جامعة سيدي محمد بن عبد الله - فاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية الطب والصيدلة وطب الأسنان
FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET DE MÉDECINE DENTAIRE

PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE ET MYCOLOGIQUE DES KERATITES FONGIQUES ISOLEES AU LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE MYCOLOGIE DU CHU HASSAN II DE FES

MEMOIRE PRESENTE PAR :

Docteur Safaa RIFAI
Née le 24 septembre 1991 à Meknès

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE

OPTION : BIOLOGIE MÉDICALE

Sous la direction de :

Rapporteur: Professeur TLAMÇANI Zineb

Session Juillet 2022

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES 3
LISTE DES TABLEAUX 5
I. INTRODUCTION 6
II. MATERIEL ET METHODES 8
1. Type, durée et lieu d'étude 9
2. Recueil des données 9
3. Etude mycologique 9
III. RESULTATS 17
1. Répartition des patients selon le sexe 18
2. Répartition des patients en fonction de l'âge 19
3. Répartition des prélèvements selon leur nature 20
4. Répartition des patients selon, leurs antécédents 21
5. Répartition selon le résultat de l'examen direct 22
6. Répartition selon les résultats de la culture 23
7. Répartition des principaux champignons retrouvés 24
IV. DISCUSSION 25
1. Rappel anatomique sur la structure de l'œil 26
2. Rappel sur les champignons impliqués dans les kératites 28
3. Pathogénie, facteurs de risque 30
4. Diagnostic clinique 32
5. Microscopie confocale 33
6. Diagnostic mycologique 34
V. CONCLUSION 49
VI. RESUME 51
VII. BIBLIOGRAPHIE 56

LISTE DES FIGURES

Figure 1: figure montrant un abcès de cornée total, blanchâtre, extensif, avec suture de blépharoplastie. : CHU Hassan II, fès, service d'ophtalmologie 10

Figure 2 Examen direct au grossissement (×40) montrant des conidies ovales en grappes (A), et d'autres d'aspect obclavé (B et C) évoquant *Aternaria sp* (collection du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU Hassan II de FES) 11

Figure 3 : Examen direct: Aspect microscopique montrant des blastospores, grossissement X 40 (photo du service de Parasitologie Mycologie, Centre hospitalier Hassan II, Fès) 11

Figure 4: Culture sur milieu de Sabouraud simple dont l'aspect macroscopique évoque celui d'*Aspergillus flavus* (collection du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU HASSAN II de FES) 12

Figure 5: Aspect macroscopique des colonies levuriformes sur milieu Sabouraud chloramphénicol (image du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU HASSAN II de FES) 13

Figure 6: Aspect microscopique après coloration au bleu de lactophénol: têtes aspergillaires évoquant l'*Aspergillus flavus*. Objectif x40 (collection du laboratoire de parasitologie mycologie CHU Hassan II, Fès. 14

Figure 7:galerie d'identification biochimique AUXACOLOR ™ 15

Figure 8: Après 48 h d'incubation Fungitest ne montrant de résistance vis-à-vis à un antifongique 16

Figure 9: Répartition des patients selon le sexe 18

Figure 10: Répartition des patients par tranche d'âge 19

Figure 11: Répartition selon la nature du prélèvement 20
Figure 12: Répartition des patients selon leurs antécédents 21
Figure 13: Répartition des résultats de l'examen direct 22
Figure 14: Répartition selon les résultats de la culture 23
Figure 15: Répartition des principaux champignons retrouvés 24
Figure 16 : coupe sagittale de l'œil 27
Figure 17: Test de filamentation 37
Figure 18: Aspect des colonies sur milieu chromogénique évoquant un Candida non albicans(Candiselect) 39
Figure 19: Représentation schématique de la spectrométrie de masse MALDI TOF. 42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Trois groupes de champigons pouvant être à l'origine des kératomycoses 29

Tableau 2: Les différentes classes d'antifongiques..... 43

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La mycose oculaire est une infection fongique qui peut toucher spécifiquement la cornée (kératite) ou, plus rarement, affecter d'autres structures de l'œil : la conjonctive, les paupières, l'appareil lacrymal, la sclère et l'orbite (endophtalmie). L'incidence des kératites fongiques est de 1,8 % à 6,0 % (1).

Les champignons sont des organismes eucaryotes omniprésents que l'on trouve dans les plantes en décomposition, le sol et l'air. Les champignons en question sont souvent opportunistes et infectent les cornées pathologiques, mais peuvent aussi apparaître sur des cornées normales après un traumatisme, le plus souvent par une plante (2) (3).

Les genres *Candida*, *Aspergillus* et *Fusarium* restent les pathogènes les plus fréquemment isolés dans le monde (4) (5).

Les facteurs de risque identifiés sont : l'immunosuppression, la corticothérapie intempestive, l'antibiothérapie intraveineuse, la septicémie, la transplantation et la toxicomanie intraveineuse (6).

En raison de ses manifestations non spécifiques, les patients sont souvent mal diagnostiqués, voire traités par des corticoïdes qui aggravent la situation et entraînent de graves complications. Le pronostic fonctionnel final de ces infections est conditionné par le terrain du patient, la virulence des champignons et le retard diagnostique et thérapeutique (4).

Le but de notre étude est d'analyser les caractéristiques épidémiologiques et mycologiques des kératites fongiques diagnostiquées dans le laboratoire de parasitologie du CHU Hassan II de Fès.

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES :

1. Type, durée et lieu d'étude :

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur les cas de kératite fongique recueillis sur une période de 5 ans allant de janvier 2017à décembre 2021 analysés dans le laboratoire de parasitologie -mycologie du Centre Hospitalier Universitaire HASSAN II de Fès.

2. Recueil des données :

Les données ont été recueillies à partir des dossiers médicaux des patients atteints de kératite admis au service d'ophtalmologie du CHU Hassan II. Les informations ont été reportées sur un fichier Excel Microsoft Office® 2007 regroupant les paramètres suivants : le sexe, l'âge, le service, la localisation de l'atteinte, les résultats de l'examen direct et de la culture.

3. Etude mycologique :

A. Interrogatoire et examen clinique

Le diagnostic de kératomycose est basé sur la clinique (histoire de la maladie, contexte du traumatisme, symptômes, l'examen clinique montrant la présence d'un abcès cornéen d'aspect fongique ou de lésions satellites évocatrices) et microbiologique (isolation et identification d'un champignon par examen direct et/ou culture). La non-amélioration sous un traitement antibiotique, puis amélioration avec un traitement antimycosique également oriente vers l'origine mycosique.

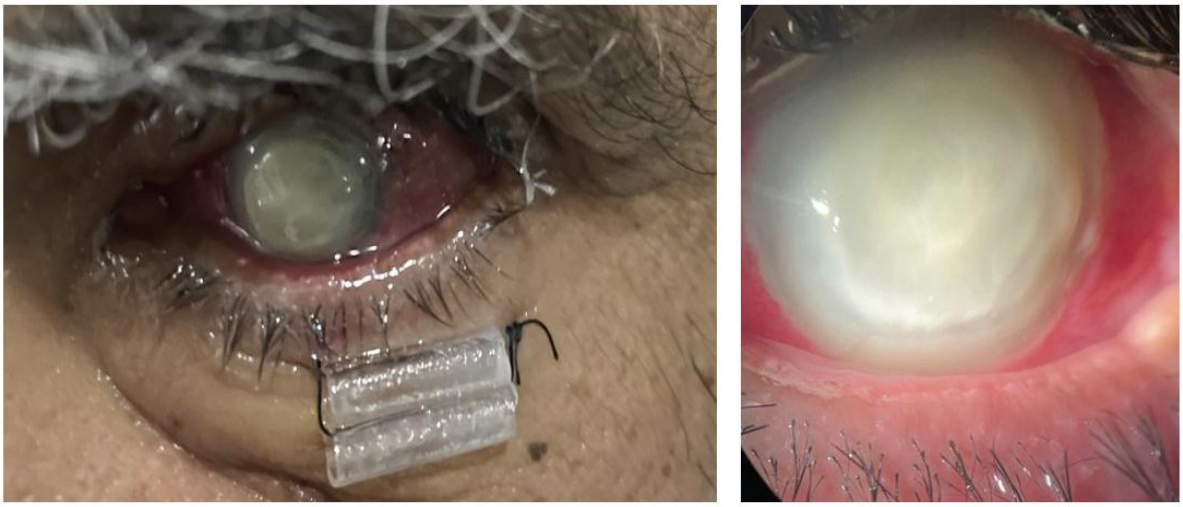

Figure 1: figure montrant un abcès de cornée total, blanchâtre, extensif, avec suture de blépharoplastie : CHU Hassan II, Fès, service d'ophtalmologie

B. Prélèvement :

Le prélèvement est une étape essentielle, qui conditionne la réussite de l'examen mycologique.

Les prélèvements mycologiques retenus étaient des raclages et des biopsies cornéennes, émanant du service d'ophtalmologie du CHU HASSAN II de Fès, les simples frottis conjonctivaux n'étaient pas pris en compte.

C. Examen direct :

Il s'effectue à partir du prélèvement lui-même ou après addition d'eau physiologique à l'écouvillon qu'on vortexe préalablement. L'échantillon sera examiné entre lame et lamelle, au microscope optique, au faible et au fort grossissement X (100 et 400). Il est considéré positif en cas de mise en évidence de filaments évocateurs de champignons filamenteux ou de blastopores et/ou de pseudofilaments évocateurs de levures.

