

# 微生物混合感染性角膜炎动物模型研究进展

李玉婷, 李妍, 王岚, 胡竹林

引用:李玉婷,李妍,王岚,等.微生物混合感染性角膜炎动物模型研究进展.国际眼科杂志 2022;22(2):230-234

基金项目:云南省基础研究计划(昆医联合专项)[No.202001AY070001(-165)]

作者单位:(650021)中国云南省昆明市,云南大学附属医院眼科 云南省第二人民医院眼科 云南省眼科医院 昆明医科大学第四附属医院眼科 云南省眼科研究所 云南省眼部疾病临床医学研究中心 云南省眼病临床医学中心 云南省眼科疾病研究重点实验室

作者简介:李玉婷,女,昆明医科大学在读硕士研究生,研究方向:眼表疾病、青光眼、角膜炎。

通讯作者:胡竹林,男,毕业于华中科技大学,博士,主任医师,科主任,博士研究生导师,研究方向:眼表疾病、角膜病、青光眼、眼科疑难疾病。HZZL77@263.net

收稿日期:2021-05-24 修回日期:2021-12-21

## 摘要

微生物混合感染性角膜炎是一种因角膜感染,严重时会导致的眼表疾病,起病急、发展迅速,严重时会引起角膜穿孔,可致视力下降或视力丧失。建立微生物混合感染性角膜炎动物模型有利于探索其发病机制、预防、临床诊断和治疗等。本文对微生物混合感染性角膜炎动物模型的制作方法以及造模感染成功后的鉴定方法进行综述,旨在为进一步开发、研究该病的动物模型提供参考。

关键词:角膜炎;混合感染性;动物模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.2.11

## Research progress on animal model of mixed infection of microorganisms keratitis

Yu-Ting Li, Yan Li, Lan Wang, Zhu-Lin Hu

**Foundation item:** The Association Foundation Program of Yunnan Province Science and Technology Department and Kunming Medical University [No.202001AY070001(-165)]

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yunnan University; Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Yunnan Province; Yunnan Eye Hospital; Department of Ophthalmology, Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Yunnan Eye Institute; Yunnan Clinical Medical Research Center of Eye Diseases; Yunnan Clinical Medical Center of Eye Diseases; Key Laboratory of Yunnan Province for the Prevention and Treatment of Ophthalmology, Kunming 650021, Yunnan Province, China

**Correspondence to:** Zhu-Lin Hu. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yunnan University; Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Yunnan Province;

Yunnan Eye Hospital; Department of Ophthalmology, Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Yunnan Eye Institute; Yunnan Clinical Medical Research Center of Eye Diseases; Yunnan Clinical Medical Center of Eye Diseases; Key Laboratory of Yunnan Province for the Prevention and Treatment of Ophthalmology, Kunming 650021, Yunnan Province, China. HZZL77@263.net

Received: 2021-05-24 Accepted: 2021-12-21

## Abstract

• Microbial mixed infectious keratitis is an ocular surface disease caused by corneal infection, which has an acute onset and rapid progression and can lead to blindness in severe cases. Establishing an animal model of microbial mixed infectious keratitis is conducive to exploring its pathogenesis, prevention, clinical diagnosis and treatment. This article reviews the methods of making animal models of mixed infectious keratitis with microorganisms and the diagnostic methods after successful modelling infections, aiming to provide references for the further development and research of animal models of the disease.

• KEYWORDS: keratitis; mixed infection; animal model

**Citation:** Li YT, Li Y, Wang L, et al. Research progress on animal model of mixed infection of microorganisms keratitis. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2022;22(2):230-234

