

准分子激光原位角膜磨镶术后角膜细菌性感染的实验研究

吴超琼¹, 万芳², 李贵刚², 胡军², 徐玲娟², 李新宇²

作者单位:¹(430022) 中国湖北省武汉市第一医院眼科;
²(430030) 中国湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属
同济医院眼科

作者简介: 吴超琼, 女, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 眼科基础及临床。

通讯作者: 李新宇, 男, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 角膜病及屈光手术. lixy07@126.com

收稿日期: 2012-05-29 修回日期: 2012-08-02

Experimental study on bacterial infection of cornea after laser *in situ* keratomileusis

Chao-Qiong Wu¹, Fang Wan², Gui-Gang Li², Jun Hu², Ling-Juan Xu², Xin-Yu Li²

¹Department of Ophthalmology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China; ²Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Xin-Yu Li. Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. lixy07@126.com

Received: 2012-05-29 Accepted: 2012-08-02

Abstract

• **AIM:** To investigate a new approach of establishing rabbit bacterial infection keratitis model after laser *in situ* keratomileusis (LASIK), so as to provide reference for the diagnosis and treatment of the post-LASIK bacterial infection keratitis.

• **METHODS:** Twenty healthy adult rabbits were selected to perform LASIK on their right eyes, and inoculated with staphylococcus aureus after surgery. Examinations were performed at 12 hours, on the first, 3rd, 5th and 10th days after surgery using ocular, digital slit-lamp and confocal microscopy. After 10 days operation, the corneas were collected for pathological examination.

• **RESULTS:** Eighteen eyes bacterial infection keratitis model post-LASIK were successfully established. The infectious infiltrates appeared as dots or spots at the shallow layer of stroma underneath the corneal flap at the early stage, and gradually merged together over the infection time. The infectious infiltrates also spread bi-directionally towards the corneal flap and the deeper stromal layer from the flap interface, where the corneal flap showed more severe infection than the deeper stromal layer. At the late period the infection caused the corneal flap melting or dislocation, corneal flap ulcer and

perforation with hypopyon.

• **CONCLUSION:** It would be feasible to establish bacterial infection keratitis after LASIK. Bacterial infection would lead to serious pathological damage after LASIK.

• **KEYWORDS:** cornea; laser *in situ* keratomileusis; staphylococcus; keratitis

Citation: Wu CQ, Wan F, Li GG, *et al.* Experimental study on bacterial infection of cornea after laser *in situ* keratomileusis. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2012;12(9):1644-1646

摘要

目的: 建立日本大耳白兔 LASIK 术后感染模型, 了解 LASIK 术后细菌性角膜炎的病理过程, 为 LASIK 术后细菌性角膜炎诊断、治疗提供依据。

方法: 选取健康成年日本大耳白兔 20 只, 右眼行 LASIK 术后接种金黄色葡萄球菌, 在术后 12h; 1, 3, 5, 10d 各时期行肉眼、数字化裂隙灯和共焦显微镜观察, 10d 后处死实验动物取角膜行病理切片。

结果: 18 眼成功建立了 LASIK 术后细菌性角膜炎模型。其早期表现为角膜瓣浅基质层点状或小斑片状炎症浸润, 随着时间的推移慢慢融合, 并以层间为起点同时向前(角膜瓣)和向后(深基质层)发展, 晚期造成角膜瓣移位、角膜瓣溃疡、穿孔伴前房积脓。

结论: 建立 LASIK 术后细菌性角膜炎模型可行。LASIK 术后细菌性角膜炎会导致严重的病理损害。

关键词: 角膜; 激光原位角膜磨镶术; 金黄色葡萄球菌; 角膜炎
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.09.10

引用: 吴超琼, 万芳, 李贵刚, 等. 准分子激光原位角膜磨镶术后角膜细菌性感染的实验研究. 国际眼科杂志 2012; 12(9): 1644-1646

0 引言

准分子激光原位角膜磨镶术(laser *in situ* keratomileusis, LASIK) 现已经成为矫正屈光不正的主要手术方法之一。尽管大量资料表明这是一种安全性很高的手术, 但作为有创手术方式, 仍可能出现术中或术后并发症, 其中最严重的并发症是术后感染性角膜炎^[1]。尽管感染率很小, 但绝对感染人数并不少^[2]。本研究试图建立 LASIK 术后感染模型, 了解 LASIK 术后细菌性角膜炎的病理过程, 为 LASIK 术后感染的防治提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年日本大耳白兔 10 只, 体质量 2 ~ 2.5kg, 雌雄不拘, 由同济医学院动物实验中心提供。术前检查: 行裂隙灯及检眼镜检查排除眼前、后节病变。标准菌株: 金黄色葡萄球菌(ACTT25923) 由华中科技大学同济医学院病原生物学系提供。

