolats fongiques traités par la natamycine on peut conclure que plus la zone d'inhibition d'isolats traités par la natamycine est petite, plus la probabilité que la kératite fongique soit traitée est faible. Il est donc nécessaire de mener d'autres études plus adaptées, car cette pathologie demeure un problème de santé publique qu'il ne faut pas négliger.

La kératomyose est une pathologie dont les séquelles peuvent être évitées par le biais des stratégies qui devrez être multidimensionnelles renfermant des techniques de diagnostic précoce et précises, la découverte de nouveaux agents antifongiques afin de résoudre le problème du développement de la résistance aux médicaments ainsi que la prévention qui figure un indicateur fondamental pour l'élimination des facteurs prédisposants ces paramètres conditionnent le pronostic visuel final du patient.

Références bibliographiques

1. (2012). Récupéré sur MemoBio: <https://www.memobio.fr/liens.html>
2. Abdou, I. (2001). *Les infections oculaires au centre hospitalier national Yalgado Ouedraogo. Aspects bactériologiques et épidémiologiques*. Thèse de doctorat inédit, Université Ouagadougou.
3. Almi, H. (2016). *Etude des myco-pathogènes de Lens culinaris et évaluation de l'effet de deux souches de Trichoderma harzianum : cas de la Fusariose et de la Cylandrosporiose*. These de doctorat inédit, Université des Frères Mentouri.
4. Ana Espinel-Ingroffer, Annette W Fothergill, Mahmoud A Ghannoum, Michael A Pfaller, John H Rex, Thomas J Walsh . (2010). *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 30(11).
5. Antoine Herbaut, H. L. (2019). Analyse du film lacrymal et évaluation de sa qualité optique : Une revue de la littérature. *J Fr Ophtalmol*, 42, 226-243. doi:10.1016/j.jfo.2018.12.001
6. *Aspergillus niger*. (2020). Récupéré sur Wikipédia: https://fr.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_niger
7. Benadada, S. (2017). *Les kératites fongiques : Aspects cliniques et thérapeutiques à propos de 30 cas au Service d'Ophtalmologie A*. Thèse de doctorat inédit, Université Mohammed – Rabat.
8. Ben-Amira, M. (2018). *Etude de la relation mycoparasitaire Trichoderma harzianum avec Fusarium solani chez l'Olivier ; Caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez Trichoderma harzianum*. Thèse de doctorat inédit, Université de Carthage.
9. Benoît, T. (2017). *Etude épidémiologique des infections à Fusarium au CHRU de Nancy sur 10 ans et identification moléculaire d'espèces*. Thèse de doctorat inédit, Université de Lorraine .

10. Boro, A. (2014). *Aspects épidémiocliniques des kératites au Centre de Santé de Référence de la commune V du district de Bamako*. Thèse de doctorat inédit, Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako (USTTB) .
11. Bourdais, E. (2016). *Kératites infectieuses : étude rétrospective de 2013 à 2015 dans le service d'Ophthalmologie du CHRU de TOURS ; réalité de la situation et pistes pour en améliorer la prise en charge*. Thèse de doctorat inédit, Université François Rabelais - Faculté de médecine de Tours.
12. Boutkhil, L. (2010). *Les ulcères de cornée (A propos de 153 cas)*. Thèse de doctorat inédit, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.
13. Buil, O., Bourcier, T., Borderie, V., Laroche, L. (2002). Diagnostic et traitement des kératites. *Le concours médical*, 124(38), 2497-2501.
14. Chekiri-Talbi M, Denning D W. (2017). Estimation des infections fongiques en Algérie. *Journal De Mycologie Médicale*, 1-7. doi:10.1016/j.mycmed.2017.02.005
15. Coulon, C. (2011). *Amibes libres de l'environnement : Résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les Chlamydiales*. Thèse de doctorat inédit, Université Paris-Sud 11.
16. Couture, C. (2016). *Étude de la guérison des plaies cornéennes grâce à la cornée reconstruite par génie tissulaire*. Mémoire de maîtrise inédit, Université Laval , Québec, Canada.
17. Cuffaro, L. (2016). *Étude qualitative, objective et subjective des lentilles spot dans les pathologies cornéennes*. Mémoire inédit, Ecole d'orthoptie de Clermont-Ferrand.
18. David M. Geiser, Robert A. Samson, János Varga, Antonis Rokas and Sarah Melissa Witiak. (2008). *Aspergillus species in human keratomycosis*. Dans R. A. János Varga, *Aspergillus in the genomic era* (pp. 293-328). Department of Genetics Wageningen University and Research centre Wageningen, The Netherlands: Academic Publishers The Netherlands. doi:10.3920/978-90-8686-635-9

19. Debourgogne, A. (2013). *Typage moléculaire du complexe d'espèces Fusarium solani et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole*. Thèse de doctorat inédit, Université de Lorraine .
20. Dermu, M. (2014). *Étude de stabilité d'un collyre à l'Amphotéricine B 0.5%*. Thèse de doctorat inédit, Université de Poitiers.
21. El-Kirat-Chatel, S. (2010). *Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions Candida – phagocytes ; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez C. lusitaniae*. Thèse de doctorat inédit, Université Bordeaux 2 .
22. Feroui, A. (2014). *Analyse des images couleur du fond d'oeil pour l'aide au diagnostic en ophtalmologie : application à la détection des pathologies rétiniennes*. Thèse de doctorat inédit, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemecen.
23. Foucaud, A. (2012). *Lentilles corneennes : choix, contaminations fongiques et amibiennes et conseils à l'officine*. Thèse de doctorat inédit, Université de Limoges.
24. Hayer, K. (2013). *Germination of Aspergillus niger conidia*. Thèse de doctorat inédit , Université Nottingham.
25. L. Jouve, V. Borderie, C. Temstet, A. Labbé, L. Trinhc , O. Sandali, E. Basli, L. Laroche, N. Bouheraoua. (2015). Le crosslinking du collagène dans le kératocône. *Journal français d'ophtalmologie*, 38, 445-462. doi:10.1016/j.jfo.2014.12.003
26. Laatfa, I. (2019). *Les Kératites fongique : Problèmes diagnostiques thérapeutiques et profils évolutifs (à propos de 21 cas)*. Thèse de doctorat inédit, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.
27. Lagane, C. (2007). *Rôle de l'IL-13 et des ligands de ppar-γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de Candida albicans. implication de ppar-γ*. Thèse de doctorat inédit, Université Toulouse III – Paul Sabatier.