## 0 引言

微生物角膜炎(microbial keratitis, MK)是细菌、真菌、病毒、寄生虫或多种感染因子混合感染人或哺乳类动物眼部引起创伤或感染的角膜疾病<sup>[1]</sup>。MK是单侧角膜失明的重要原因之一<sup>[2]</sup>,在热带地区,真菌性角膜炎(fungal keratitis, FK)约占所有MK的40%<sup>[3]</sup>,我国FK的致病菌主要为两种,分别是镰刀菌属(25.5%)和曲霉菌属(10.3%)<sup>[4]</sup>;而在温带地区,细菌性角膜炎(bacterial keratitis, BK)更为常见<sup>[5]</sup>,致病菌中比例最大的是表皮葡萄球菌占34.5%,其次是肺炎链球菌占13%,最后是金黄色葡萄球菌占10.2%等<sup>[6]</sup>。由两种以上微生物引起的角膜混合感染相对少见,其可能是合并感染,也可能是继发于现有微生物的二次感染。最近一份关于角膜感染的报告指出,存在混合感染的现象,细菌和真菌混合感染的比例占1.9%,而细菌和棘阿米巴原虫的混合感染要更多一些,占比为15.8%<sup>[7]</sup>。另外,一些病例报告里面,对于不同种的细菌和真菌,分别进行了混合感染的相关介绍,例如表皮葡萄球菌和镰刀菌属<sup>[8]</sup>、真菌和革兰阳性球菌<sup>[9]</sup>、假单胞菌和烟曲霉<sup>[10]</sup>等。混合感染性角膜炎引起的角膜炎症会损害角膜上皮和角膜深层,严重时会引起角膜穿孔<sup>[11]</sup>,进一步导致视力下降,甚至视力丧失,有的患者需

要摘除眼球或剜除眼内容物,才能防止病变进一步扩散至全身,因此,及时有效地治疗对控制病变的发展十分重要。由于混合感染性角膜炎的病理机制尚不明确,建立动物模型对于探索其发病机制具有重要意义。与此同时,动物模型的建立也有助于该病的预防、诊断和治疗等。本文对近年来国内外微生物混合感染性角膜炎动物疾病模型制备方法进行总结。

## 1 实验动物的选择

在医学研究方面,建立动物模型是非常有必要的,可以帮助人类对疾病进行预测、预防,进而提前进行干预、治疗,控制疾病的发生发展。因此在研究许多重大疾病的时候,需要建立相应的动物模型,但缺乏合适的动物模型一直是全球各个国家关注并需要攻克的难题,人们也在不断建立和完善各类疾病动物模型<sup>[12]</sup>。建立模型的时候,对于动物的挑选,需要根据菌种的相关特征及实验需求,找到最为合适的实验动物。

目前研究中使用的动物主要有兔、鼠、猴<sup>[13]</sup>。与人类的角膜相比,兔角膜要更大一些,易于手术操作,在手术过程中及术后,可以更细致的观察到角膜局部的变化,而且兔的结膜是红色的,其前房出现的纤维蛋白更容易被发现、观察;同时,可以获得较多的实验标本,还可以获得更多具有实用性的疾病参数,兔子中有两个国家的品种使用较为广泛,一个是新西兰的白兔,一个是荷兰的带纹兔<sup>[14-15]</sup>。但从免疫学观点看,实验用兔并不是完全没有缺点的,存在一定的局限性,它的繁殖发生在较为亲近的群体当中,存在组织相容性,由于不是近交系动物,很难确定其免疫遗传背景<sup>[16]</sup>,这些都会给实验造成不确定性和稳定性差。小鼠的角膜与人类相比较小,无论是在手术操作方面,还是在取材方面,都没有兔眼简便,而且不利于微生物混合感染大体形态学的观察。虽然小鼠缺陷很明显,但也不能忽视它的优势。因为小鼠不仅具有较多的近交系品系,还具有较多的远交系品系,特别是近年来广为人知的转基因研究,转基因后获得的小鼠,可以对一些特殊因子进行针对性分析,同时提供生物制剂,除了 BALB/c 小鼠外,还有 C57BL/6 品系小鼠,它们都是实验中经常用到的品系类型。两类小鼠进行比较后发现,第一类小鼠更加敏感一些,针对细菌感染的程度更高<sup>[17]</sup>,实验上更为常用。猴属于灵长类动物,猴眼的各层组织结构特别是角膜,与人眼极其相似,实验人员发现,用猴子造模能更好地模拟疾病的发生发展及转归<sup>[18]</sup>。但是因为猴子价格昂贵,在实际工作中操作不便,不能进行大规模、大批量的实验,也不能获得较多的实验标本,故猴子造模应用较少。近年来,树鼩(tree shrew)模型越来越得到人们的关注。树鼩不仅体型小、生殖周期短、寿命短,饲养成本也低,是现代生物医学研究中最有望替代灵长类动物的一类实验动物<sup>[19]</sup>。树鼩角膜大小适中,角膜各层结构和人类角膜较相似<sup>[20]</sup>,而且与啮齿类相比,与人类亲缘关系更近<sup>[21]</sup>,作为造模动物来说,是角膜疾病较为理想的造模动物。但树鼩研究历史较短,无特异性抗体,缺乏特异性强的诊断试剂,因此其实验结果的特异性、可靠性不高,还有待进一步研究。其他还有用豚鼠、猫等动物作为模型。