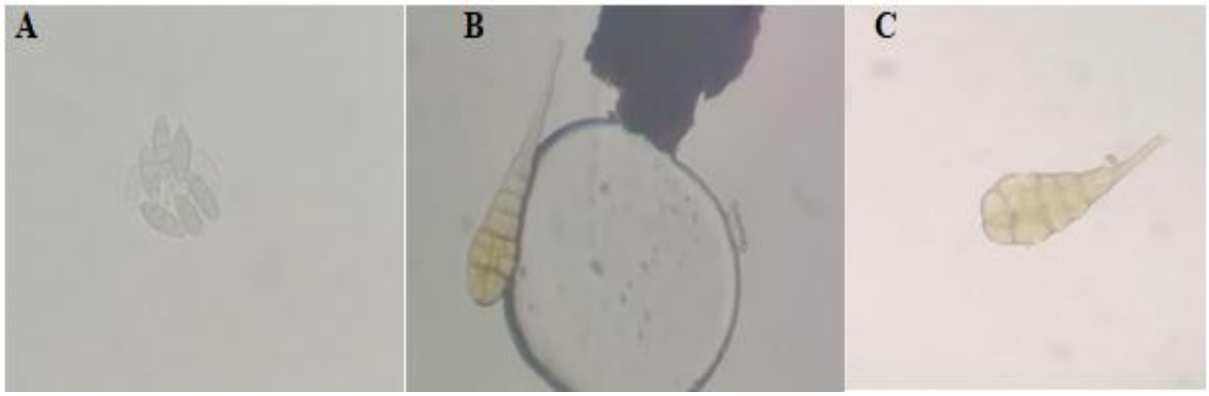

Figure 2 : Examen direct au grossissement (×400) montrant des conidies ovales en grappes (A), et d'autres d'aspect obclavé (B et C) évoquant *Aternaria sp* (collection du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU Hassan II de FES)

Figure 3 : Examen direct: Aspect microscopique montrant des blastospores, grossissement X 400 (photo du laboratoire de Parasitologie Mycologie, Centre hospitalier Hassan II, Fès)

D. Culture :

Elle augmente la sensibilité de l'examen direct et précise le genre et l'espèce du champignon. La mise en culture systématique de l'échantillon dans trois milieux d'isolement: Sabouraud simple, Sabouraud-Chloramphénicol(SC) et Sabouraud-Actidione-Chloramphénicol (SCA) avec incubation des échantillons à l'étuve à 27 °C et à 37 °C pendant au moins un mois avec une lecture quotidienne. Un résultat n'est considéré négatif qu'après une incubation d'un mois.

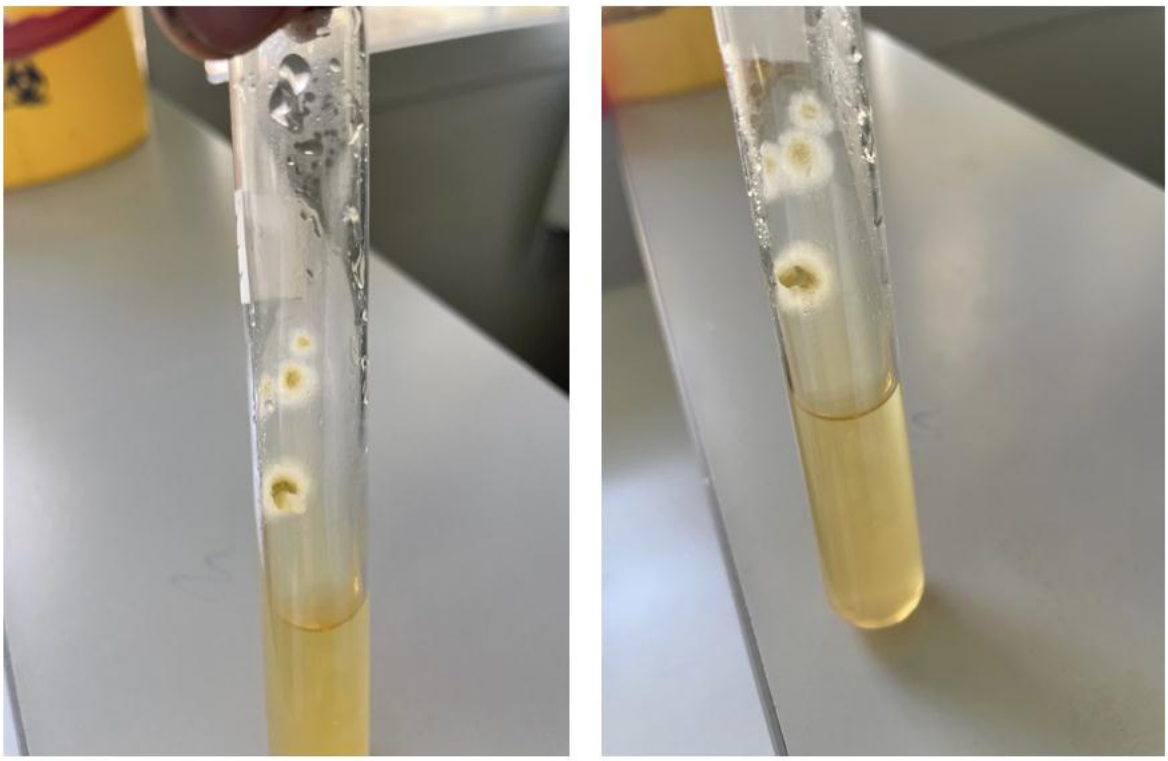

Figure 4: Culture sur milieu de Sabouraud simple dont l'aspect macroscopique évoque un *Aspergillus flavus*

(collection du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU HASSAN II de FES)

Figure 5: Aspect macroscopique des colonies levuriformes sur milieu Sabouraud chloramphénicol

(image du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU HASSAN II de FES)

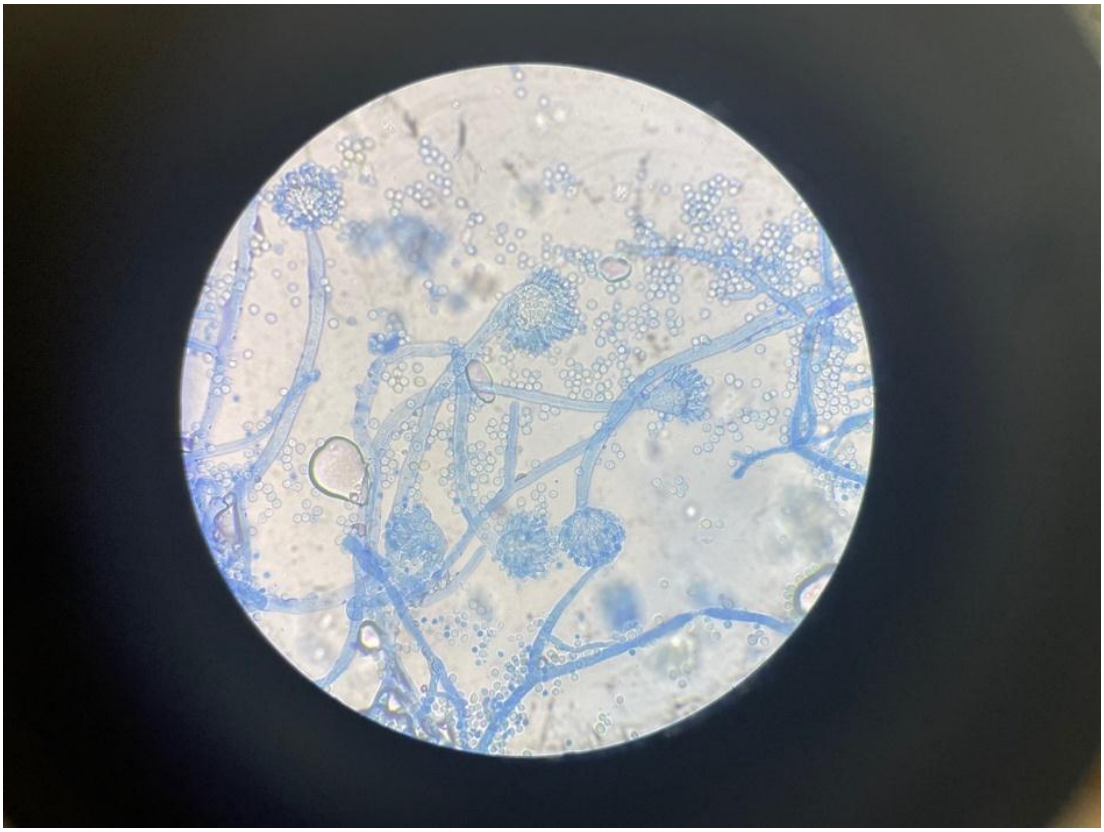

Figure 6: Aspect microscopique après coloration au bleu de lactophénol: têtes aspergillaires évoquant l'*Aspergillus flavus*. Objectif x40

(collection du laboratoire de parasitologie mycologie CHU Hassan II, Fès.

E. L'identification

Un échantillon est considéré comme positif lorsqu'un champignon est détecté à l'examen direct ou en culture ou les deux. L'isolement et l'identification des éléments fongiques ont été basés sur leur vitesse de croissance, sur des critères morphologiques (examen macroscopique et microscopique), des critères phénotypiques (test de filamentation), des critères biochimiques (galeries d'identification utilisant l'assimilation des sucres comme principe) et des critères immunologiques (tests d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux).

Figure 7:galerie d'identification biochimique AUXACOLOR ™

F. L'antifongigramme :

L'étude de la sensibilité aux antifongiques a été réalisée in vitro. Cinq antifongiques ont été testés par l'antifongigramme (Fungitest ™): l'amphotéricine B, l'itraconazole, le 5 fluorocytosine, le miconazole et le kétoconazole.

Figure 8: Après 48 h d'incubation Fungitest ne montrant pas de résistance vis-à-vis à un antifongique

RESULTATS

III. Résultats :

1. Répartition des patients selon le sexe

Pendant la période d'étude, nous avons reçu 620 échantillons oculaires ; 14 étaient en faveur de mycoses oculaires. Les prélèvements positifs concernaient 9 hommes (64,29%) et 5 femmes (35,71%), avec un sex-ratio F/H de 0,55.

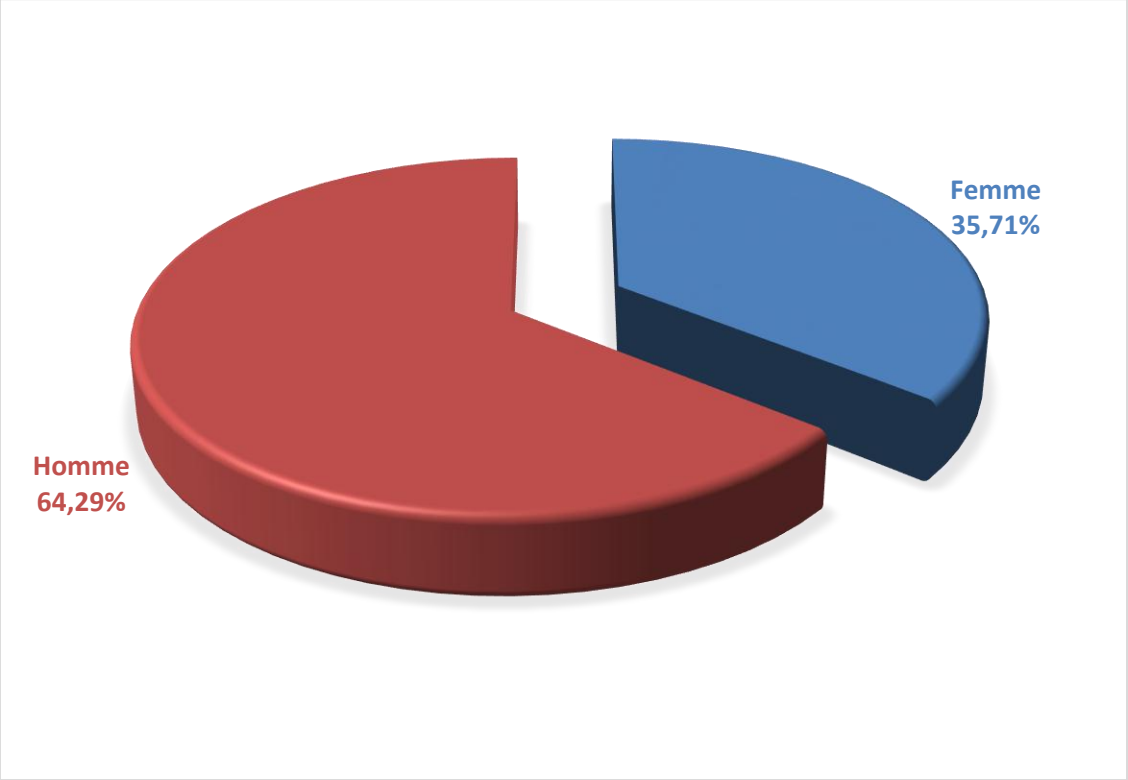

Figure 9: Répartition des patients selon le sexe

2. Répartition des patients en fonction de l'âge

L'âge moyen de nos patients était de 57, 35 ans avec des extrêmes allant de 22 à 77ans. Les sujets d'âge entre 60 et 70 ans étaient les plus représentés avec un taux de 43%.