28. Lalitha Pranjna, Namperumalsamy Venkatesh Prajna, Amit Kabra, Kannan Mahadevan, Muthaiah Srinivasan. (2006). Risk factors for treatment outcome in fungal keratitis. *Ophthalmology*, 113(4), 526-530. doi:10.1016/j.ophtha.2005.10.063
29. Lecellier, A. (2013). *Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle*. Thèse de doctorat inédit, Université de Reims Champagne-Ardenne.
30. Lixin Xie, Wenxian Zhong, Weiyun Shi, Shiyong Sun. (2006). Spectrum of fungal keratitis in north China. *Ophthalmology*, 13(11). doi:10.1016/j.ophtha.2006.05.035
31. Lulu Wanga, Liya Wanga, Lei Han, Weijing Yin. (2015). Study of Pathogens of Fungal Keratitis and the Sensitivity of Pathogenic Fungi to Therapeutic Agents with the Disk Diffusion Method. *Current Eye Research*, 1-7. doi:10.3109/02713683.2015.1056802
32. Lupasco, T. (2019). *Etude comparative du programme de différenciation terminale de l'épithélium de la cornée normale et des patients atteints de kératocône*. Thèse de doctorat inédit, Université Toulouse 3 - Paul Sabatier.
33. Marlon Moraes Ibrahim, Rafael Vanini, Fuad Moraes Ibrahim, Livia S Fioriti, Eloisa M R Furlan, Luciana M A Provinzano, Rosane S De Castro, Sidney Julio De Faria E Sousa, Eduardo Melani Rocha. (2009). Epidemiologic aspects and clinical outcome of fungal keratitis in southeastern Brazil. *Eur J Ophthalmol*, 19(3), 355-361. doi:10.1177/112067210901900305
34. Massoudi, D. (2011). *Approches thérapeutiques des opacités cornéennes par modulation de l'activité de protéinases de la matrice extracellulaire*. Thèse de doctorat inédit, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
35. Mella, L. (2017). *Herpes ophtalmique : manifestations cliniques et traitements*. Thèse de doctorat inédit, Université de Bordeaux.
36. Melloul, E. (2015). *Aspergillose aviaire : Développement d'un modèle d'aspergillose chez la dinde (Meleagris gallopavo) et évaluation de l'efficacité de l'énilconazole*. Thèse de doctorat inédit, L'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (Agroparistech).

37. Moufaddal, M. H. (2019). *Diagnostic et prise en charge d'une kératite bactérienne*. Thèse de doctorat inédit, Université Mohammed V de Rabat.
38. Nazari, H. (2019). *Analyse prot omique et propriétés de r - pith liation des membranes amniotiques humaines après lyophilisation en vue d'une greffe de la surface oculaire*. Thèse de doctorat inédit, Université de Rouen Normandie.
39. Oubaaz, B. E. (2019). *Prise en charge des abcès graves de la cornée à l'hôpital militaire de Rabat à propos de 83 cas*. Thèse de doctorat inédit, Université Mohammed V.
40. Poli, M. (2014). *Techniques modernes de diagnostic paraclinique non invasif du déficit en cellules souches limbiq es : comparaison, développement, recommandations*. Thèse de doctorat inédit, Université CLAUDE BERNARD – LYON 1.
41. Quatresous, N. (2011). *Aspergillose humaine. Epidémiologie, diagnostic biologique, contrôle*. Thèse de doctorat inédit, Université de Limoges.
42. Raynard, A. (2018). *Prévention et traitement des aspergilloses invasives liées à Aspergillus fumigatus*. Thèse de doctorat inédit, Université CLAUDE BERNARD – LYON 1.
43. Regina L. Sun, Dan B. Jones, et Kirk R. Wilhelmus. (2007). Clinical Characteristics and Outcome of Candida Keratitis. *American journal of ophthalmology*, 143(6), 1043-1045.

44. Rocher, F. (2016). *[Chirurgie de la cataracte:] -Etude comparative de la tension oculaire et de l'ouverture de l'angle iridocorneen*. Thèse inédit, Ecole d'orthoptie de Clermont-Ferrand.
45. Schalk, O. (2017). *La contactologie à 'officine : complications liées au port des lentilles de contact et modalités d'entretien*. Thèse de doctorat inédit, Université de Lorraine .
46. Semaha, S. (2020). *Les keratites infectieuses : manifestations cliniques et prise en charge*. Thèse de doctorat inédit, Université d'Aix-Marseille.
47. Shapiro Bl, Lalitha P, Loh Ar, Fothergill Aw, Prajna Nv, Srinivasan M, Kabra A, Chidambaram J, Acharya Nr, Lietman Tm. (2010). Susceptibility testing and clinical outcome in fungal keratitis. *Br J Ophthalmol*, 94(3), 384-385 . doi: 10.1136/bjo.2009.158675
48. T. Bourcier , A. Sauer, V. Letscher-Bru, E. Candolfi. (2011). Kératites fongiques. *Journal français d'ophtalmologie* , 34, 563-567. doi:10.1016/j.jfo.2011.03.001
49. T. Bourcier, , A. Sauer, A. Dory, J. Denis, M. Sabou. (2007). Kératites bactériennes. *Ophthalmologie*. doi:10.1016/S0246-0343(07)44214-9
50. T. Bourcier, A. Sauer, A. Dory, J. Denis, M. Sabou. (2017). Kératites fongiques. *Journal français d'Ophtalmologie*, 40(10), 882-888. doi:10.1016/j.jfo.2017.05.013
51. Terki, M. (2015). *Formation de biofilms et sensibilité de Candida sp. isolées du CHU de Tlemcen à l'amphotéricine B*. Thèse de doctorat inédit , Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.
52. Thomas, P. A. (2003). Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 730–797. doi:10.1128/CMR.16.4.730–797.2003
53. Tidu, A. (2016). *Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I*. Thèse de doctorat inédit, Université Pierre et Marie Curie.
54. Venkatesh Prajna N, Tiruvengada Krishnan, Jeena Mascarenhas, Revathi Rajaraman, Lalitha Prajna, Muthiah Srinivasan, Anita Raghavan, Catherine E Oldenburg, Kathryn

J Ray, Michael E Zegans, Stephen D McLeod, Travis C Porco, Nisha R Acharya, Thomas M Lietm. (2013). The mycotic ulcer treatment trial: a randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *Jama Ophthalmol*, 131(4), 422-429. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.1497

55. YUCEF-ALI, M. (2014). *Etude de l'activité anti-Candida albicans des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides*. Thèse de doctorat inédit, Université Constantine 1 .

56. Zarour, F. (2016). *Prévention et traitement de la cataracte*. Thèse de doctorat inédit, Université Toulouse III Paul Sabatier .