因为实验动物大多数为近亲交配,这与远系繁殖的人类就有较大差异。另外根据实验动物的不同,在解剖上也存在不同的特征,其他还包括组织成分、功能组件的差别,如人的角膜直径大约为 11~12mm,而兔的角膜直径为

13mm,鼠的角膜直径 2.2~3.5mm,树鼩则为 8~9mm<sup>[22-23]</sup>,四者进行对比,人类的角膜厚度最厚,眨眼间隔时间较短,只有 2.8s,但兔子和小鼠的眨眼间隔时间,是人类的 10 倍不止,达到 30s;另外,只有兔子眼表有一层瞬膜,而人类没有,这会造成眼表观察时的各种差异<sup>[24]</sup>。所以,不管动物在某些方面的特征与人类有多么相近,依然不能完全替代人类,实验造模的时候还是存在差异。选择好适合的动物类型后,需要先适应性饲养 7d 左右,使用放大镜或手电筒检查动物双眼是否存在眼疾,进行相关实验操作的时候,需要给予实验动物一定的关爱,且不违背动物伦理<sup>[25]</sup>。

## 2 菌株的选择

建立混合感染性角膜炎动物模型要根据流行病学调查结果或实验要求,选择临床常见混合感染菌种,以便动物模型能广泛应用于临床,促进临床混合感染性角膜炎的防治进展。

细菌和真菌是角膜混合感染最常见的类型。被报道较多的有葡萄球菌属、曲霉菌属及镰刀菌属<sup>[3, 26-28]</sup>。许多疾病中都描述了细菌与真菌之间的相互作用,包括真菌和革兰氏阳性菌,如戈登链球菌和白色念珠菌<sup>[29]</sup>、金黄色葡萄球菌与新型隐球菌<sup>[30]</sup>以及金黄色葡萄球菌和烟曲霉<sup>[31]</sup>。其中,Granillo 等<sup>[31]</sup>在研究中发现,金黄色葡萄球菌在混合生物膜中抑制了烟曲霉的生长。最近一份关于感染性角膜炎的报告指出,在所有 3183 例病例中,有 2.39%的病例为细菌和真菌混合感染<sup>[32]</sup>。Ahn 等<sup>[8]</sup>进行了一项历时 8a(2000/2007 年)的关于细菌和真菌性混合感染角膜炎的回顾性研究,报告称混合感染最常见的微生物组合是镰刀菌(fusarium)和表皮葡萄球菌(staphylococcus epidermidis)占 39%。革兰氏阳性菌在细菌中最常见(占细菌培养总数的 79%),其中表皮葡萄球菌占比最大,达到了 45%,其次是草绿色链球菌(streptococcus viridans)占 11%。真菌中,丝状真菌(filamentous fungi)占主导地位(占有所有真菌培养物的 79%),其中最常见的是镰刀菌属占 56%,其次是念珠菌种(candida)占 12%。结合以往的病例报道发现,临床上细菌真菌混合感染较为常见,但是在建立 FK 动物模型时,因为实验动物普遍对真菌不易感,常常需要对实验动物进行免疫抑制,而免疫抑制会加重细菌的感染,因此免疫抑制可能会对建立细菌真菌混合感染动物模型产生一定影响。