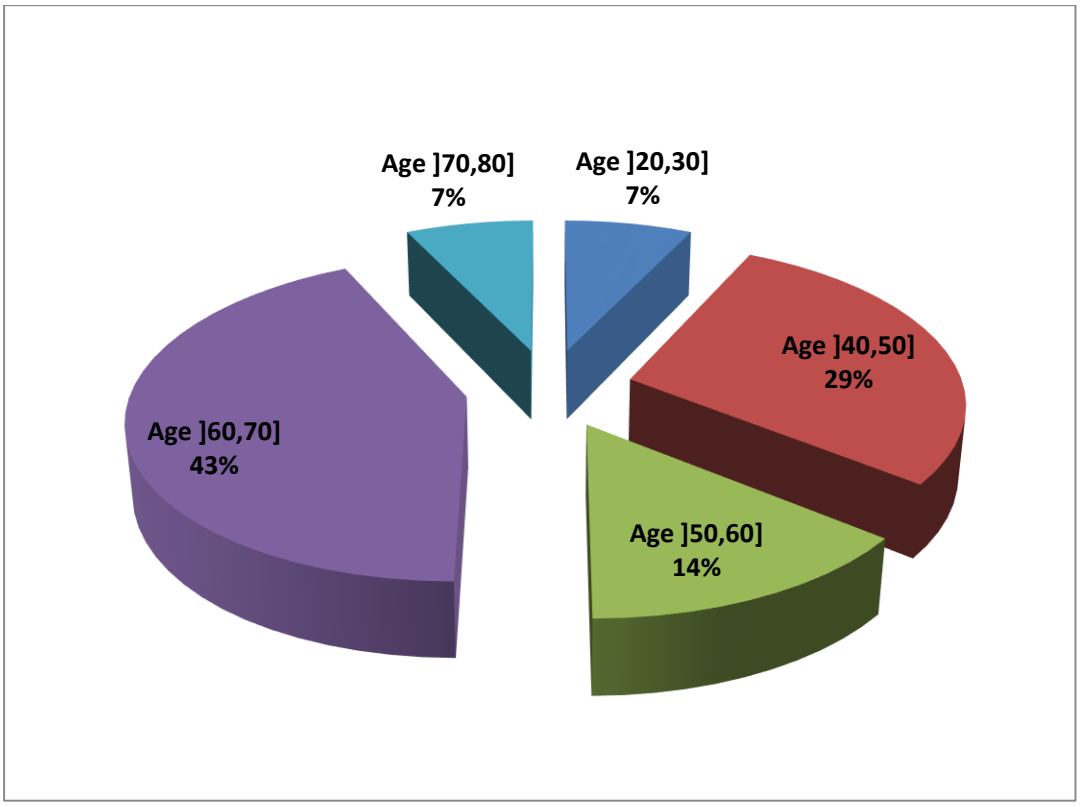

Figure 10: Répartition des patients par tranche d'âge

3. Répartition des prélèvements selon leur nature :

Les prélèvements de cornée étaient majoritaires avec un taux de 72%.

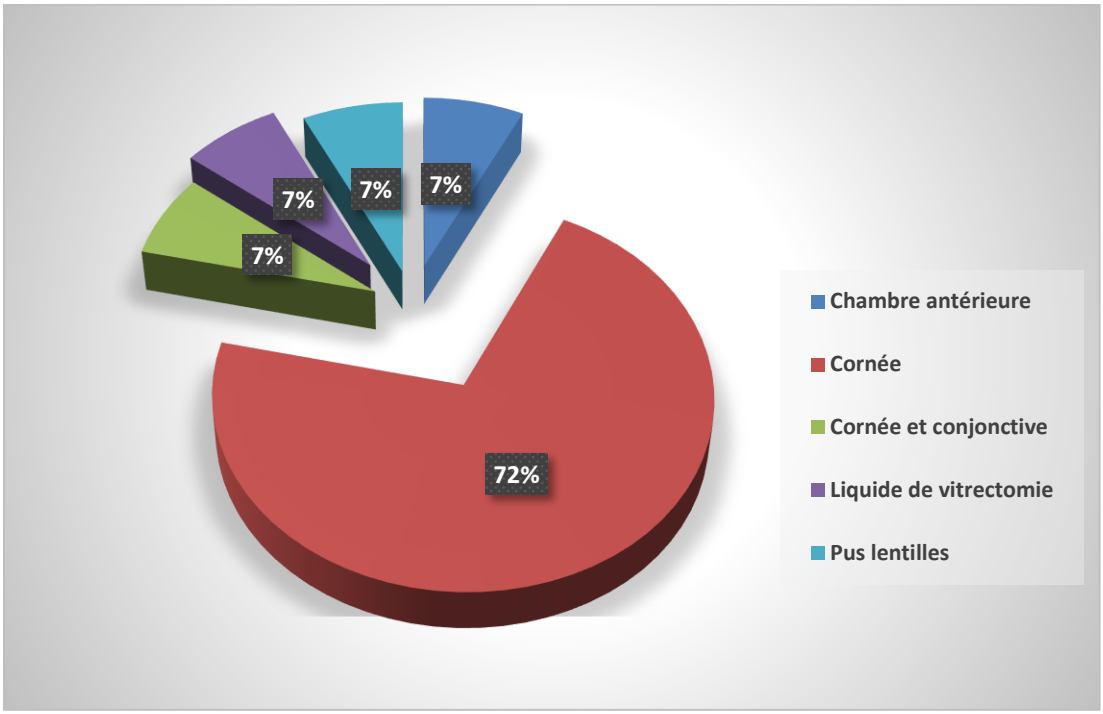

Figure 11: Répartition selon la nature du prélèvement

4. Répartition des patients selon, leurs antécédents

Dans notre étude le traumatisme oculaire est le facteur de risque le plus prédisposant aux kératites fongiques, suivi de l'usage des corticoïdes et la notion d'entropion éversante qui ont un taux identique de 14,3%.

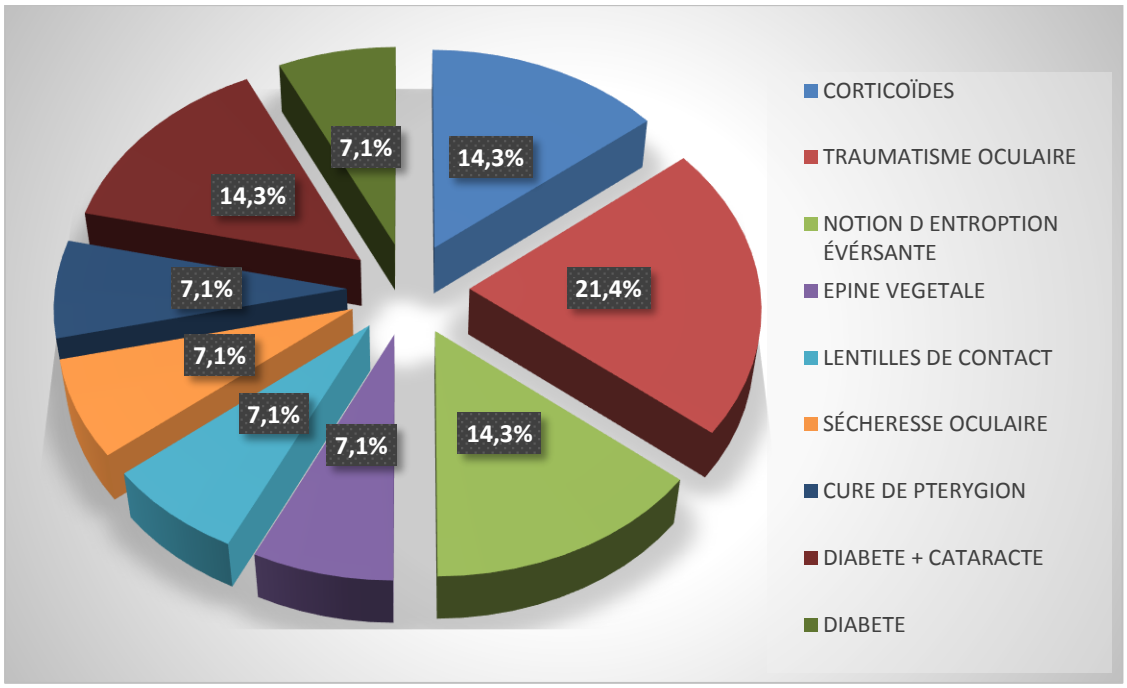

Figure 12: Répartition des patients selon leurs antécédents

5. Répartition selon le résultat de l'examen direct :

Sur les 14 prélèvements positifs, seulement deux avaient un examen direct positif.