Annexe

This article was downloaded by: [RMIT University]

On: 14 August 2015, At: 13:00

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: 5 Howick Place, London, SW1P 1WG



Current Eye Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.tandfonline.com/loi/icey20>

Study of Pathogens of Fungal Keratitis and the Sensitivity of Pathogenic Fungi to Therapeutic Agents with the Disk Diffusion Method

Lulu Wang^a, Liya Wang^a, Lei Han^a & Weijing Yin^a

^a Department of Ophthalmology, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou, P.R. China

Published online: 11 Aug 2015.



[Click for updates](#)

To cite this article: Lulu Wang, Liya Wang, Lei Han & Weijing Yin (2015): Study of Pathogens of Fungal Keratitis and the Sensitivity of Pathogenic Fungi to Therapeutic Agents with the Disk Diffusion Method, Current Eye Research, DOI: [10.3109/02713683.2015.1056802](https://doi.org/10.3109/02713683.2015.1056802)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/02713683.2015.1056802>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

ORIGINAL ARTICLE

Study of Pathogens of Fungal Keratitis and the Sensitivity of Pathogenic Fungi to Therapeutic Agents with the Disk Diffusion Method

Lulu Wang, Liya Wang, Lei Han and Weijing Yin

Department of Ophthalmology, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou, P.R. China

ABSTRACT

Purpose/Aim of the study: To identify the causative fungi of fungal keratitis, test their susceptibility to antifungal agents with the disk diffusion method and study the relationship between the organisms, the inhibition zones and the clinical outcomes.

Materials and methods: 535 patients with fungal keratitis in one eye were included in this study. Pathogenic fungi were isolated by corneal scraping, identified by fungal cultivation and subjected to drug sensitivity tests conducted with the disk diffusion method. The patients were treated initially with voriconazole, terbinafine and natamycin eye drops for one week. Further treatment continued using the most effective drug according to the drug sensitivity results. The patients were followed up every week until three months after cured. The inhibition zones of fungi cultured with voriconazole, terbinafine and natamycin were compared. The relationship between inhibition zones and organism, organism and treatment results measure, and each treatment results measure and inhibition zones were evaluated.

Results: Of 535 patients, 53.84%, 19.25% and 26.91% were infected with *Aspergillus*, *Fusarium* and other fungi, respectively. Keratitis patients infected with *Aspergillus* keratitis had the worst outcome. The size of the inhibition zones of *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and other fungal genera differed significantly in response to voriconazole, terbinafine and natamycin. The inhibition zone associated with natamycin correlated significantly with the clinical outcome of fungal keratitis (OR = 0.925), but no other such correlations were found for the other drugs tested.

Conclusions: *Aspergillus* and *Fusarium* were the predominant pathogenic genera causing fungal keratitis in our patients. Among the causative fungi, infections due to *Aspergillus* spp. were associated with the worst outcomes. The inhibition zones of fungal isolates in response to natamycin significantly correlated with the treatment outcomes of keratitis. Specifically, the smaller the natamycin inhibition zone, the lower the probability that the fungal keratitis had been eliminated.

Keywords: Disc diffusion method, drug sensitivity, fungal pathogens, inhibition zone, keratitis, treatment results

INTRODUCTION

Fungal keratitis is a significant cause of blindness all over the world. Among patients with corneal ulcer, fungal keratitis is as high as 34.4–61.9%.^{1–5} Some studies indicate that early appropriate drug treatment and timely effective surgical intervention is very important to eliminate the fungal infection and save

the vision and eyeballs of patients. However, the susceptibility of keratitis-causing pathogens to anti-fungal drugs can vary.

Previously, the sensitivity of keratitis-causing fungi to antifungal drugs was most often judged according to the minimum inhibitory concentration (MIC) measured by the broth dilution method (*in vitro*), approved by the Clinical and Laboratory

Received 22 December 2014; revised 20 May 2015; accepted 26 May 2015; published online 10 August 2015

Correspondence: Liya Wang, MD, Department of Ophthalmology, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, P.R. China. Tel: +86 037165580914. E-mail: doctwly@126.com

Standards Institute (CLSI). More recently, the disk diffusion method has been applied for antifungal drug susceptibility testing, because it is easier to perform, faster and less expensive compared with other methods.^{6,7} However, antifungal-drug sensitivity testing using the disk diffusion method for pathogens that cause keratitis has not been reported.

In the present study, the disk diffusion method was used to evaluate the susceptibility to antifungal drugs of pathogenic fungi that cause keratitis. Subsequently, associations of the fungal strains between drug sensitivity and clinical outcomes of fungal keratitis were investigated. Thus, the present study provides useful information for effective treatment of fungal keratitis.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

From October 2013 to March 2014, more than 1000 patients at the Zhengzhou University People's Hospital received diagnoses of fungal keratitis after slit-lamp microscopy, corneal scraping and fungal cultivation. Of these, 535 patients with one affected eye met the following criteria for pathogen drug-sensitivity testing and inclusion in the study: fungal keratitis lesions $\geq 2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$, positive fungal test via corneal scraping examination, and successful fungal cultivation *in vitro*. Patients were excluded if they did not meet the above criteria, or had corneal perforation, autoimmune disease, diabetes, thyroid disease, or were pregnant. The study was approved by the Zhengzhou University People Hospital Ethics Committee. Written consents were obtained from all the patients in the study.

Materials

The medicinal eye drops used for the *in vitro* drug sensitivity tests and clinical treatments were: 0.5% voriconazole (H177900, DSM Pharmaceuticals, USA), 0.25% terbinafine (H20063611, Beijing Medicine, Beijing, China), 5% natamycin suspension (Natacyl, ALCON, USA), or 0.1% amphotericin B, or 0.5% ketoconazole (H20121489 and H20121485, respectively; Henan Eye Institute, Zhengzhou, China).

Slit-Lamp Microscopy

After patients underwent a vision test, the size of infection, size of ulcer, depth of infiltration and inflammation of the anterior chamber were examined via slit-lamp microscopy.