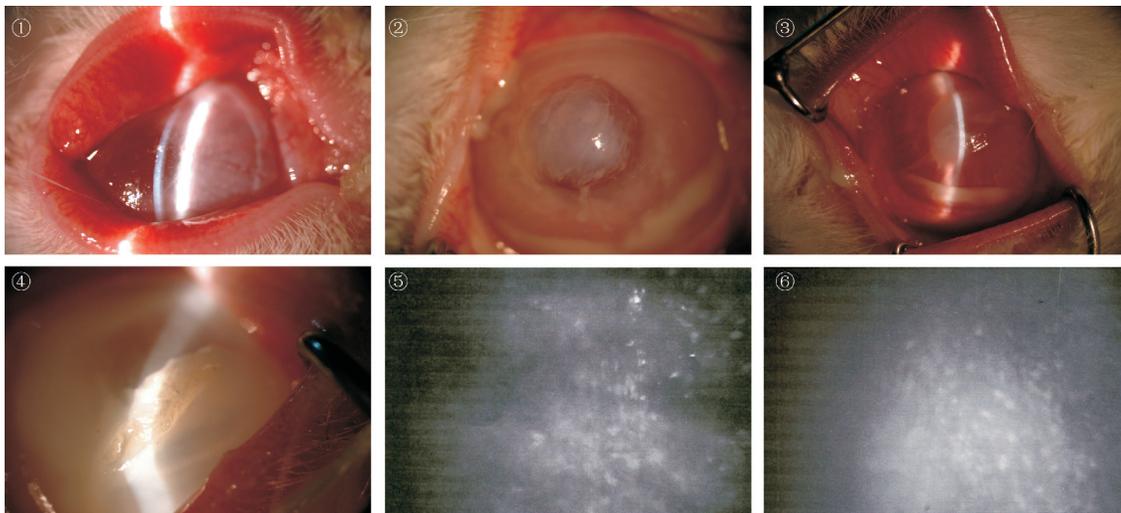


图1 建模后第1d感染组球结膜轻度充血,角膜瓣下基质层间灰白色点状浸润。

图2 建模后第3d感染组角膜瓣下灰白色浸润融合成片状,边界不清,呈丝状或毛刷边状,但角膜上皮仍完整。

图3 建模后第5d角膜瓣溃疡伴有前房积脓。

图4 建模后第6d角膜灰白色混浊,致密的浸润灶浸及角膜瓣全层,并深达后基质层,有角膜瓣移位。

图5 建模后3d角膜基质有大量的炎性细胞浸润,可见1~2 μm 散在高反光点。

图6 建模后5d大片高反光区,不能区分角膜组织结构。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌的培养 金黄色葡萄球菌菌株加入到适量牛肉膏液体培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养18~24h。待温箱中培养基混浊,接种在牛肉膏汤固体培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养18~24h。挑取4个菌落放入100mL的生理盐水中混匀稀释,稀释后接种在牛肉膏汤固体培养基中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养18~24h。

1.2.2 金黄色葡萄球菌感染动物模型的制作 实验前3d,以0.3%妥布霉素眼液滴眼,4次/d。麻醉:用盐酸氯胺酮50mg/kg,盐酸氯丙嗪10mg/kg混合液肌肉注射麻醉,0.4%盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉。实验动物常规术前洗眼及皮肤消毒,铺巾,开睑器开睑,做角膜标记,以直径为8.5mm的负压吸引环,厚度设置为130 μm 的微型角膜板层刀,启动负压吸引装置,检测眼压后启动角膜刀,做蒂在鼻侧的角膜瓣,掀起角膜瓣用接种环挑取2个金黄色葡萄球菌菌落(直径约为2mm,含菌量为 2×10^{11})置于创面上,吸水海绵棒使角膜瓣平复,干燥3min。

1.2.3 实验步骤 接种后分别在动物接种后的第12h;1,3,5,10d观察,不同时期肉眼、数字化裂隙灯和共焦显微镜检查。第10d过量麻醉处死实验动物取角膜,甲醛固定液固定,梯度脱水、包埋,切片行HE染色,光镜观察。