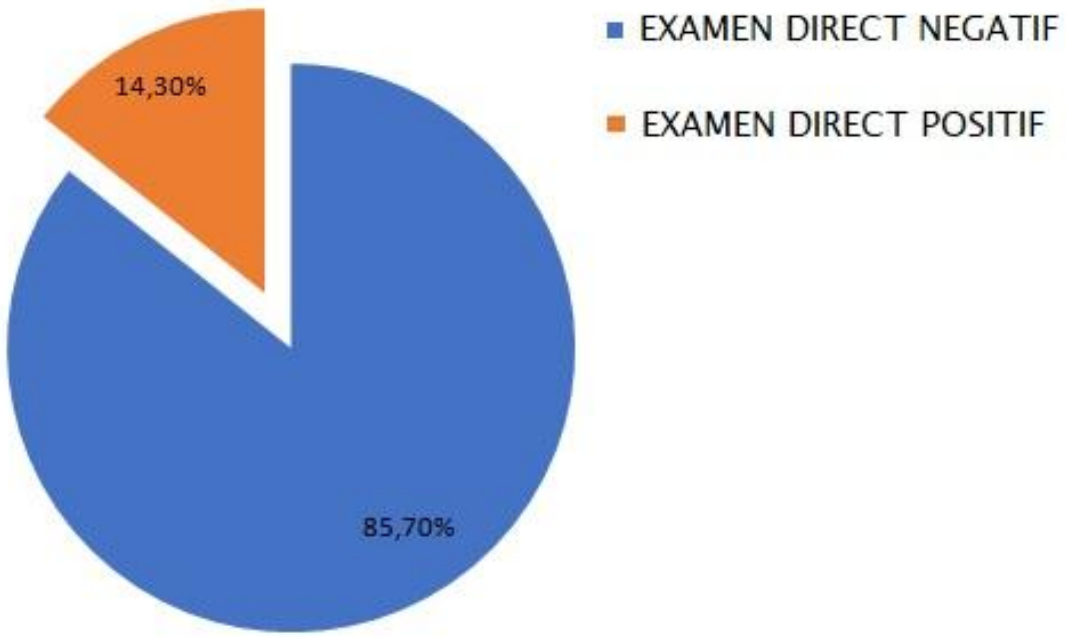

Figure 13: Répartition des résultats de l'examen direct

6. Répartition selon les résultats de la culture :

Dans notre étude, les champignons levuriformes étaient le plus incriminés par rapport aux champignons filamenteux avec un taux de 71,4%.

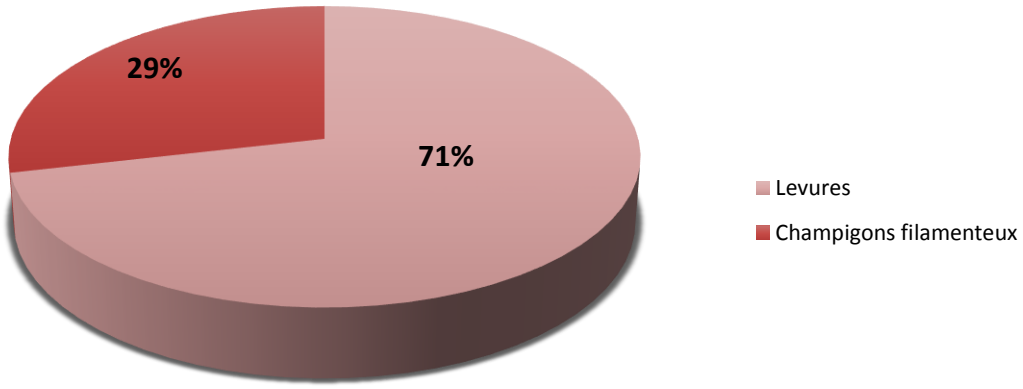

Figure 14: Répartition selon les résultats de la culture

7. Répartition des principaux champignons retrouvés

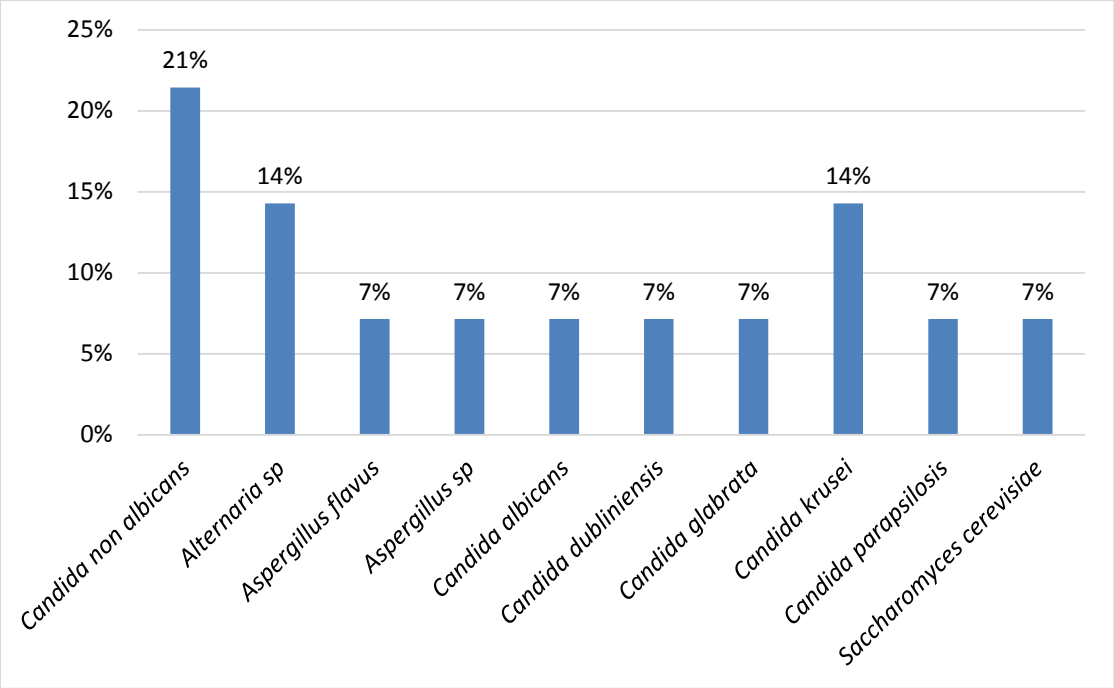

Figure 15: Répartition des principaux champignons retrouvés

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

1. Rappel anatomique sur la structure de l'œil (7):

L'œil est composé de plusieurs structures. On le divise en deux segments : le segment antérieur et le segment postérieur.

Le segment antérieur est l'espace entre la cornée et la face postérieure du cristallin. D'avant en arrière, on retrouve la cornée, la chambre antérieure avec l'humeur aqueuse, l'iris et le cristallin.

Le segment postérieur est l'espace situé en arrière du cristallin. D'avant en arrière, on distingue la cavité vitréenne avec l'humeur vitrée, la rétine, la choroïde et la sclère.

La cornée correspond à la partie antérieure transparente du globe oculaire. Elle est enchâssée dans une ouverture de la sclérotique. C'est le premier élément réfractif de l'œil comptant pour les ⅔ du dioptre oculaire, le cristallin constitue le 1⁄3 restant. Elle mesure environ 530 microns d'épaisseur. La principale caractéristique de la cornée est l'absence de vascularisation. Elle se nourrit à partir du limbe, du film lacrymal et de l'humeur aqueuse.

Elle est constituée de cinq couches :

- L'épithélium cornéen de surface : en contact avec le film lacrymal, il est constitué de trois assises cellulaires que sont la couche basale, la couche intermédiaire et la couche superficielle.
- La membrane de Bowman : couche acellulaire, située entre l'épithélium cornéen et le stroma.
- Le stroma représente 90% de l'épaisseur cornéenne. Il est constitué d'une substance fondamentale, de fibres de collagène, de kératocytes et de fibrocytes.

- La membrane de Descemet : membrane basale transparente, amorphe et élastique. Elle est située entre le stroma et l'endothélium cornéen.
- L'endothélium : monocouche de cellules arégénératives, en contact avec l'humeur aqueuse. Sa principale fonction est de maintenir un état d'hydratation constant du stroma cornéen compatible avec le rôle physiologique de la cornée : la transmission de la lumière.

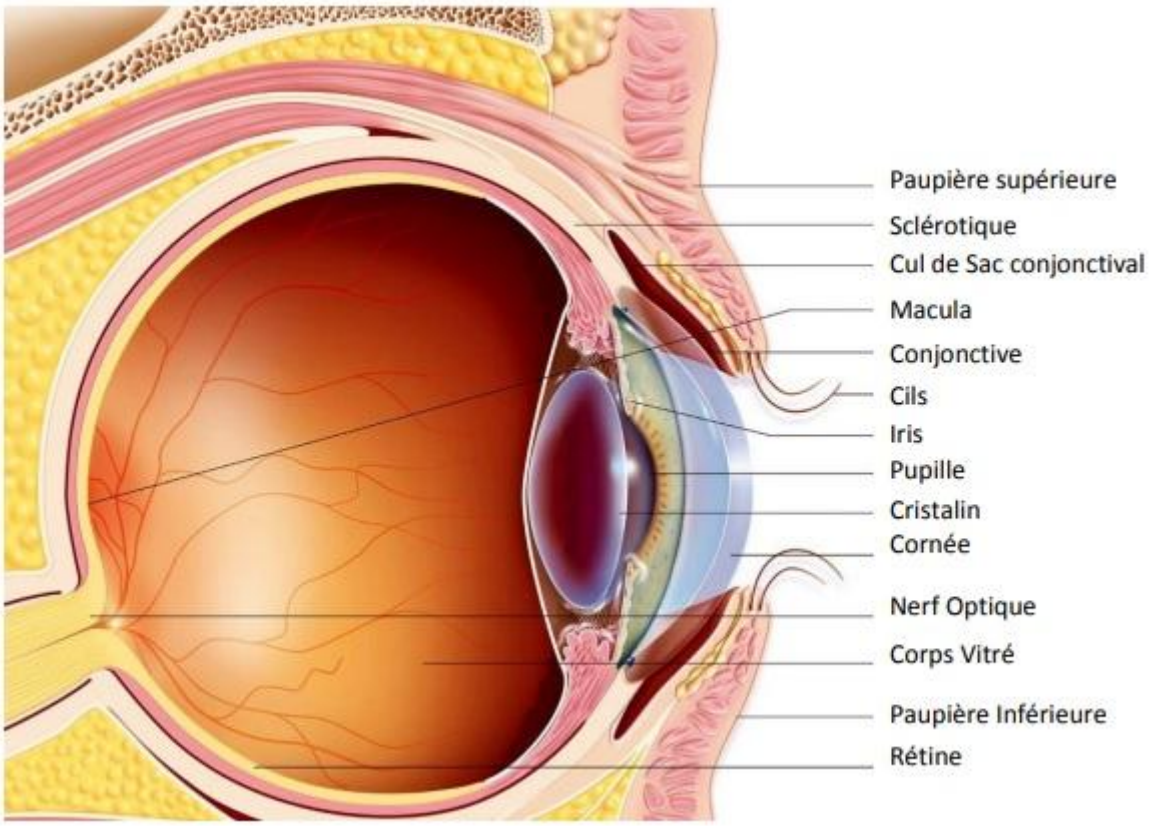

Figure 16 : coupe sagittale de l'œil **(8)**

2. Rappel sur les champignons impliqués dans les kératites (9)

Les champignons peuvent être classés en champignons filamenteux et en levures (Tableau 1). Les champignons filamenteux sont des organismes multicellulaires tandis que les levures sont unicellulaires. Un troisième groupe constitué par les champignons dimorphiques (comportant à la fois une phase filamenteuse et une phase de levure) est responsable de mycoses profondes mais rarement de kératites. Plus de 70 espèces de champignons filamenteux et de levures ont été identifiées dans le cadre de kératites fongiques (10). Les champignons filamenteux impliqués sont ubiquitaires dans l'environnement en étant présents sur les plantes, dans la terre et dans l'air (spores). Les levures sont elles aussi largement répandues dans l'environnement (sol, objets, nourriture). *Candida albicans* est un saprophyte du tube digestif, de la sphère urogénitale et de la peau. En outre, certains champignons peuvent être isolés dans la flore normale des paupières et de la conjonctive, tout particulièrement chez des personnes travaillant en extérieur dans des conditions de forte chaleur et d'humidité importante.