Corneal Scraping and Fungal Cultivation

After applying topical anesthesia with 0.4% oxybutyrocaine hydrochloride eye drops (Santen Pharmaceutical Co., Ltd, Japan) onto the cornea of the affected eye, corneal scraping was performed using a disposable microscopic surgical blade, under a slit-lamp microscope. The tissue obtained from the eyes was directly smeared onto a labeled slide for 10% KOH wet mount and Gram stain examinations. Patients were further considered for inclusion in the study if the examination results were positive for fungus in wet mount and negative for bacteria in Gram stains. Subsequently, scrapings were used to inoculate Sabouraud agar or potato dextrose agar for fungal cultivation. Fungal cultures were determined to be positive if the fungus grew in both agars or grew very well in one of the agars. Identification of fungi was based on gross and microscopic characteristics, which have been described previously.⁸

Drug Sensitivity Test

The sensitivity of fungi to 0.5% voriconazole, 0.25% terbinafine, 5% natamycin, 0.1% amphotericin B or 0.5% ketoconazole was measured using the disk diffusion method in accordance with the M51-A standards published by CLSI.^{9,10} The results were recorded as sensitive if the inhibition zone was larger than 20 mm in diameter.^{9,10}

Treatment and Follow-Up

Before results of the drug sensitivity test were obtained, the patients were treated with 5% natamycin, 0.5% voriconazole and 0.25% terbinafine eye drops for one week, after which the most sensitive drug was administered according to the results of the drug sensitivity test. All the patients were examined every week until three months after cured. At each follow-up, the size and depth of the infiltration was determined using slit-lamp microscopy, and changes in fungal mycelia using confocal microscopy. In cases in which there was no improvement of symptoms after one month of drug treatment, a surgical intervention was applied and the drug treatment was considered not effective. The drug treatment was considered effective if there was recovery of the corneal epithelium on the infected lesion, no corneal perforation, no fungal mycelia (filaments) observed under confocal microscope and elimination of inflammation in the anterior chamber.

Statistical Analyses

The differences in inhibition zones among various fungal genera treated with the various antifungal agents were evaluated by two-way analysis of

variance (ANOVA). The differences in inhibition zones among various fungi treated with the same antifungal agent were evaluated by one-way ANOVA. The chi-squared test was used to analyze the clinical outcomes of keratitis caused by various fungi. Logistic regression was used to analyze the association between the size of the inhibition zone and the clinical outcome of the fungal keratitis treated with the antifungal agent. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The software used for statistical analyses was SPSS18.0 (IBM, USA).

RESULTS

Based on the positive results from fungal cultures, of the 1000 patients screened, 535 patients (365 in males, 170 in females) received diagnoses of fungal keratitis. The ages ranged from 6 to 82 years old, in which most of them 40–70 years old (82.3%).

Most commonly, infections were due to *Aspergillus* spp. (288 cases, 53.8%), specifically *A. flavus* (159 cases), *A. fumigatus* (45 cases), *A. oryzae* (43 cases), and other *Aspergillus* species (41 cases). The second most common fungal genera was *Fusarium* (103 cases, 19.25%). Two hundred and thirty-six patients had complete records. These 236 were followed up for at least three months, after the infection had been eliminated by drug or surgical treatment, and the clinical outcomes of these patients were recorded.

Comparison of Inhibition Zones Among Different Fungal Isolates Exposed to Various Antifungal Drugs

Up to thirty-two pathogenic fungal species were identified and categorized as *Fusarium*, *Aspergillus* or others. The antifungal sensitivity test was conducted *in vitro* using the disk diffusion method. Significant differences in the size of inhibition zones were evaluated among various fungal genera treated with various antifungal agents via two-way ANOVA ($F_{\text{fungal genera}} = 88.06$, $p < 0.000$; $F_{\text{antifungal drugs}} = 477.79$, $p < 0.000$).

The inhibition zones of various fungi when treated with the same antifungal agent were also observed. When treated with natamycin, the inhibition zones of *Aspergillus* spp. were significantly smaller compared with those of *Fusarium* and other fungi. However, the inhibition zone of *Aspergillus* was significantly larger than those of *Fusarium* and other fungi when treated with voriconazole (Tables 1 and 2; Figures 1 and 2). A larger inhibition zone was observed in *Aspergillus* treated with terbinafine when compared with those of *Fusarium* and other fungi (Tables 1 and 2; Figures 1 and 2).

The inhibition zones of fungal genera (*Aspergillus*, *Fusarium*, and all others) in response to different

antifungal agents were compared (Table 2). For species of *Fusarium*, the inhibition zone in response to voriconazole or natamycin was significantly larger than that obtained via the other antifungal drugs. The inhibition zones of *Aspergillus* spp. were significantly larger in response to terbinafine than to the other antifungal agents ($F = 571.61$, $p < 0.000$). The inhibition zones of fungi other than *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. were largest in response terbinafine, followed by natamycin and voriconazole ($F = 67.48$, $p < 0.000$). For all the fungi tested, inhibition zones in response to amphotericin B and ketoconazole were significantly smaller inhibition zones compared with those of voriconazole, natamycin and terbinafine ($p < 0.000$; Tables 1 and 2; Figure 3).

Comparison of Clinical Outcomes Among Keratitis Caused by Various Fungi

The overall rate of cure was 72.88% in the patients with fungal keratitis (Table 3). Of all the pathogenic fungi, *Aspergillus* had the worst outcome with a low rate of cure (65.54%) and a higher evisceration rate ($\chi^2 = 6.77$, $p = 0.034$).

Correlation Between the Size of Inhibition Zones and Clinical Outcomes

Considering the antifungal drug natamycin, a high correlation was observed between the size of inhibition zone and clinical outcome; the larger the inhibition zone, the higher the rate of cure and the lower rate of evisceration. The correlation could be expressed mathematically as: $\ln[P/(1 - P)] = 2.304 - 0.082 \times \text{size of inhibition zone}$ (OR = 0.921).

In the other four antifungal drugs, no significant correlation was observed between the size of the inhibition zone and the clinical outcome.

In addition, in the *in vitro* experiment, the number of drugs to which a fungal agent was susceptible correlated with the clinical results of the fungal keratitis, although the significance was not as great as that between the size of the inhibition zone and clinical results. The correlation could be expressed mathematically as: $\ln[P/(1 - P)] = 0.124 - 0.353 \times \text{number of sensitive drugs}$ (OR = 0.702).

The stepwise regression analysis indicated that the size of the inhibition zone in response to natamycin correlated more closely to clinical results than did that of the other antifungal drugs.

DISCUSSION

Appropriate drug treatment in the early stage of fungal keratitis is very important for improving

TABLE 1 Size of inhibition zones of fungal isolates in culture with various antifungal drugs, mm.