2 结果

2.1 模型建立概况 18眼成功建立出细菌性角膜炎模型。

2例术后48h发现角膜瓣移位,创面愈合,建模失败。

2.2 接种细菌后临床特点 术后第1d手术眼眼角及睑缘可见少许黄白色分泌物,球结膜轻度充血,角膜瓣下基质层间灰白色点状浸润(图1)。第3d分泌物将上下睑粘住,分开眼睑见球结膜水肿,角膜瓣下灰白色浸润融合成片状,边界不清,呈丝状或毛刷边状(图2),但角膜上皮仍完整。第5d可见实验动物术眼紧闭,黄白色分泌物使眼睑粘连,分泌物覆盖全角膜,球结膜重度充血,高度水肿,角膜灰白色混浊,致密的浸润灶浸及角膜瓣全层,并深达后基质层,模型中3眼出现角膜瓣移位,出现移位的平均时间为5.1d(图3);6眼出现角膜溃疡或穿孔,溃疡周边

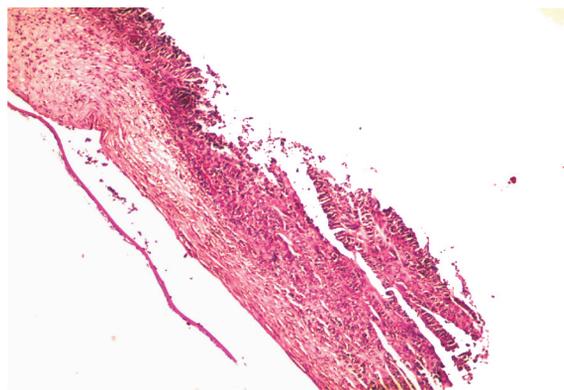


图7 角膜病理切片(HE $\times 100$)。

清楚,溃疡下方边界模糊,伴有前房反应甚至前房积脓(图4),出现溃疡的平均时间为4.3d,穿孔的平均时间为6.5d。

2.3 角膜共焦显微镜表现 术后第1d角膜瓣下浅基质层间少许炎性细胞浸润,仍可见正常角膜上皮细胞及基质细胞;术后第3d可见角膜基质大量炎性细胞及1~2 μm 高反光点,角膜上皮细胞仍部分可见,基质细胞基本不可见(图5);术后第5d表现为大片高反光区,不能区分角膜组织结构(图6)。

2.4 角膜病理切片检查 建模后10d可见角膜高度水肿、混浊,前1/3基质层可见大量中性粒细胞、淋巴细胞、成纤维细胞和坏死组织,可见角膜溃疡,并有大量炎细胞浸润(图7)。

3 讨论

LASIK术中角膜瓣下的基质创面可为术后感染的发生提供了可能性。LASIK术后并发感染性角膜炎的发生可能与患者结膜囊的带菌状态及医源性感染有关^[3,4]。有研究报道称^[5-7]:结膜囊细菌培养阳性率达31.8%~56.4%,其中以金黄色葡萄球菌为主的革兰氏阳性菌多见。因此本研究建立感染模型时采用金黄色葡萄球菌作为致病菌。

建立理想的 LASIK 感染模型是防治 LASIK 术后感染的基础。本研究采用 LASIK 的方法成功制作角膜细菌性感染的动物模型 18 眼,能够较理想地模拟临床上细菌性角膜炎的发病过程并获得了较高的成功率,建立了一种重复性好、成功率高的动物模型。在本模型制作失败的 2 眼中,均出现角膜瓣移位,其原因可能为泪液在角膜表面的润滑及冲刷作用,不利于金黄色葡萄球菌细胞与角膜细胞的黏附。泪液中所含有的溶菌酶、免疫球蛋白等抗菌成分抑制了细菌的生长^[8]。而 LASIK 术后角膜上皮约 4~8h 即可修复,角膜瓣下的病菌很快被屏蔽在角膜层间, LASIK 术后角膜瓣下接种菌株的模型中,角膜瓣对病菌的庇护作用隔开了所有不利于细菌生长繁殖的因素,使金黄色葡萄球菌迅速定植和表现出临床症状。在临床观察中 LASIK 术后感染率大于 LASEK 也说明这一点。

准分子激光角膜屈光术后感染性角膜炎发病的危险因素主要有围手术期末使用抗生素滴眼液、消毒不严、术中操作过程污染、干眼症伴持续性角膜上皮缺损、存在原发病如糖尿病等易感因素,长期应用糖皮质激素也可导致角膜抗感染能力下降等。除了结膜囊内的细菌感染外,手术过程中的污染,滴眼液的污染,或是皮肤、睑缘、睫毛及空气中存在的微生物等因素均可能导致术后感染。