Les infections dues à des champignons filamenteux surviennent essentiellement sous des climats tropicaux : sud des États-Unis, Amérique centrale, Amérique du Sud, Afrique, Moyen-Orient, Chine, Inde (où les kératomycoses représentent 40 à 80 % des kératites infectieuses), Asie du Sud-est. Les champignons filamenteux pigmentés *(Dematiaceae)* sont plus rares que les non pigmentés *(Monilaceae)*.

Tableau 1: Trois groupes de champigons pouvant être à l'origine des kératomycoses

*Champignons les plus fréquemment isolés et rapportés dans la littérature

Champignons filamenteux		Levures	Champignons dimorphiques
Non pigmentés	*Pigmentés*		
*Fusarium**	*Curvularia*	*Candida**	*Blastomyces*
*Aspergillus**	*Alternaria*	*Cryptococcus*	*Coccidioïdes*
Acremonium	*Phialophora*		*Histoplasma*
Paecilomyces	*Bipolaris*		*Sporothrix*
Penicillium	*Exserohilum*		
Pseudallescheria	*Cladosporium*		
Scedosporium	*Lasiodiplodia*		
Beauveria			

Les kératomycoses liées à des levures sont, dans la très grande majorité des cas, dues à des *Candida* ou des *Cryptococcus*. L'immunodépression locale ou générale constitue le principal facteur de risque. Il n'existe que peu d'influence des facteurs environnementaux. *Candida albicans* est le plus fréquemment en cause mais d'autres espèces *(C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. krusei)* ont été identifiées au niveau de la cornée. Les levures représentent environ 50 à 60 % des kératomycoses observées dans les pays à climat tempéré (Europe, nord des États-Unis) (11) (12) (13).

3. Pathogénie, facteurs de risque :

Bien que l'œil soit continuellement exposé à ces micro-organismes, la surface oculaire constitue normalement une protection efficace. La survenue d'une infection mycosique implique l'altération d'un ou de plusieurs systèmes de défense anti-infectieux de la cornée (barrière épithéliale, film lacrymal, clignement palpébral). La réaction inflammatoire créée par l'infection dépend de la réplication des champignons, des mycotoxines, des enzymes protéolytiques sécrétées et des antigènes fongiques. La réponse de l'hôte s'accompagne généralement du relarguage de cytokines telles que MIP-2, KC, IL-1β, IL-6, Dectin-1, TLR-2, TLR-4, TLR-9 et *NOD-like receptor protein*, IL-8, IL-17, TNF-α par les cellules inflammatoires (14) (15). Les champignons peuvent pénétrer les lamelles stromales, attaquer la membrane de Descemet, diffuser en chambre antérieure et provoquer une endophtalmie. La formation d'un biofilm est un important facteur de pathogénicité notamment pour le *Fusarium* (16).

Les corticoïdes et autres agents immunosuppresseurs facilitent le développement des infections mycosiques en inhibant la transcription des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. Ils diminuent également l'activité anti-infectieuse des macrophages ainsi que la capacité d'adhésion des polynucléaires neutrophiles (17).

Les kératomycoses à champignon filamenteux surviennent fréquemment après un traumatisme cornéen végétal (ou tellurique) concernant une cornée saine. Il peut s'agir d'une plante d'intérieur ou d'extérieur ou d'autres types de végétaux (branches d'arbres, légumes, fruits). Certaines professions comportant des activités extérieures (fermier, agriculteur, pépiniériste) sont donc plus particulièrement concernées, ce qui explique la prépondérance masculine des infections à champignons filamenteux (18). Il existe également des variations saisonnières, les cas étant plus fréquents au printemps et à l'automne, au moment des récoltes.

Les *Candida* et autres levures sont des champignons opportunistes qui infectent les surfaces oculaires déjà compromises (immunodépression localisée) par des kératoconjonctivites, atopiques ou sèches, des herpès stromaux (souvent traités par corticoïdes), des pemphigoïdes, des kératites neurotrophiques, des kératites d'exposition.

Des kératites fongiques peuvent occasionnellement se déclarer chez des porteurs de lentilles de contact, notamment avec des lentilles cosmétiques ou d'aphake, pour les champignons filamenteux, lentilles pansement pour les levures. Entre 2004 et 2006, une importante épidémie mondiale de kératites à *Fusarium* a été reliée au produit d'entretien pour lentilles, (19) (20). Aucun moyen de nettoyage des lentilles ne protège totalement de la contamination fongique des lentilles et du boîtier.

Des cas de kératites fongiques ont été rapportés après chirurgie cornéenne (principalement greffe de cornée mais aussi Lasik, kératotomies, anneaux, *crosslinking*) ou chirurgie de la cataracte (21).

Certaines causes d'immunodépression systémique peuvent être associées aux kératomycoses : infections à VIH, hémopathies, cancers, endocrinopathies, lupus, déficits en IgA.

4. Diagnostic clinique :

L'interrogatoire précise le mode d'apparition de la kératite. Le début est généralement insidieux lorsqu'il s'agit de cornées pathologiques. Les premiers signes se manifestent quelques heures ou jours après le traumatisme ou le port infestant de lentilles de contact, mais peuvent parfois apparaître plus tardivement. La cinétique de l'infection dépend de la virulence du champignon, de la taille de l'inoculum et des résistances de l'hôte. Des facteurs de risque sont généralement relevés : traumatisme cornéen, pathologie chronique ou chirurgie de surface oculaire, port de lentilles de contact, immunodépression systémique, utilisation de corticoïdes. Les traitements déjà administrés au patient seront notés.

Les signes fonctionnels désignent une atteinte cornéenne (douleur, larmoiement, photophobie, blépharospasme) mais sont aspécifiques. La baisse d'acuité visuelle est variable.

L'examen biomicroscopique révèle des signes d'inflammation non spécifiques (hyperhémie conjonctivale, cercle périkératique) et parfois la présence de sécrétions conjonctivales. Au niveau de l'épithélium cornéen, la surface est typiquement «grise», «sale», «rugueuse» et comporte quelques infiltrats. Elle peut également être intacte, surélevée ou occasionnellement ulcérée avec des bords soulevés en regard de l'infiltrat inflammatoire stromal. Ces ulcérations, initialement récurrentes, deviennent permanentes au stade tardif de l'infection. Au niveau du stroma cornéen, il existe un infiltrat à bords irréguliers comportant peu ou pas d'inflammation, ce qui permet parfois de visualiser au fort grossissement les bords des champignons filamenteux et explique l'aspect «duveteux» des bords de l'infiltrat. Des micro-abcès ou lésions satellites peuvent être disséminés dans toute la cornée. Des dépôts de pigments sur le fond d'un ulcère sont parfois observés en cas d'infection par champignons

filamenteux pigmentés. L'infection peut prendre l'aspect d'une kératopathie microcristalline *(Candida)*. Un anneau immunitaire de Wessely peut être observé autour de l'infiltrat central. Au niveau de l'endothélium cornéen et en chambre antérieure, l'atteinte est variable: effet Tyndall, hypopion, fibrine, plaque endothéliale, plis de Descemet.

L'évolution des kératomycoses est en général plus lente que celle des kératites bactériennes. Toutefois, les infections à champignons filamenteux *(Aspergillus, Fusarium)* peuvent évoluer de façon très rapide vers la perforation cornéenne et l'endophtalmie, notamment lorsque des corticoïdes ont été prescrits. À l'inverse, les levures causent souvent de petites ulcérations ovales blanc-jaune superficielles associées à un œdème stromal ressemblant à un abcès à bactérie à Gram positif. Cependant, des infections suppuratives très graves peuvent également se développer lors d'infections à levures.

Les complications évolutives des kératomycoses sont nombreuses à type de fonte stromale, descemétocèle, ectasie ou perforation cornéenne, sclérite, endophtalmie, fonte purulente du globe, cellulite orbitaire.

5. Microscopie confocale :

La microscopie confocale in vivo permet parfois de détecter précocement les kératomycoses en visualisant au sein de la cornée des structures linéaires avec embranchements (filamenteux) ou des points ronds hyperréflectifs (levures). Cet examen permet de différencier les champignons des autres micro-organismes (amibes notamment) et de suivre l'efficacité des traitements antimycotiques (22) (23) .

6. Diagnostic mycologique :

Il apporte le diagnostic de certitude devant toute suspicion clinique de kératomycose compte tenu des implications pronostiques et thérapeutiques.

A. Prélèvement :

Il repose sur un grattage cornéen profond, réalisé à la lampe à fente au niveau de la base et des berges de l'infiltrat cornéen, si possible avant tout traitement anti-infectieux, et après rinçage de la surface oculaire au NaCl 0,9 % stérile. Le prélèvement est acheminé au laboratoire pour étude mycologique.

B. Examen direct :

Il est obligatoire et indispensable, réalisé immédiatement après le prélèvement, confirme l'origine mycosique de la lésion clinique. Son résultat peut être transmis aux cliniciens en quelques heures. Il peut s'effectuer: à l'état frais, après préparation ou après coloration.

Les différents colorants utilisés:

- **Le lugol 2%** : pour tous les prélèvements, il colore les levures et les filaments mycéliens en brun.
- **Le noir chlorazol** : colore électivement les éléments fongiques en noir et supprime les artefacts.
- **Le bleu lactophénol ou bleu coton** : colore les éléments fongiques en bleu.
- **Un réactif contenant un fluorochrome** (BLANC DE CALCOFLUOR..) : visualisation facile des éléments fongiques au microscope à fluorescence.