| | Cases | Natamycin | Voriconazole | Terbinafine | Amphotericin B | Ketoconazole | Yes | No |
|-------------------------------|-------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|-----|----|
| <i>Aspergillus candidus</i> | 3 | 28.00 ± 10.58 | 35.67 ± 4.04 | 35.00 ± 8.66 | 20.00 ± 10.58 | 18.67 ± 7.23 | 1 | 0 |
| <i>A. flavus</i> | 159 | 21.73 ± 8.34 | 36.47 ± 11.34 | 47.39 ± 14.01 | 12.50 ± 4.65 | 16.30 ± 6.19 | 43 | 25 |
| <i>A. fumigatus</i> | 45 | 23.02 ± 8.23 | 34.69 ± 11.11 | 48.80 ± 11.94 | 14.56 ± 6.10 | 15.04 ± 5.46 | 10 | 5 |
| <i>A. japonicus</i> | 2 | 16.00 ± 11.31 | 27.00 ± 26.87 | 32.00 ± 33.94 | 12.00 ± 5.66 | 13.50 ± 7.78 | 2 | 0 |
| <i>A. niger</i> | 28 | 31.61 ± 9.47 | 40.04 ± 8.69 | 44.07 ± 17.20 | 15.25 ± 5.26 | 14.32 ± 6.35 | 11 | 4 |
| <i>A. oryzae</i> | 43 | 20.21 ± 8.12 | 37.65 ± 7.58 | 47.00 ± 13.27 | 14.02 ± 6.48 | 17.65 ± 7.51 | 10 | 6 |
| <i>A. ochraceu</i> | 4 | 23.25 ± 9.22 | 23.75 ± 10.40 | 32.00 ± 16.41 | 16.25 ± 6.70 | 15.00 ± 7.79 | 1 | 0 |
| <i>A. terreus</i> | 1 | 30 | 40 | 45 | 14 | 9 | 1 | 0 |
| <i>A. versicolor</i> | 3 | 15.00 ± 5.00 | 37.67 ± 4.04 | 53.00 ± 7.55 | 10.33 ± 0.58 | 11.00 ± 1.00 | – | – |
| <i>Fusarium avenaceum</i> | 1 | 22 | 23 | 31 | 9 | 9 | 1 | 0 |
| <i>F. equiseti</i> | 1 | 25 | 20 | 15 | 9 | 9 | 1 | 0 |
| <i>F. moniliforme</i> | 25 | 26.28 ± 7.88 | 29.72 ± 8.91 | 26.72 ± 9.39 | 11.52 ± 3.27 | 10.72 ± 3.56 | 11 | 2 |
| <i>F. oxysporum</i> | 1 | 21 | 46 | 36 | 8 | 18 | 1 | 0 |
| <i>F. poae</i> | 3 | 25.00 ± 5.00 | 15.00 ± 3.61 | 13.00 ± 6.93 | 10.33 ± 1.15 | 11.00 ± 3.46 | – | – |
| <i>F. proliferatum</i> | 4 | 28.25 ± 5.25 | 32.50 ± 6.35 | 34.50 ± 15.61 | 10.25 ± 1.26 | 11.25 ± 3.30 | – | – |
| <i>F. solani</i> | 68 | 24.96 ± 8.17 | 25.84 ± 10.34 | 17.32 ± 10.01 | 11.85 ± 3.69 | 9.90 ± 2.99 | 22 | 3 |
| <i>Alternaria</i> | 45 | 29.38 ± 12.05 | 31.98 ± 11.23 | 29.87 ± 14.96 | 20.18 ± 6.98 | 17.13 ± 6.95 | 17 | 8 |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> | 2 | 37.00 ± 7.07 | 45.00 ± 9.90 | 46.00 ± 8.48 | 24.00 ± 11.31 | 17.50 ± 3.54 | 2 | 0 |
| Blue mold | 6 | 30.67 ± 7.94 | 20.17 ± 4.71 | 42.17 ± 12.17 | 20.33 ± 5.13 | 10.33 ± 1.75 | 2 | 0 |
| <i>Cephalosporium</i> | 11 | 24.36 ± 8.45 | 34.36 ± 14.19 | 33.27 ± 13.37 | 11.45 ± 3.21 | 12.82 ± 4.85 | 3 | 0 |
| Common <i>Penicillium</i> | 12 | 29.58 ± 11.74 | 24.92 ± 15.16 | 40.58 ± 15.73 | 14.67 ± 8.38 | 13.08 ± 5.14 | 7 | 1 |
| <i>Curvularia lunata</i> | 4 | 36.25 ± 5.91 | 42.75 ± 7.36 | 44.75 ± 4.57 | 19.00 ± 8.60 | 20.00 ± 11.14 | 2 | 0 |
| Dematiaceae family | 1 | 36 | 32 | 64 | 34 | 28 | – | – |
| <i>Exophiala spinifera</i> | 3 | 41.67 ± 12.50 | 34.33 ± 22.50 | 38.67 ± 15.01 | 17.33 ± 2.31 | 25.33 ± 14.05 | – | – |
| <i>Neurospora</i> | 2 | 36.00 ± 0.00 | 41.00 ± 1.41 | 59.00 ± 1.41 | 31.00 ± 7.07 | 25.00 ± 7.07 | – | – |
| Non-sporing | 44 | 31.25 ± 12.15 | 29.30 ± 12.66 | 37.64 ± 17.68 | 19.39 ± 8.72 | 17.11 ± 8.48 | 20 | 6 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | 8 | 27.25 ± 11.84 | 21.87 ± 9.33 | 34.75 ± 17.04 | 13.13 ± 5.92 | 16.13 ± 10.62 | 3 | 0 |
| <i>Penicillium implicatum</i> | 1 | 30 | 28 | 56 | 28 | 22 | – | – |
| <i>Phialophora</i> | 1 | 30 | 38 | 52 | 20 | 15 | – | – |
| <i>Piriformospora</i> | 1 | 29 | 28 | 20 | 19 | 10 | – | – |
| <i>Stemphylium botryosum</i> | 1 | 21 | 22 | 40 | 30 | 24 | – | – |
| <i>trichoderma Koningi</i> | 2 | 24.00 ± 8.49 | 14.00 ± 1.41 | 45.00 ± 21.41 | 26.50 ± 2.12 | 31.50 ± 12.02 | – | – |

“Yes” means an effective drug treatment. “No” means an ineffective drug treatment.

TABLE 2 Size of inhibition zones of fungal genera treated with five antifungal drugs, mm.

| | <i>Aspergillus</i> | <i>Fusarium</i> | Other fungi |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Number of isolates | 288 | 103 | 144 |
| Natamycin | 22.59 ± 9.00 ^{a,b} | 25.34 ± 7.70 ^b | 30.17 ± 11.17 ^c |
| Voriconazole | 36.33 ± 10.80 ^a | 27.39 ± 10.50 ^d | 30.24 ± 12.50 ^{c,d} |
| Terbinafine | 46.55 ± 14.33 | 21.54 ± 10.38 ^{a,e} | 36.54 ± 16.14 ^a |
| Amphotericin B | 13.37 ± 5.40 ^a | 11.80 ± 3.74 ^e | 18.75 ± 7.93 ^c |
| Ketoconazole | 15.90 ± 6.30 ^a | 10.79 ± 4.23 ^e | 16.78 ± 8.01 ^c |

^a $p < 0.00$, compared with *Aspergillus* treated with terbinafine.

^b $p < 0.00$, compared with other fungi treated with natamycin.

^c $p < 0.00$, compared with other fungi treated with terbinafine.