实验结果除了具有真实可靠性以外,还需要具备可重复性,进行动物模型制作时,尽可能选用权威微生物种保存机构(如 American Tissue Culture Collection, ATCC;中国科学院微生物研究所等)保存的标准菌株,最好选用临床混合感染性角膜炎患者的分离标本。

## 3 操作方法

### 3.1 菌液配制

在实验开始前 24h 或 48h,将菌种接种于营养琼脂斜面进行活化,细菌菌株如化脓性链球菌,接种于血琼脂培养基<sup>[33]</sup>,如果是大肠埃希菌,接种于中国蓝培养基<sup>[34]</sup>,37℃下恒温培养 1~2d;真菌菌株一般接种于沙保氏培养基(sabouraud dextrose agar, SDA)或马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato extrose agar, PDA)30℃温度或室温条件下培养 72h;挑取生长良好的菌落振荡培养,配制微生物混悬液。细菌浓度大多数情况下为  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  CFU/mL<sup>[35]</sup>;关于真菌菌液浓度,国内外报道的结

果不一,浓度从 $10^6 \sim 10^{10}$  CFU/mL不等<sup>[36-38]</sup>。Wu等<sup>[39]</sup>利用鼠制作真菌感染模型的过程中发现,角膜上皮损伤后,真菌接种至少需要 $10^2$  CFU/mL才能引起角膜感染;随着菌液浓度的增加,角膜的感染成功率提高,而一次接种达到 $10^6$  CFU/mL就足以使所有角膜感染真菌。

菌液配制并不是统一的标准,需要根据微生物的具体功能进行调节,例如对肺炎链球菌进行培养时,选择羊血琼脂培养基,还要加入5% CO<sub>2</sub><sup>[40]</sup>。不同菌种间毒力、致病性有所区别,且存在相互拮抗抑制的可能,混合感染时不同菌液的浓度选择对实验的成功至关重要。

### 3.2 微生物接种方法

**3.2.1 角膜表面划痕法** 二十世纪七十年代初期,Gerke等<sup>[41]</sup>首次提出用角膜表面划痕法通过小鼠制作绿脓杆菌模型,此方法一经推出,就获得了众多学者的支持和尝试。该方法在不划破基质侵入前房的前提下,使用无菌25~30G注射针头在角膜表面划出长度为1mm左右的3~5道平行的伤口,选择吸液管将菌液(一般为5 $\mu$ L)接种于小鼠的角膜表面<sup>[42-43]</sup>。此方法优点:易于操作,感染需要的时间较短,同时对于病原微生物和角膜伤口而言,可以促进它们之间的相互作用;缺点:感染率偏低。另外菌液流动性较好,较早滴加的菌液可快速弥散于受损角膜,可能对后滴加的菌种造成影响,降低后者的侵袭性。因此,此方法需进行改进,例如进一步明确所接种病原微生物的种类以及固定或麻醉实验动物的时间,以增加病原微生物的感染率。

**3.2.2 基质内注射法** 到了二十世纪七十年代中后期,Kupferman等<sup>[44]</sup>提出了角膜基质内注射模型。用微量注射器定量抽取适量(一般为5 $\mu$ L)的菌液,选择角膜近中心处进针,针尖进入至角膜实质层下1/3,形成白色菌斑,直径范围在5~6mm。优点:该方法操作方便,具有良好的重复性。对于感染具有难度的菌株,例如真菌感染,也能起到相应的效果,具有较高的感染率;缺点:此方法的感染过程在一定程度上破坏了实验动物角膜的正常结构,与人角膜自然感染过程存在较大差异,所以此法更多是用来判断角膜炎药物疗效和探究诊断方法。