L'échantillon sera examiné entre lame et lamelle, au microscope optique, au faible et fort grossissement X (100 et 400). Il est considéré positif en cas de mise en évidence de filaments évocateurs de champignons filamenteux ou de blastopores et/ou de pseudofilaments évocateurs de levures. Un examen direct négatif n'exclut pas le diagnostic de mycose.

C. Culture :

Elle augmente la sensibilité de l'examen direct et précise le genre et l'espèce du champignon.

❖ **Milieux d'isolement:**

- le milieu Sabouraud simple : milieu universel, convient pratiquement à tous les champignons responsables de mycoses.
- Le milieu Sabouraud + ATB (chloramphénicol et/ ou gentamycine) : est utilisé pour inhiber la pousse des bactéries qui gênent l'isolement et l'identification.
- Le milieu Sabouraud –chloramphénicol –actidione : l'actidione ou cycloheximide est un inhibiteur des moisissures saprophytes.

❖ **Ensemencement et incubation :**

- Il se fait à l'aide d'une oëse stérile ou d'une spatule.
- Le milieu de culture se présente sous forme de géloses coulées en boîte de Pétri ou en tubes.
- Le produit pathologique est déposé en appuyant légèrement, en plusieurs endroits distincts de la surface de la gélose.
- Pour le prélèvement des muqueuses: il faut frotter fortement l'écouvillon en le roulant sur toute la surface de milieu de la culture
- Si ensemencement en tubes→ ne pas visser complètement les bouchons.
- Incubation dans l'étuve : 25-30 °C (prélèvements superficiels), 37°C (prélèvements profonds).

D. Identification et interprétation :

- La lecture des résultats de la culture s'effectue dès 48h puis 3 fois par semaine jusqu'à 4 à 6 semaines au total.

- L'identification des colonies obtenues repose sur les 3 critères suivants :

- Le temps de croissance
- Aspect macroscopique des colonies
- Aspect microscopique des colonies.

1) Identification des levures :

✓ Identification du genre *Candida* :

- Examen macroscopique:
  - Couleur : blanche à crème
  - Consistance : crémeuse et lisse
  - Aspect : brillant
  - Relief : colonies bombées
- Examen microscopique :
  - Présence des levures ovoïdes
  - Bourgeonnement multilatéral
  - Présence de vrai et/ou pseudo-filamentation
- La durée de pousse : 24 à 48 heures

2) Identification de l'espèce:

Repose sur des critères :

- Phénotypiques (tels que la production de filaments et des chlamydospores)
- Physiologiques tels que l'assimilation ou la fermentation de certains sucres à l'aide de galeries
- Immunologiques

a) Critères phénotypiques :

- Test de filamentation en sérum (test de blastèse):consiste à rechercher l'apparition de tubes germinatifs (*Candida albicans*) après 03à 04 h de mise en suspension d'un fragment de colonie dans du sérum humain ou animal à 37C°.

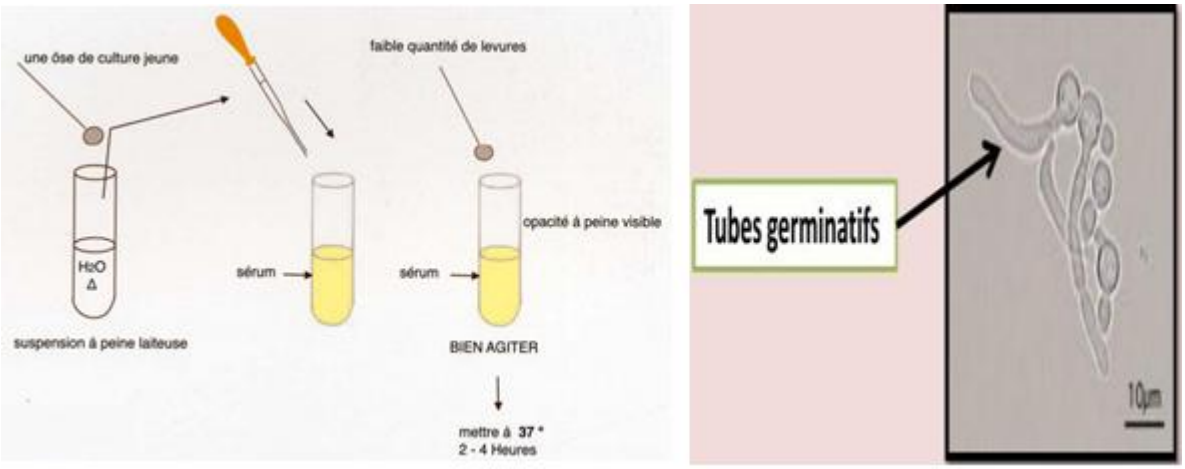

Figure 17: Test de filamentation

- Test de chlamydosporulation: il se fait par repiquage sur milieux spéciaux pauvre en sucre (Rice Agar Tween 80 (RAT) / Pomme de terre- Carotte-Bile (PCB)).

- Technique:
  - Couler le milieu en boite de Pétri
  - Déposer 02 gouttes d'une suspension de levure dans le milieu à l'aide d'une pipette stérile
  - Déposer dessus deux lamelles neuves
  - Recouvrir et mettre à l'étuve à 27°C pendant 24h -48h chlamydospores (*Candida albicans)*

b) Critères physiologiques:

- Différentes galeries d'identification sont commercialisées.
- But : mettre en évidence la capacité que possède une levure placée en aérobiose (assimilation) = par l'Auxanogramme ou en anaérobiose (fermentation) = par le Zymogramme.
- Exemples de galeries commercialisées:

- L'Auxacolor : utilise des réactions colorées pour mettre en évidence l'assimilation des sucres.
    - 13 sucres sont étudiés ainsi que la révélation de la phénoloxydase.
    - La lecture se fait en 24 à 48 heures
    - L'avantage de cette méthode est la facilité de la lecture et sa rapidité.

c) Critères immunologiques:

- Tests d'agglutinations sur particules de latex: est basé sur le principe de la coagglutination des blastospores de *Candida* avec des particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal, reconnaissant spécifiquement un antigène à la surface de cette levure.
    - exemple : bichrolatex albicans fumouze (mise en évidence de *Candida albicans*), krusei color fumouze mise en évidence du *Candida krusei*)

d) Autres méthodes d'identification :

- **Milieux chromogènes:** ou fluorogènes permettant à la fois l'isolement et l'identification des espèces de *Candida*. Ces milieux peuvent aussi identifier les associations qui sont non mises en évidence par les méthodes classiques.
- Exemple : Candida ID, CHROMagar Candida*

Figure 18: Aspect des colonies sur milieu chromogénique évoquant un *Candida non albicans* (Candiselect) (collection du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU HASSAN II de Fès)

3) Identification des champignons filamenteux :

- Examen macroscopique:
  - couleur: au recto et au verso
  - forme : rondes, étoilées…
  - relief : plates, plissées…
  - surface : duveteuse, poudreuse, granuleuse…
  - consistance : molle, élastique, cartonnée…
  - taille : réduite, ou au contraire étendue
  - présence d'un pigment diffusant dans la gélose
- Examen microscopique:
  - Un montage entre lame et lamelle sera réalisé dans du bleu de lactophénol à l'aide de cellophane adhésive transparente (ou scotch), ou par dissociation d'un fragment de colonies au vaccinostyle.
  - On étudiera:
    - L'aspect des filaments mycéliens : Ils sont cloisonnés, de diamètre régulier ou irrégulier.
    - La présence de chlamydospores intercalaires ou terminales.
    - L'abondance et la morphologie des microconidies.
    - La présence et la morphologie des macroconidies.
    - Aspect des têtes apergillaires : phialides, conidies, métule,conidiophores...
- Vitesse de pousse :
  - 48 à 72 heures en moyenne pour les moisissures

E. Autres techniques:

La spectrométrie de masse « Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight » est une technique couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol.

L'instrument est composé de trois éléments fonctionnels : une source d'ionisation, pour transférer les ions moléculaires de l'échantillon dans l'analyseur, un analyseur de masse, pour séparer les ions en fonction de leur ratio masse / charge (m/z) et un détecteur.

Pour l'analyse, les échantillons biologiques sont mélangés à une matrice qui va permettre la cristallisation de l'échantillon. La matrice est composée de petites molécules acides ayant une forte capacité d'absorption, pour transmettre l'énergie de la source d'ionisation aux molécules de l'échantillon. Lors de l'analyse, la matrice va absorber l'énergie du laser conduisant à la désorption des échantillons qui sont ainsi ionisés et propulsés dans l'analyseur TOF, un tube de métal sous vide, dans lequel les ions vont être séparés en fonction de leur ratio m/z, avant d'atteindre le détecteur.

Chaque pic du spectre de masse correspondra ainsi à un rapport m/z et la hauteur du pic sera proportionnelle au nombre d'ions de même m/z ayant atteint le détecteur. Après acquisition des spectres, l'identification consiste à comparer le spectre obtenu à une base de données spectrales, pour peu qu'une base de données suffisamment complète et robuste soit disponible.

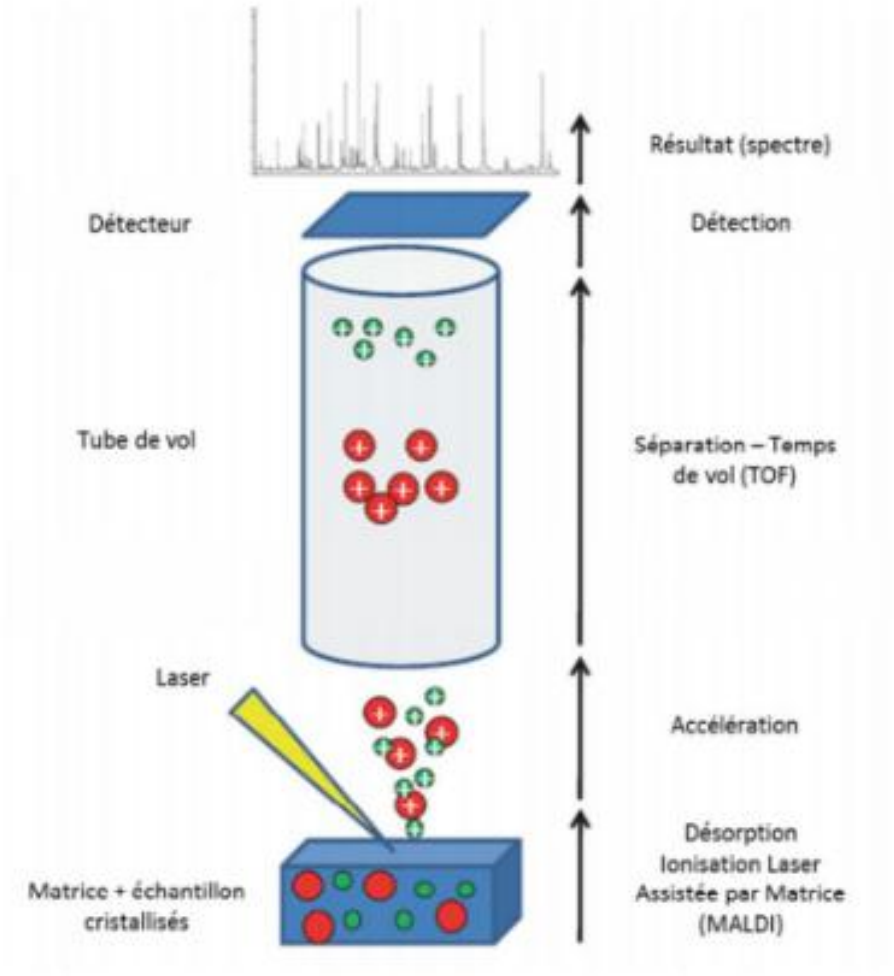

Figure 19: Représentation schématique de la spectrométrie de masse MALDI TOF

F. Traitement : (25)

La prise en charge d'un abcès de cornée débute par l'instauration d'un traitement anti- infectieux par voie topique dès les prélèvements effectués par collyres renforcés en milieu hospitalier. Il est adapté en suite à la gravité des lésions, à l'orientation clinique initiale et aux résultats de l'examen microbiologique direct puis aux cultures.