^d $p < 0.00$, compared with *Aspergillus* treated with voriconazole.

^e $p < 0.00$, compared with *Fusarium* treated with voriconazole.

clinical results. However, various fungal strains and their sensitivity to antifungal drugs make the clinical results of fungal keratitis very complicated. Moreover, the causative fungal genera vary in different geographic regions.¹¹ For example, *Candida* is more prevalent in developed countries and colder regions, while *Fusarium* and *Aspergillus* are responsible for 70–80% and 10%, respectively, of infections in China.¹² The results of the present study are generally

consistent with previous reports that *Fusarium* (17.6%) and *Aspergillus* (49.7%) are the predominant pathogens of fungal keratitis in China. The differences in percentages between the present study and previous reports may be because data were obtained in different seasons and regions.

The treatment strategy implemented in the present study was based on the guidelines of the Chinese Medical Association. That is, before fungal

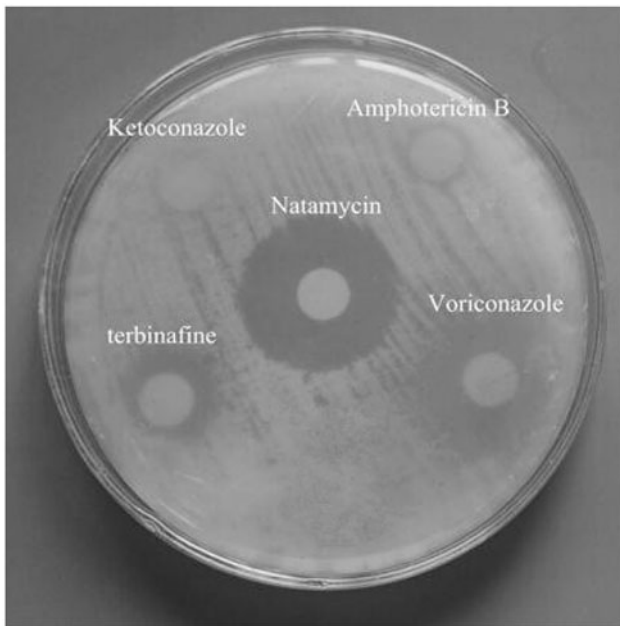


FIGURE 1 Drug sensitivity test of *Fusarium* spp. when treated with various antifungal drugs. The inhibition zones are shown clearly.

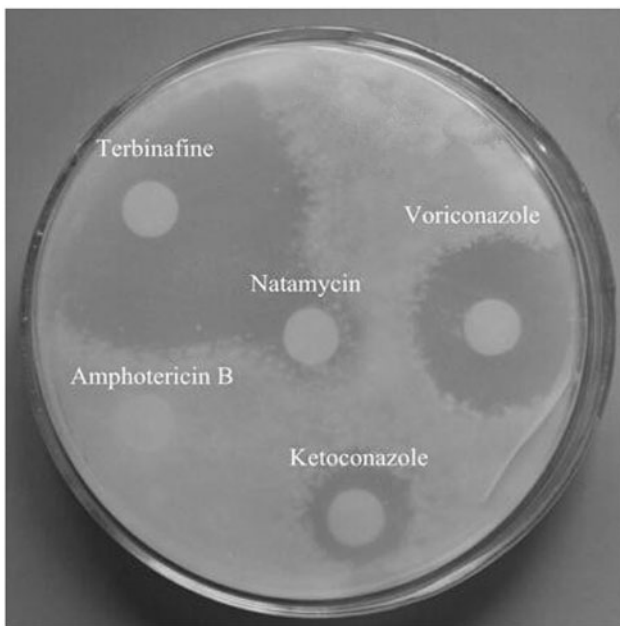


FIGURE 2 Drug sensitivity test of *Aspergillus* spp. when treated with various antifungal drugs. The inhibition zones are shown clearly.

identification and a drug sensitivity test were completed, natamycin eye drops were applied as the initial treatment. After the pathogens were identified and the results of the drug sensitivity tests were obtained, the treatment was adjusted to the appropriate drugs depending on fungal sensitivity. Multiple antifungal drugs are usually applied together to reduce drug resistance.

The results of the present study indicated that the inhibition zones formed by the fungal pathogens in

response to amphotericin B and ketoconazole were significantly smaller than the inhibition zones induced by other drugs. Since the patients in the present study were usually hospitalized for more than 5 days with severe symptoms, they were initially treated with natamycin, terbinafine and voriconazole eye drops. The overall cure rate was 72.88%, which is higher than those of previous reports.^{13,14} The better cure rate may be due to differences in fungal strains or therapeutic strategies compared with the previous studies.

The *in vitro* drug sensitivity tests of the present study indicated that *Aspergillus* spp. were the most sensitive to terbinafine, and then voriconazole. The sensitivities of *Fusarium* spp. to voriconazole and natamycin were similar. For all the test fungi, the sizes of the inhibition zones in response to voriconazole were either larger or equal to that of natamycin.

In previous research, Lalitha et al.¹⁵ used the standard broth dilution method and reported that the MIC₅₀ of natamycin was higher than or equal to the MIC₅₀ of voriconazole. Furthermore, natamycin had a higher MIC₉₀ than did voriconazole (except for *Fusarium* and *Bipolaris* spp.), and that, compared with other fungal genera, *Aspergillus* had the lowest MIC to voriconazole. Our findings are consistent with the report of Lalitha et al., and therefore show that the results of the disk diffusion method are consistent with those of the conventional broth dilution method.

Clinical trials from multiple centers found that natamycin was more effective than voriconazole in treating *Fusarium*-caused keratitis; there was no difference between the two drugs for keratitis due to other fungal genera.¹⁶ Because the present study combined antifungals used for the first week, the effectiveness and clinical results of any individual antifungal drug warrant further study.

In the present study, *Fusarium* spp. and other fungi were significantly more sensitive than *Aspergillus* spp. to natamycin. The inhibition zones in response to natamycin closely correlated to the clinical results of fungal keratitis. Therefore, the clinical results of keratitis caused by *Fusarium* and other fungi were better than that of *Aspergillus*. Our results were consistent with the results of Lalitha et al.¹⁵ and Shapiro et al.,¹⁷ who reported that *Aspergillus*-induced keratitis was more difficult to eliminate compared with keratitis due to *Fusarium* infection. However, some researchers reported that there was no significant difference in keratitis clinical results caused by various fungi,¹⁸ while others found that *Fusarium*-induced keratitis had the worst clinical results.¹⁹ The difference in results may be due to different clinical treatments. However, in the present study, there were fewer cases of *Fusarium* keratitis than cases due to *Aspergillus*, and a study with larger sample populations is necessary to determine the difference in clinical results among fungal genera.