**3.2.3 角膜接触镜法** 随着配戴隐形眼镜的人数不断增多,角膜接触镜引发的角膜感染也越来越常见,学者们结合角膜表面划痕法,提出了角膜接触镜法。即对于实验动物的角膜直径进行标记,使用角膜环钻,将上皮去除,戴上角膜接触镜,并滴入适量菌液,或在培养基上将角膜接触镜与适当浓度(多为 $10^8$  CFU/mL)菌液一同培养24h,温度保持在30 $^{\circ}$ C,然后戴在损伤角膜表面。缝闭眼睑,完成接种后的48h,再拆除缝线,用裂隙灯进行观察。有关研究表明,低氧性损伤是发生感染的前提,隐形眼镜相关角膜感染最有可能是由于低氧透接触镜导致的<sup>[45]</sup>。所以,在建立模型的时候,如果想将角膜感染率提高,可以通过建立缺氧模型来实现。此方法的优势为:将病原微生物感染角膜的过程尽可能地进行了模拟和还原,不仅提高了感染率,还能对发病过程及机制进行研究;缺陷则是操作具有一定的难度,需要更多的时间,对于实验动物的麻醉时间及实验操作人员,有比较严格的要求。

**3.2.4 “微口袋”法** 为了建立混合感染模型,Ponce-Angulo等<sup>[46]</sup>采用了一种称为“微口袋”的新技术,他们使用的方法是在接种金黄色葡萄球菌及镰刀菌前,预先用环磷酰胺和甲基强的松龙联合处理实验用小鼠(分别于接

种前5、3、1d肌内注射80mg/kg甲基强的松龙及150mg/kg环磷酰胺),制造出免疫低下的动物模型。每个微口袋的长度为2mm,用针头在角膜缘制造一个病变,操作时要小心谨慎,以免角膜穿孔和改变眼睛的内部结构,将细菌和真菌细胞以相同浓度 $1 \times 10^5$  CFU/mL同时接种到角膜组织中,闭合动物睑裂几秒钟,保证角膜里面菌液的分布是均匀的。针刺的程度不一,会造成不同程度的创伤,伤及角膜基质可能会影响混合感染的自然病程,不同个体间的感染病变也可能因为创伤程度不同而变化,使动物模型的稳定性不佳,此法还有待进一步的研究。

### 4 感染成功后的鉴定方法

造模后需要对实验动物进行诊断及鉴定诊断,看角膜是否有微生物感染,是单一菌种感染还是混合感染;同时还需要鉴定感染病原菌,确定是哪一种病原微生物导致的感染。

**4.1 病原学培养检测** 对于感染性角膜炎来说,微生物学是主要诊断方法,临床上常用的基本诊断工具依次有:涂片、培养和敏感性测定,是检测角膜感染的“金标准”<sup>[47]</sup>。主要目的是对真菌、细菌及阿米巴原虫进行分离、培养及鉴定。不同菌种检测操作方法如下:(1)马铃薯葡萄糖斜面培养基的真菌培养:标本接种后,待菌落生长,利用胶带法和小培养法,对真菌种属进行鉴定。(2)血平板、巧克力平板的细菌培养:标本接种于两种平板后,放在营养肉汤中,等待细菌增长,任意两种培养基培养阳性后,分离出单个菌落,然后鉴定出细菌的种类。(3)阿米巴培养:标本接种后,添加50 $\mu$ L大肠杆菌菌液共同培养,利用斜面镜观察,找到阿米巴滋养体或者包囊为阳性。

平板培养的优点:可选择混合感染的菌种适宜的平板,刮取角膜组织进行平板培养后,可在平板上观察到不同的微生物生长,是较为直观的鉴别方法,同时可进一步分离纯化菌种进行鉴定。但由于混合感染的病原菌生长周期各不相同,如细菌真菌混合感染,细菌生长相对较快,真菌生长相对缓慢,培养时长增加等因素,会影响平板培养的阳性检出率。