La non amélioration, l'aggravation de l'abcès, les données cliniques particulières et /ou microbiologistes évocatrices d'une kératomycose nécessite la mise en place d'un traitement médical spécifique.

Tableau 2: Les différentes classes d'antifongiques

Polyènes:	**Azolés :**	**Pyrimidines 5**	**Echinocandines :**
Natamycine et AmphotéricineB	Imidazolés : (Kétoconazole; Clotrimazole) Triazolés: (Itraconazole ; Voriconazole ; Fluconazole)	Fluorocytosine	Caspofungine 0,5%; Micafungine 0,1%

Les polyènes et azolés attaquent la membrane cellulaire (stérols), tandis que la5-fluorocytosine interfère avec la synthèse protéique.

Les échinocandines inhibent la synthèse de la paroi des champignons.

1. Le groupe des Polyènes

❖ L'amphotéricine B (Fungizone)

Elle a une activité anti-fongique in vitro à spectre large contre les levures (sauf Trichosporon) et variable sur les filaments : l'*Aspergillus* (sauf *A. terreus*) est régulièrement sensible, *Fusarium* et *Curvularia* ont une sensibilité inconstante.

❖ La Natamycine

La natamycine est active in vitro vis-à-vis des champignons filamenteux (*Aspergillus, Acremonium, Fusarium, Penicillium, Schi-zophyllum, Exserohilum*), ainsi que sur certaines levures. C'est le traitement de choix des kératites fongiques.

2. Le groupe des azolés

❖ Les imidazolés : Il comporte les imidazolés qui sont peu solubles, peu efficaces et relativement toxiques. Ils sont actuellement supplantés par les triazolés.

❖ Les triazolés

Ils sont moins toxiques, et dont le spectre est plus large. Ces derniers ont en outre une bonne biodisponibilité systémique et diffusent bien dans la cornée après administration orale, on distingue:

L'itraconazole: Sporanox, est efficace sur les champignons filamenteux;

Le fluconazole : Triflucan® est efficace contre les levures sauf *Candida krusei* et *Candida glabrata*.

L'itraconazole et le fluconazole sont disponibles sous forme de collyres.

Le voriconazole: Vfend®a un spectre étendu à *Aspergillus, Scedosporium, Fusarium et Alternaria*. Le *Candida krusei* y est habituellement sensible, mais des résistances croisées avec le fluconazole sont possibles pour toutes les espèces (25).

Le Posaconazole, un triazolé de nouvelle génération administré per os, semble être efficace contre les infections à *Fusarium* résistant, à dose de 800mg par jour, répartie en 4 prises.

3. Le groupe des Echinocandines :

La caspofungine est active sur les champignons pigmentés et les *Candida.*

G. Discussion des données épidémiologiques :

Sur une période de 5 ans, la moyenne des kératites fongiques est d'environ 2,8 cas/an. Ce chiffre peut paraître faible mais des études menées dans des régions au climat tempéré (comme la nôtre) ont trouvé des fréquences similaires, comme dans l'étude polonaise, où une moyenne de 3 cas/an a été rapportée (26).

Cette moyenne est également cohérente avec celle trouvée dans d'autres pays comme la France avec 2,4 cas/an, 3 cas/an aux Etats-Unis, et 1,74 cas/an en Tunisie (27) (28).

La kératite fongique est plus fréquente dans les régions chaudes et humides, où les champignons peuvent être impliqués dans plus de 50 % des ulcères de la cornée, mais son incidence a augmenté dans les zones tempérées par rapport aux années précédentes (29) (30) (31). Cette différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs tels que le climat, l'âge, le sexe et les conditions socio-économiques (32).

L'âge moyen dans notre étude était de 55,35 ans, avec des extrêmes allant de 22 à 77 ans. Ce qui est proche de l'étude de Katarzyna où l'âge moyen est de 51,5 ans, et plus élevé que d'autres études, avec 48,9 ans dans l'étude tunisienne de W. Zbiba (26) (33) (34).

Dans notre étude, le taux d'incidence est plus élevé chez les hommes que chez les femmes, ce qui est conforme à l'étude tunisienne de W. Zbiba (34). Cette prédominance masculine peut être due à une plus grande exposition aux blessures et aux accidents dans le champ que chez les femmes.

Les kératites dues à des champignons filamenteux ont généralement été diagnostiquées chez des patients plus jeunes (âge moyen de 47,7 ans) que les kératites dues à *Candida sp* (âge moyen de 57,7 ans) (26). Ceci est dû à la forte proportion de patients ayant des antécédents ophtalmologiques dont la pathologie prédisposante apparaît avec l'âge : les levures exercent leur pouvoir pathogène en présence d'un facteur prédisposant local (acte chirurgical, lésion cornéenne, corticothérapie locale) qui facilite leur multiplication, la colonisation de la lésion et des tissus adjacents (35) (36).

La complication redoutée est l'endophtalmie, voire la perforation. C'était le cas pour deux de nos patients, trois patients dans l'étude de S. Anane (28).

H. Discussion des données mycologiques

Le diagnostic définitif de la kératite fongique repose sur l'examen mycologique. Il consiste en un raclage cornéen profond des bords et du fond de l'ulcère avec une curette Desmare, immergée dans quelques gouttes d'eau physiologique stérile et rapidement transportée au laboratoire (37). Il doit être réalisé avant l'administration d'un antifongique ou d'un anesthésique local qui auront un effet inhibiteur sur la croissance des champignons (28).

La négativité de l'examen direct pourrait être expliquée par la difficulté du grattage qui se limite au stroma superficiel (38).En plus de la difficulté d'accéder au laboratoire en situation d'urgence. Ceci explique aussi la négativité des examens directs dans notre contexte, le laboratoire se situant dans un autre site et l'acheminement des prélèvements et leur étude étant souvent retardée.

Dans notre étude, les levures sont les champignons les plus fréquemment isolés (71,42 %), ce que l'on retrouve fréquemment dans les études des pays tempérés tels que le Danemark, la France et les États-Unis (27) (37) (39)

En revanche, dans les pays tropicaux comme l'Inde, la Chine et l'Australie, les champignons filamenteux, en particulier *Fusarium sp* représentent la principale cause de mycose oculaire (31) (37).

De même, Hon Shing Ong et al à Londres, Farell et al en Irlande et Walther et al en Angleterre ont indiqué que les champignons filamenteux (*Fusarium sp*) étaient le principal agent infectieux des kératites fongiques (31) (32) (35). Dans l'étude polonaise. *Fusarium sp* était souvent associé à un traumatisme oculaire et au port de lentilles de contact (26).

Les levures sont trouvées dans 71,4% des cornées pathologiques ou précédemment opérées. Ce résultat est en accord avec les résultats de Hon Shing et al dans une population britannique, Nielsen et al dans une population danoise et Farell et al dans une population irlandaise (31) (41) (32).Des champignons filamenteux ont été trouvés dans 62,5 % des cornées traumatisées (42).

Dans notre étude, *Candida albicans* a été isolé dans un cas (7,1%), un taux inférieur à celui trouvé dans l'étude tunisienne de S. Anane (31,6%) et dans d'autres études menées dans les pays tempérés (28).*Candida parapsilosis* est apparu chez un patient après le port d'une lentille de contact.

Aspergillus est le deuxième genre le plus fréquemment rencontré. Il reste l'agent fongique le plus fréquent et le plus virulent dans toutes les régions d'Arabie saoudite, en particulier *Aspergillus flavus* qui a le pire pronostic parmi les cas de kératite et d'endophtalmie (1) (43).*Aspergillus* peut tolérer des températures très chaudes. Les changements de saisons et les tempêtes de sable contribuent à la propagation de ses spores, ce qui explique pourquoi les cas liés à *Aspergillus* sont plus fréquents au printemps et en été (1).

CONCLUSION

V. CONCLUSION

La distribution épidémiologique des kératites fongiques est étroitement liée aux conditions géographiques et aux antécédents oculaires.

Elles restent une cause importante de morbidité visuelle, notamment dans les pays sous-développés. Les genres *Candida* et *Aspergillus* ont été les agents pathogènes les plus fréquemment isolés dans notre série.

L'intérêt de l'examen mycologique est essentiel pour le diagnostic précoce et la prise en charge adéquate de la kératite fongique.

RESUME

VI. RESUME :

Introduction :

Les kératites fongiques ou kératomycoses sont moins souvent impliquées dans les infections oculaires par rapport aux kératites bactériennes, mais leur pronostic reste plus réservé.

L'objectif de notre étude est d'analyser les caractéristiques épidémiologiques et mycologiques des kératites fongiques diagnostiquées dans le laboratoire de parasitologie mycologie du CHU Hassan II de Fès.

Matériels et méthodes :

Il s'agit d'une étude rétrospective menée au sein du laboratoire de parasitologie mycologie du CHU Hassan II de Fès sur une période de 5 ans allant de janvier 2017 à décembre 2021 portant sur tous les cas confirmés de kératites fongiques Les données ont été recueillies à partir des dossiers médicaux des patients atteints de kératite admis au service d'ophtalmologie du CHU Hassan II. Après la réalisation d'un examen direct à l'état frais, les prélèvements sont mis en culture sur trois milieux : Sabouraud simple, Sabouraud-Chloramphénicol (SC) et Sabouraud-Actidione-Chloramphénicol. L'identification des différentes espèces responsables de kératite fongique a été basée sur les critères morphologiques, phénotypiques, biochimiques et immunologiques.