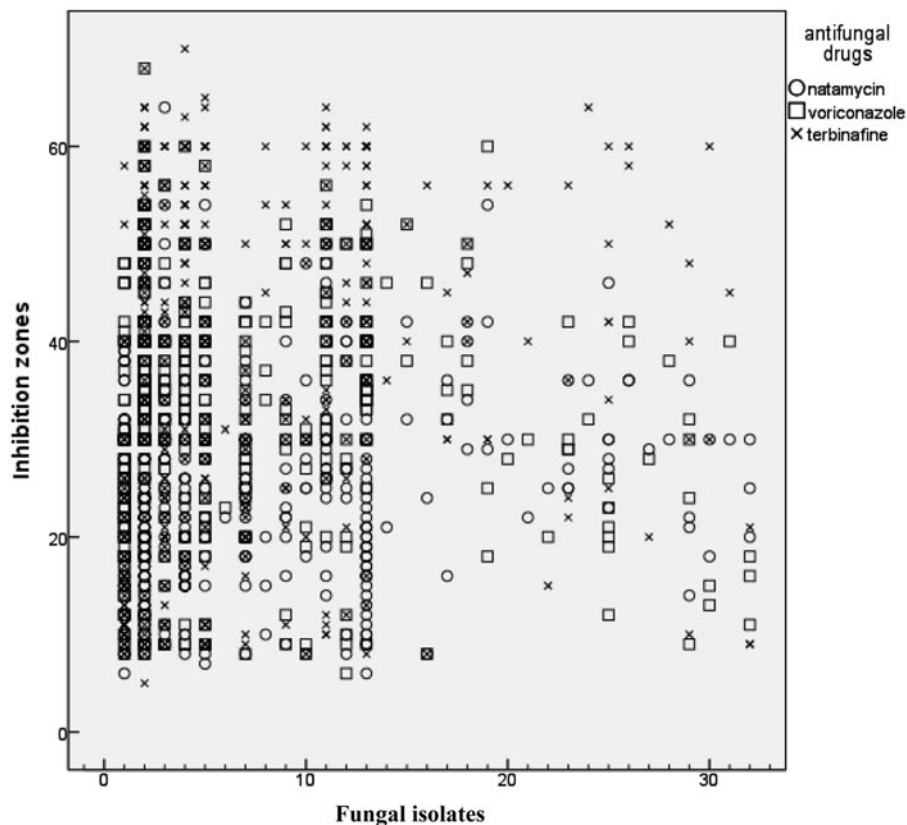


FIGURE 3 Results of susceptibility testing for organism and antifungal drugs. The *y*-axis shows the size of inhibition zones and the *x*-axis shows each of 32 fungal isolates as follows: 1. *F. solani*; 2. *A. flavus*; 3. *Alternaria*; 4. *A. fumigatus*; 5. Non-sporing; 6. *F. avenaceum*; 7. *F. moniliforme*; 8. *A. versicolor*; 9. *Cephalosporium*; 10. *Penicillium citrinum*; 11. *A. niger*; 12. Common *Penicillium*; 13. *A. oryzae*; 14. *F. oxysporum*; 15. *Bipolaris sorokiniana*; 16. *Aspergillus japonicus*; 17. *A. candidus*; 18. *Curvularis lunata*; 19. *Exophiala spinifera*; 20. *Penicillium implicatum*; 21. *Stemphylium botryosum*; 22. *F. equiseti*; 23. *F. proliferatum*; 24. Dematiaceae; 25. Blue mold; 26. Neurospora; 27. Piriformospora; 28. *Phialophora*; 29. *A. ochraceus*; 30. trichoderma Koningi; 31. *A. terreus*; 32. *F. poae*.

TABLE 3 Comparison of clinical results of keratitis caused by various fungi.

| | Effectiveness of drug treatment (eyes) | | χ^2 | <i>p</i> |
|--------------------|--|---------|----------|----------|
| | Yes (172) | No (64) | | |
| <i>Aspergillus</i> | 78 | 41 | 6.67 | 0.034 |
| <i>Fusarium</i> | 37 | 8 | | |
| Other fungi | 57 | 15 | | |

“Yes” means an effective drug treatment. “No” means an ineffective drug treatment.

In the present study, the clinical results of keratitis closely correlated to the *in vitro* sensitivity of the pathogen to natamycin. The larger the inhibition zone in response to natamycin, the higher the probability that the keratitis could be cured. There was no such correlation for terbinafine or voriconazole. There was a published report that the higher the MICs of natamycin and voriconazole, the higher the probability of corneal perforation.¹⁸ A whole-body study revealed that the biological availability of voriconazole, a pyrrole antifungal, correlated with MIC and clinical outcome, and there was no correlation between *in vitro* voriconazole sensitivity and clinical

outcome. There were also no correlations between the MICs of pyrrole antifungals and their clinical effectiveness. The drug’s concentration in the blood did not correlate with the effectiveness of the clinical treatment. This is the common feature of pyrrole antifungals.^{20,21} However, our study used natamycin as the initial treatment, in accordance with the opinion of the Chinese Academy of Medicine.

Until now, the study of *in vitro* drug sensitivity and the drug’s clinical effectiveness for fungal keratitis has been limited, and there has been no report of an association between inhibition zone and clinical outcome. Thomas et al.²² pointed out that the effectiveness of oral itraconazole capsule in clinical trials for fungal keratitis correlated to the *in vitro* MICs of pathogenic fungi. Prajna et al.¹⁶ indicated that the effectiveness of clinical treatment using 5% natamycin correlated to the *in vitro* sensitivity of the pathogens to the drug. Ghannoum²³ indicated that if the MIC increased by twofold, the cure rate of fungal keratitis decreased by 47%. In addition, we found that the numbers of antifungal drugs that the fungi were sensitive to correlated to the clinical results. More specifically, the higher the number of sensitive drugs, the better the clinical results. In contrast, if an *in vitro*

study showed that there were fewer sensitive drugs, this would indicate a poorer clinical result and a surgical intervention should be applied as soon as possible.

A limitation of the present study is that some fungi were present in the corneal scraping samples, but could not be cultured. The patients with those fungi had poorer clinical results. The reason may be that the infection was located in the deeper corneal tissue and an adequate sample could not be obtained during the scraping. The treatment was usually not very effective, likely because it is more difficult for the drugs to diffuse into a deeper lesion. To overcome this limitation, advanced techniques should be applied to increase the positive culture rate of fungi. In addition, evaluations of clinical prognoses may have been limited because patients with corneal perforation were excluded from the study. The reason, we excluded such patients, was that they did not receive standard natamycin and voriconazole treatment in the early stage, which might negatively affect the results of the study.