实验观察到 LASIK 术后感染的病理过程为角膜瓣浅基质层点状或小斑片状炎性浸润,随着时间的推移慢慢融合,并以层间为起点同时向两侧扩展(双向发展),即向前(角膜瓣)和向后(深基质层)发展,但角膜瓣的感染要比深基质层严重。潜伏期约为 16h,出现明显的症状为 21h,进入快速进展期的时间约为 50h。本研究共焦显微镜表现:角膜瓣下浅基质层间少许炎性细胞浸润,仍可见正常角膜上皮细胞及基质细胞;术后第 3d 可见角膜基质大量炎性细胞,角膜上皮细胞仍部分可见,基质细胞基本不可见;可见 1~2 μm 高反光点。术后第 5d 表现为大片高反光区,不能区分角膜组织结构,主要是细菌形态多样化、没有特征性,且细菌体积微小,故在共焦显微镜下不易分辨,仅表现为高亮度反光点。而不同于真菌性角膜炎在早期即可发现菌丝,棘阿米巴性角膜炎发现典型的棘阿米巴包囊,提示共焦显微镜在细菌性角膜炎只能观察病情、病损程度而无法鉴别感染细菌种类,但可以与真菌性角膜炎、弥漫性板层角膜炎及棘阿米巴性角膜炎相鉴别。

本研究建立了 LASIK 术后细菌性角膜炎模型,为今

后 LASIK 术后角膜感染的研究提供了一个快捷、同一性的平台。细菌性角膜炎模型的建立也表明,在角膜瓣下的环境适合金黄色葡萄球菌生长,并能造成严重后果。所以控制 LASIK 术后感染的重点应是预防。对于 LASIK 术前患者的筛选尤为重要,术前患有干眼症、睑缘炎、结膜炎、泪囊炎等眼睑和附属器感染的患者,应尽量在症状缓解及炎症得到控制后再行手术。配戴角膜接触镜、眼部屈光手术史、眼部长期使用皮质类固醇药物等也是高危因素^[9]。LASIK 术前 3d 应用抗生素滴眼液,以及术前充分结膜囊冲洗等,对于预防术后感染性角膜炎是必要且有效的,可以消灭绝大多数致病菌,预防性地降低结膜囊的细菌数量^[10]。术中严格地无菌操作,术后合理用药及严密随访,出现眼部症状时结合临床症状及病原学检测判断感染性质,及时、合理地治疗,真正使 LASIK 手术成为安全、有效、准确、预测性强的治疗屈光不正的手术方法。

参考文献

- 1 Solomon R, Dormenfeld ED, Azar DA, et al. Infectious keratitis after Laser in situ keratomileusis: results an ASCRS survey. *J Cataract Refract Surg* 2003;29 (10):2001-2006
- 2 Solomon A, Karp CL, Miller D, et al. Mycobacterium interface keratitis after laser in situ keratomileusis. *Ophthalmology* 2001; 108 (12):2201-2208
- 3 Freitas D, Avarellga L, sampaio J, et al. An outbreak of Mycobacterium chelonae infection after LASIK. *Ophthalmology* 2003;110(2):276-285
- 4 Challdra NS, Torres MF, Winthrop KL, et al. Cluster of Mycobacterium chelonae keratitis cases following laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2001;132(6):819-830
- 5 李凤鸣. 眼科全书. 北京:人民卫生出版社 1996:461
- 6 李汉森,林汉文,康建华. 正常结膜囊内细菌培养情况调查. *人民军医* 1999;42(10):599-600
- 7 段国平,贺贵云,杨劲松,等. 白内障手术前后结膜囊细菌学分析. *眼科* 2004;13(2):81-82
- 8 杜蕊,吴洁,马吉献,等. 兔烟曲霉菌角膜炎动物模型建立及角膜共焦显微镜检查. *第四军医大学学报* 2006;27(21):1925-1928
- 9 Chung MS, Goldstein MH, Driebe ET, et al. Fungal keratitis after laser in situ keratom ileusis: a case report. *Corne* 2000;19(2):236-237
- 10 庞辰久,孙声桃,宋晓虹,等. 氧氟沙星点眼及结膜囊冲洗预防 LASIK 术后感染作用的探讨. *眼科研究* 2005;23(3):317-318