Résultats :

Durant la période d'étude, 620 échantillons ont été reçus au laboratoire, 14 d'entre eux sont revenus positifs, soit une moyenne de 2,25%.

Les hommes étaient plus touchés que les femmes avec un taux de 64,29%, 43% des patients appartenaient à la tranche d'âge 60 à 70 ans.

Les genres fongiques incriminées étaient *Candida* au premier plan avec un taux de 64,28%, en deuxième lieu viennent *Aspergillus* et *Alternaria* avec un taux de 14,28% chacun. Un seul cas de kératite à *Sacharomcyes* a été enregistré.

Le traumatisme oculaire était la cause la plus prédisposante aux kératites fongiques, les anomalies oculaires et systémiques et l'application antérieure de corticostéroïdes étaient également des facteurs de risque importants.

Conclusion :

Les infections oculaires fongiques continuent d'être une cause importante de morbidité oculaire, en particulier dans les pays sous-développés. Une meilleure compréhension des facteurs de risque et des agents pathogènes impliqués dans ces infections, améliorera leur prise en charge et leur pronostic.

ABSTRACT:

Introduction:

Fungal keratitis or keratomycosis are less often involved in ocular infections compared to bacterial keratitis, but their prognosis remains more reserved.

The objective of our study is to analyze the epidemiological and mycological characteristics of fungal keratitis diagnosed in the laboratory of parasitology-mycology of the Hassan II University Hospital of Fez.

Material and methods:

This is a retrospective study conducted in the parasitology-mycology laboratory of the Hassan II University Hospital of Fez over a period of 5 years from January 2017 to December 2021 on all confirmed cases of fungal keratitis Data were collected from the medical records of patients with keratitis admitted to the ophthalmology department of Hassan II University Hospital. After direct examination in the fresh state, the samples were cultured on three media: Sabouraud simple, Sabouraud-Chloramphenicol (SC) and Sabouraud-Actidione-Chloramphenicol. The identification of the different species responsible for fungal keratitis was based on morphological, phenotypic, biochemical and immunological criteria.

Results:

During the study period, 620 specimens were received at the laboratory, 14 of which returned positive, an average of 2.25%.

Men were more affected than women with a rate of 64.29%, 43% of the patients belonged to the age group of 60 to 70 years.

The fungal genera involved were *Candida* in the first place with a rate of 64.28%, in second place came *Aspergillus* and *Alternaria* with a rate of 14.28% each. Only one case of *Sacharomcyes* keratitis was recorded.

Ocular trauma was the most predisposing cause of fungal keratitis, ocular and systemic abnormalities and previous corticosteroid application were also important risk factors.

Conclusion:

Ocular fungal infections continue to be an important cause of ocular morbidity, particularly in underdeveloped countries. A better understanding of the risk factors and pathogens involved in these infections will improve their management and prognosis.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Jastaneiah S, Al-Rajhi A, Abbott D. Ocular mycosis at a referral center in Saudi Arabia: A 20-year study. Saudi J Ophthalmo. 2011 Apr; 25(3).
2. Firacative C. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020 Oct; 9(115).
3. Mukherjee B, Raichura ND, Alam MS. Fungal infections of the orbit. Indian journal of ophthalmology. 2016; 64(5): p. 337-345.
4. Köhler J, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect J. Fungi that Infect Humans. Microbiol Spectr. 2017 Jun; 5(3).
5. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. J Fungi (Basel). 2017 Oct; 3(4).
6. McCarty T, Pappas P. Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2016 March; 30(1): p. 103-24.
7. https://www.oph78.fr/ophtalmologie/anatomie-oeil/#definition. [Online].
8. Berthélémy S. Anatomie de l'œil et de ses annexes. Actualités Pharmaceutiques. 2009; 48(482).
9. Bourcier T, Sauer A, Letscher-Bru V, Candolfi E. Kératites fongiques. Journal Français d'Ophtalmologie. 2011 October; 34(8): p. 563-567.
10. Thomas P. Fungal infections of the cornea. Eye (Lond). 2003 Nov; 17(8): p. 852-62.
11. Gower E, Keay L, Oechsler R, et a. Trends in fungal keratitis in the United States, 2001 to 2007. Ophthalmology. 2010; 117: p. 2263-7.
12. Gaujoux T, Borsali E E, Goldschmidt P, et a. Fungal keratitis in France. Acta Ophthalmol. 2011; 89.

13. Jurkunas U, Behlau I, Colby K. Fungal keratitis : changing pathogens and risk factors. Cornea. 2009; 28: p. 638-43.

14. Zhong W, Yin H, Xie L. Expression and potential role of major inflammatory cytokines in experimental keratomycosis. Mol Vis. 2009; 15: p. 1303-11.

15. Karthikeyan R, Leal SM J, Prajna N, et a. Expression of innate and adaptive immune mediators in human corneal tissue infected with Aspergillus or fusarium. J Infect Dis. 2011; 204: p. 942-50.

16. Mukherjee P, Chandra J, Yu C, et a. Characterization of fusarium keratitis outbreak isolates : contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: p. 4450-7.

17. Sauer A, Abry F, Lhermitte B, et a. Purulent corneal melting secondary to multidrug-resistant Fusarium oxysporum aggravated by topical corticosteroid therapy. J Fr Ophtalmol. 2008; 31.

18. Ganguly S, Salma K, Kansakar I, et a. Pattern of fungal isolates in cases of corneal ulcer in the western periphery of Nepal. Nepal J Ophthalmol. 2011; 3: p. 118-22.

19. Bullock J, Khamis H. A retrospective statistical analysis of the Fusarium keratitis epidemic of 2004-2006. Ophthalmic Epidemiol. 2010; 17: p. 179-84.

20. Bullock J, Warwar R, Elder B. Temperature instability of ReNu With MoistureLoc : a new theory to explain the worldwide Fusarium keratitis epidemic of 2004-2006. Arch Ophthalmol. 2008; 126: p. 1493-8.

21. Yildiz E, Abdalla Y, Elsahn A, et a. Update on fungal keratitis from 1999 to 2008. Cornea 2010. ; 29: p. 1406-11.

22. Labbe A KCDBea. Contribution of in vivo confocal microscopy to the diagnosis and management of infectious keratitis. Ocul Surf. 2009; 7: p. 41-52.

23. Takezawa Y, Shiraishi A, Noda E, et a. Effectiveness of in vivo confocal microscopy in detecting filamentous fungi during clinical course of fungal keratitis. Cornea. 2010; 29 : p. 1346-52.

24. Imane L. LES KÉRATITES FONGIQUES : Problèmes diagnostiques thérapeutiques et profils évolutifs. 2019..

25. Spierer O, Dugar J, Miller D, et a. Comparative antifungal susceptibility analysis of Candida albicans versus non-albicans Candida corneal isolates. Cornea. 2015; 34: p. 576-9.

26. Nowik K, Wylęgała A, Nowik K, et a. A single-centre retrospective observational study of fungal keratitis in Poland with a review of findings in Europe. Ann Agric Environ Med. 2020 Sep; 27(3): p. 343-347.

27. Rondeau N, Bourcier T, Chaumeil C, et a. Les kératomycoses au Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts : étude rétrospective à propos de 19 cas. JOURNAL FRANÇAIS D'OPHTALMOLOGIE. 2002 avril; 25(5).

28. Anane S, Ben Ayed N, Malek I, et a. Keratomycosis in the area of Tunis: epidemiological data,diagnostic and therapeutic modalities. Ann Biol Clin. 2010; 68(4): p. 441-7.

29. Homas P, Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. Clin Microbiol Infect. 2013 Mar; 19(3): p. 210-20.

30. Tilak R, Singh A, Maurya O, et a. Mycotic keratitis in India: a five-year retrospective study. J Infect Dev Ctries. 2010 Mar; 4(3): p. 171-4.

31. Gopinathan U, Sharma S, Garg P, et a. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. Indian journal of ophthalmology. 2009; 57(4): p. 273-279.

32. Farrell S, McElnea E, Moran S, et a. Fungal keratitis in the Republic of Ireland. Eye (Lond). 2017 Oct; 31(10): p. 15-22.
33. Basak S, Mohanta A, Bhowmick A, et a. Epidemiological and microbiological diagnosis of suppurative keratitis in Gangetic West Bengal, eastern India. Indian J Ophthalmol. 2005 Mar; 17-22; 53(1).
34. Zbiba W, Baba A, Bouayed E, et a. A 5-year retrospective review of fungal keratitis in the region of Cap Bon. J Fr Ophtalmol. 2016 Dec; 39(10): p. 843-848.
35. Sun R, Jones D, Wilhelmus KR K. Clinical characteristics and outcome of Candida keratitis. Am J Ophthalmol. 2007 Jun; 143(6): p. 1043-1045.
36. Chaumeil C, Bourcier T, Rostane H, et a. Diagnostic et traitement des endophtalmies fongiques et des kératomycoses. JOURNAL OF MEDICAL MYCOLOGY. 2007 décembre; 17(4).
37. Ritterband D, Seedor J, Shah M, et a. Fungal keratitis at the new york eye and ear infirmary. Cornea. 2006 Apr; 25(3): p. 264-7.
38. Colin J, Mehou-Loko A, Le Flohic A. Kératites amibiennes et kératites fongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Ophtalmologie. 1995.
39. Acharya Y, Acharya B, Karki P. Fungal keratitis: study of increasing trend and common determinants. Nepal J Epidemiol. 2017 jun; 7(2): p. 685-693.
40. Walther G SSKKea. Fusarium Keratitis in Germany. J Clin Microbiol. 2017; 55(10): p. 2983-2995.
41. Nielsen S, Julian H, Lindegaard J, et a. Incidence and clinical characteristics of fungal keratitis in a Danish population from 2000 to 2013. Acta Ophthalmol. 2015 Feb; 93(1): p. 54-8.

42. Rautaraya B, Sharma S, Kar S, et a. Diagnosis and treatment outcome of mycotic keratitis at a tertiary eye care center in eastern India. BMC Ophthalmol. 2011 Dec; 11(39).

43. Khairallah S, Byrne K, Tabbara K. Fungal keratitis in Saudi Arabia. Doc Ophthalmol. 1992; 79(3.): p. 269-76.

44. Nielsen SE JHLJHKIAeaIaccofk. .

45. Nielsen SE JHLJHKIAea. Incidence and clinical characteristics of fungal keratitis. .

46. Jurkunas U, Behlau I I, Colby K. Mycotic keratitis : epidemiology, diagnosis and managemen. Clin Microbiol Infect. 2013; 19.