DECLARATION OF INTEREST

Foundations: Supported by Henan provincial health and family planning commission (No: 201403199 and 200703092). The scientific and technological project of Henan Scientific Committee (No: 112102310193, 132102310132 and 072103810601), The key scientific research project of Education Department of Henan Province (No: 12A320068), and Foundation for University Young Key Teacher of He'nan Educational Committee (2013GGJS-023).

The authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

1. 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;51:315–321.
2. 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.
3. Leck A, Thomas P, Hagan M, Kaliamurthy J, Ackuaku E, John M, et al. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1211–1215.
4. Srinivasan M. Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15:321–327.
5. Zhong W, Xie L, Shi W, Sun S. Spectrum of infection of fungal keratitis: analysis of 654 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006;86:1681–1685.
6. Martos AI, Martín-Mazuelos E, Romero A, Serrano C, González T, Almeida C, et al. Evaluation of disk diffusion

- method compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of 3 echinocandins against *Aspergillus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73:53–56.
7. López-Oviedo E, Aller A, Martin C, Castro C, Ramirez M, Pemán J, et al. Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1108–1111.
8. Larone DH. Medically important fungi: a guide to identification. American Society for Microbiology; 1995.
9. Institute CLS. Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of non-dermatophyte filamentous fungi; approved guideline. CLSI document M51-A. Villanova (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
10. Institute CLS. Performance standards for antifungal disk diffusion susceptibility testing of non-dermatophyte filamentous fungi; Informational supplement. 1st ed. CLSI document M51-A. Villanova (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
11. Saha S, Banerjee D, Khetan A, Sengupta J. Epidemiological profile of fungal keratitis in urban population of West Bengal, India. *Oman J Ophthalmol* 2009;2:114–118.
12. Xie L, Zhong W, Shi W, Sun S. Spectrum of fungal keratitis in north China. *Ophthalmology* 2006;113:1943–1948.
13. Ibrahim MM, Vanini R, Ibrahim FM, Fioriti LS, Furlan E, Provinzano L, et al. Epidemiologic aspects and clinical outcome of fungal keratitis in southeastern Brazil. *Eur J Ophthalmol* 2008;19:355–361.
14. Rautaraya B, Sharma S, Kar S, Das S, Sahu SK. Diagnosis and treatment outcome of mycotic keratitis at a tertiary eye care center in eastern India. *BMC Ophthalmol* 2011;11:39–46.
15. Lalitha P, Prajna NV, Kabra A, Mahadevan K, Srinivasan M. Risk factors for treatment outcome in fungal keratitis. *Ophthalmology* 2006;113:526–530.
16. Prajna NV, Krishnan T, Mascarenhas J, Rajaraman R, Prajna L, Srinivasan M, et al. The Mycotic Ulcer Treatment Trial: a randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:422–429.
17. Shapiro BL, Lalitha P, Loh AR, Fothergill AW, Prajna NV, Srinivasan M, et al. Susceptibility testing and clinical outcome in fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* 2010;94:384–385.
18. Lalitha P, Prajna NV, Oldenburg CE, Srinivasan M, Krishnan T, Mascarenhas J, et al. Organism, minimum inhibitory concentration, and outcome in a fungal corneal ulcer clinical trial. *Cornea* 2012;31:662–667.
19. Oechsler RA, Yamanaka TM, Bispo PJ, Sartori J, Yu MC, Melo AS, et al. Fusarium keratitis in Brazil: genotyping, in vitro susceptibilities, and clinical outcomes. *Clin Ophthalmol* 2013;7:1693–1701.
20. Clancy CJ, Victor LY, Morris AJ, Snyderman DR, Nguyen MH. Fluconazole MIC and the fluconazole dose/MIC ratio correlate with therapeutic response among patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3171–3177.
21. Pfaller M, Diekema D, Rex J, Espinel-Ingroff A, Johnson E, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006;44:819–826.
22. Thomas P, Abraham D, Kalavathy CM, Rajasekaran J. Oral itraconazole therapy for mycotic keratitis/orale itraconazol-therapie bei mykotischer keratitis. *Mycoses* 1988;31:271–279.
23. Ghannoum M. Susceptibility testing of fungi and correlation with clinical outcome. *J Chemother* 1997;9:19–24.

Résumé

Les kératites fongiques ou les kératomycoses sont des pathologies oculaires définies comme étant des infections cornéennes rares mais graves, potentiellement cécitantes ; affectant considérablement les populations marginalisées. Notre travail avait pour but d'évaluer les aspects cliniques des kératomycoses, étudier le diagnostic paraclinique pour un meilleur choix thérapeutique ainsi qu'identifier les facteurs prédisposants et par suit suivre leurs évolutions. En se basant sur les résultats de l'analyse d'article on a relevé la prédominance du genres *Aspergillus spp* suivis du *Fusarium spp* lors de la survenue des kératomycoses. La kératomycose est une pathologie dont les séquelles peuvent être évitées par le biais des stratégies qui devrez être multidimensionnelles.

Mots clés : La cornée, kératomycose, kératite fongique, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*.

Summary

Fungal keratitis or keratomycoses are ocular pathologies defined as rare but serious corneal infections, potentially blinding; affecting considerably marginalized populations. The aim of our work was to evaluate the clinical aspects of keratomycoses, to study the paraclinical diagnosis for a better therapeutic choice as well as to identify the predisposing factors and by following their evolutions. The results of the analysis of the article showed, the predominance of the genera *Aspergillus spp*. followed by *Fusarium spp* in the occurrence of keratomycosis was noted. Keratomycosis is a pathology whose sequelae can be avoided through strategies that should be multidimensional.

Key words: Cornea, keratomycosis, fungal keratitis, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*.

ملخص

التهاب القرنية الفطري هو من أمراض العين التي تُعرّف بأنها أحد التهابات القرنية النادرة والخطيرة، وقد تؤدي إلى العمى؛ تؤثر بشكل كبير على السكان المهمشين. يهدف عملنا إلى تقييم الجوانب السريرية لداء القرنية ودراسة التشخيص السريري من أجل اختيار أفضل استراتيجية علاجية وكذلك تحديد العوامل المسببة وبالتالي مراقبة تطوراتها. بناءً على نتائج تحليل المقالة لوحظ انه غالبية الحالات المصابة بالتهاب القرنية الفطري كان سببه *Aspergillus niger* ثم *Fusarium solani* بدرجة اقل. إنّ التهاب القرنية هو من الامراض التي يمكن تجنب عواقبها من خلال استراتيجيات والتي يجب أن تكون متعددة الأبعاد.

الكلمات المفتاحية: القرنية، فطار القرنية، التهاب القرنية الفطري، الرشاشيات النيجر، فيوزاريوم سولاني، المبيضات

البيضاء.