**4.2 角膜涂片染色细胞学检查** 首先,取材部位为动物模型角膜病灶处,及时涂片,使用甲醇原液进行固定,时间一般为60~120s,然后用稀释吉姆萨染液染色后直接镜检,经济快捷、可反复操作、准确率高,并可镜下直接检测有无真菌或细菌感染,协助早期确定诊断,目前是我国快速诊断感染性角膜炎的主要检测技术<sup>[48]</sup>。除了以上染色方法,还可以选择荧光染液对真菌进行荧光染色检测,在荧光显微镜下可以观察到真菌的长丝状蓝色或者蓝紫色高亮荧光<sup>[49]</sup>。

该法方便快捷,可以迅速对感染性角膜炎做出诊断;但当取材部位不准确或有所遗漏时,涂片也会呈假阴性结果。因此,需要掌握正确的取材方法,注意刮取不同的角膜病灶处,进行染色、镜检、观察。

**4.3 角膜激光共聚焦显微镜检查** 麻醉或处死动物后,将激光扫描摄像头的位置调节好,使激光光束位于角膜病变区域。利用非连续手动扫描模式,对病灶区进行扫描。优点是可以对感染性角膜炎的病原体影像如真菌菌丝,阿米巴包囊、空囊、滋养体,快速进行诊断<sup>[50]</sup>。但是共聚焦显微镜属于形态学检测<sup>[51]</sup>,大部分感染性角膜炎在共聚焦显微镜下的主要特征是出现炎症细胞,因此若是细菌混合感染,或真菌、阿米巴感染症状不典型,则无法区分。

**4.4 16S rRNA 基因序列分析法** 提取病原菌的 DNA, 采用通过引物经 PCR 扩增 16S rRNA 基因片段, 然后对扩增片段进行测序。此方法特异性高, 可以用于感染性角膜炎检测尤其是不清楚感染病原菌及排除其他病原菌同时感染的情况<sup>[52]</sup>。

但是混合感染若不进行纯化, 扩增时不同菌种的引物不同, 可能会导致扩增失败或导致鉴定错误。同一菌种采用通用引物进行扩增, 结果出现双峰, 对鉴定结果也会产生影响。为了避免鉴定失败, 可先将菌种平板培养后分离纯化, 再进行测序, 或进行高通量测序。

## 5 小结

综上所述, 微生物混合感染性角膜炎逐渐增多, 严重威胁着人类的眼部健康, 必须给予重视。为了更好地研究人类微生物混合感染性角膜炎的发病机制, 就需要掌握一系列感染成功率高、疾病发生发展过程与人角膜混合感染的过程相似、一致性强的动物模型制作的方法。但目前存在较多的问题和困难, 需要进一步的尝试和克服, 以保证动物实验研究的成果客观、可信、可重复, 能够为探索该病的发病机制和指导临床提供重要的基础, 降低其致盲率, 为感染性眼科疾病做出巨大贡献, 并让研究能够更进一步。

## 参考文献

- 吕健, 曾思明, 蒋莉, 等. 活体共聚焦显微镜在微生物性角膜炎诊断中的应用进展. *国际眼科杂志* 2020;20(12):2070-2073
- Haijing W, Yaoguang Z, Zhijian L, et al. Prevalence and causes of corneal blindness. *Clin Exp Ophthalmol* 2014;42(3):249-253
- Usha G, Savitri S, Prashant G, et al. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol* 2009;57(4):273-279
- 段芳, 廖靖愉, 唐水敏, 等. 华南地区某眼科医院的感染性角膜炎病原菌谱特征. *中华眼视光学与视觉科学杂志* 2019;21(2):92-96
- Ni N, Nam EM, Hammersmith KM, et al. Seasonal, Geographic, and Antimicrobial Resistance Patterns in Microbial Keratitis: 4 - Year Experience in Eastern Pennsylvania. *Cornea* 2015;34(3):296-302
- Abdulrahman A, Alshuhaibani FA, Alkaff AM, et al. Bacterial Profile and Antibiotic Susceptibility Pattern of Bacterial Keratitis at a Tertiary Hospital in Riyadh. *Clin Ophthalmol* 2019;13:2547-2552
- Kaliamurthy J, Kalavathy CM, Parmar P, et al. Spectrum of Bacterial Keratitis at a Tertiary Eye Care Centre in India. *Bio Med Research International* 2013;2013:181564
- Ahn M, Yoon KC, Ryu SK, et al. Clinical Aspects and Prognosis of Mixed Microbial (Bacterial and Fungal) Keratitis. *Cornea* 2011;30(4):409-413
- 刘慧峰, 张纯涛, 何媛, 等. 真菌混合革兰阳性球菌性角膜炎 38 例治疗效果临床观察. *临床眼科杂志* 2017;25(5):444-446
- Khoo LW, Srinivasan SS, Henriquez FL, et al. A Rare Case of Mixed Infectious Keratitis Caused by *Pseudomonas koreensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Case Rep Ophthalmol* 2020;11(3):600-605
- Gaujoux T, Chatel MA, Chaumeil C, et al. Outbreak of Contact Lens-Related *Fusarium* Keratitis in France. *Cornea* 2008;27(9):1018-1021
- 赵成, 王坚刚. 心房颤动物模型的建立和应用进展. *医学综述* 2020;26(6):1041-1045, 1050
- 刘科琳, 王英, 李君一, 等. 高血压动物模型的研究进展. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2021;21(4):316-319
- 张翠英. 核黄素联合 360nmUVA 或 440nm 蓝光角膜胶原交联治疗兔真菌性角膜炎的实验研究. *山东大学* 2017

- 15 陈晓敏, 邝健标, 武振宁, 等. 通过可控干燥系统建立兔干眼模型. *中山大学学报(医学科学版)* 2020;41(2):251-259
- 16 蔡月琴, 屠珏, 余佳, 等. RAPD 标记技术用于 WHBE 兔近交系培育中的遗传分析. *中国实验动物学报* 2009;17(5):326-329
- 17 Maksimenko OG, Deykin AV, Khodarovich YM, et al. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta Naturae* 2013;5(1):33-46
- 18 欧阳博文, 张丰菊. 恒河猴与人眼球结构及生物学参数差异的研究进展. *中华眼视光学与视觉科学杂志* 2017;19(7):442-448
- 19 许凌, 范宇, 蒋学龙, 等. 树鼩进化分类地位的分子证据. *动物学研究* 2013;34(2):70-76
- 20 吴敏, 李娜, 孙晓梅, 等. 恒河猴和树鼩角膜内皮细胞的比较分析. *中国实验动物学报* 2016;24(2):164-168
- 21 徐林, 张云, 梁斌, 等. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述. *动物学研究* 2013;34(2):59-69
- 22 Turki A, Saeed A. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea. *Mol Vis* 2011;17:2283-2291
- 23 Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JPG. Dimensions and Morphology of the Cornea in Three Strains of Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(8):3648-3654
- 24 Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, et al. Comparative in Vivo Confocal Microscopical Study of the Cornea Anatomy of Different Laboratory Animals. *Curr Eye Res* 2010;35(12):1072-1080
- 25 Levy N. The Use of Animal as Models: Ethical Considerations. *Int J Stroke* 2012;7(5):440-442
- 26 Jindal A, Moreker MR, Pathengay A, et al. Polymicrobial endophthalmitis: prevalence, causative organisms, and visual outcomes. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2013;3(1):6
- 27 Iwalokun BA, Oluwadun A, Akinsinde KA, et al. Bacteriologic and plasmid analysis of etiologic agents of conjunctivitis in Lagos, Nigeria. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2011;1(3):95-103
- 28 Lim NCS, Lim DKA, Ray M. Polymicrobial Versus Monomicrobial Keratitis: A Retrospective Comparative Study. *Eye Contact Lens* 2013;39(5):348-354
- 29 Bamford CV, Nobbs AH, Barbour ME, et al. Functional regions of *Candida albicans* hyphal cell wall protein Als3 that determine interaction with the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 2015;161(1):18-29
- 30 Furuya H, Ikeda R. Interaction of triosephosphate isomerase from the cell surface of *Staphylococcus aureus* and  $\alpha$  - (1  $\rightarrow$  3) - mannooligosaccharides derived from glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2009;155(8):2707-2713
- 31 Granillo AR, Canales MGM, Espíndola MES, et al. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol* 2015;15(1):33
- 32 Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, et al. Microbial Keratitis in South India: Influence of Risk Factors, Climate, and Geographical Variation. *Ophthalmic Epidemiol* 2007;14(2):61-69
- 33 徐杰平, 刘雪玲, 黄土星, 等. 8 种痰液细菌血平板培养菌落生理盐水冲洗液 MPT64 检测结果分析. *国际医药卫生导报* 2021;27(12):1753-1755
- 34 刘艳, 王玉梅, 康国华, 等. 中国蓝琼脂培养基行业标准的制定和实验验证. *中国药事* 2012;26(2):178-190
- 35 朱彬彬. NETs 的形成对铜绿假单胞菌性角膜炎进展和预后影响的研究. *浙江大学* 2018
- 36 贾杰, 黎晓慧, 黄鑫, 等. microRNA 在树鼩真菌性角膜炎中的调控网络及其生物学功能分析. *陕西师范大学学报(自然科学版)* 2020;48(5):87-97

- 37 刘桂波. Dectin-1 通过 MAPK 信号通路调控真菌性角膜炎巨噬细胞表型相关因子的研究. 青岛大学 2019
- 38 Zhang ZH, Teng F, Sun QX, *et al.* Rapamycin liposome gutta inhibiting fungal keratitis of rats. *Int J Ophthalmol* 2019;12(4):536-541
- 39 Wu TG, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Experimental Keratomycosis in a Mouse Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1):210-216
- 40 张恬恬. 基于微滴式数字 PCR 技术的百日咳鲍特菌检测方法的建立、评价与应用. 山东大学 2020
- 41 Gerke JR, Magliocco MV. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* Infection of the Mouse Cornea. *Infect Immun* 1971;3(2):209-216
- 42 Kang C, Yongjian W, Min Z, *et al.* Lithium chloride promotes host resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Mol Vis* 2013;19:1504-1514
- 43 聂鑫鑫, 朱敏, 李美玉, 等. TREM-1 在细菌性化脓性角膜炎中的作用及其分子机制. 中山大学学报(医学科学版) 2012;33(3):305-310
- 44 Kupferman A, Leibowitz HM. Quantitation of bacterial infection and antibiotic effect in the cornea. *Arch Ophthalmol* ;94(11):1976-1981
- 45 Wei C, Zhu M, Petroll WM, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Infectious Keratitis in a High Oxygen Transmissible Rigid Contact Lens Rabbit Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(9):5890-5899
- 46 Ponce-Angulo DG, Bautista-Hernández LA, Calvillo-Medina RP, *et al.* Microscopic characterization of biofilm in mixed keratitis in a novel murine model. *Microb Pathog* 2020;140:103953
- 47 王昆. 浅谈感染性角膜炎的规范化诊断及治疗效果. 中国保健营养 2018;22(28):13
- 48 刘立春, 张秋文, 刘素媛. 涂片法与培养法对细菌性及真菌性角膜炎实验室诊断价值. 临床军医杂志 2018;46(7):796-797
- 49 张阳, 王智群, 邓世靖, 等. 涂片真菌荧光染色法对真菌性角膜炎诊断价值的研究. 中华眼科杂志 2019;55(8):601-608
- 50 Wang YE, Tepelus TC, Vickers LA, *et al.* Role of in vivo confocal microscopy in the diagnosis of infectious keratitis. *Int Ophthalmol* 2019;39(12):2865-2874
- 51 杨欣. 结膜瓣角膜全覆盖治疗中重度真菌性角膜炎的实验研究. 西南医科大学 2018
- 52 Song HY, Qiu BF, Liu C, *et al.* Identification of causative pathogens in mouse eyes with bacterial keratitis by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Exp Anim* 2015;64(1):49-56