

应用激光共焦显微镜诊断真菌性角膜炎的临床研究

李 昂, 范忠义

作者单位: (110042) 中国辽宁省沈阳市, 解放军 463 医院眼科
作者简介: 李昂, 女, 中国医科大学硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 眼底病及激光治疗。

通讯作者: 李昂. jimmyli89@hotmail.com

收稿日期: 2013-02-08 修回日期: 2013-05-27

Clinical study of confocal laser microscopy in fungal keratitis

Ang Li, Zhong-Yi Fan

Department of Ophthalmology, No. 463 Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110042, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ang Li. Department of Ophthalmology, No. 463 Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110042, Liaoning Province, China. jimmyli89@hotmail.com

Received: 2013-02-08 Accepted: 2013-05-27

Abstract

• **AIM:** To examine the configuration of fungal keratitis and the detection rate of hypha and spore under confocal laser microscopy and investigate the value of confocal microscopy in the clinical diagnosis of fungal keratitis.

• **METHODS:** We conducted laserconfocal microscopy on 41 patients of 41 eyes diagnosed as fungal keratitis and compared the configuration of different layers of cornea in different stages.

• **RESULTS:** The fungal infected corneas histologically showed disordered layers, edema, infiltration of inflammatory cells, damaged sub-epithelial nerves and disordered stroma with reduced transparence. Hypha showed a specific base on the diagnosis of the disease, but not the only, it may appeared different configuration in different types of fungal keratitis and at different stages of the disease.

• **CONCLUSION:** Confocal laser microscopy is a noninvasive and rapid intuitive technique, and can offer helpful analysis in the early diagnosis, reasonable treatment and prognosis evaluation of fungal keratitis.

• **KEYWORDS:** laser; confocal microscopy; diagnosis; fungal; keratitis

Citation: Li A, Fan ZY. Clinical study of confocal laser microscopy in fungal keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1219-1221

摘要

目的:应用激光共焦显微镜观察真菌性角膜炎患者图像特点及菌丝和孢子检出率,探讨激光共焦显微镜检查在真菌性角膜炎临床诊断中的意义。

方法:对 41 例 41 眼经门诊确诊为真菌性角膜炎的患者行角膜激光共焦显微镜检查,观察不同治疗期真菌性角膜炎患者活体角膜各层图像特点。

结果:共焦显微镜下真菌性角膜炎患者图像有如下特点:(1)病变部位角膜各层形态结构破坏明显;角膜上皮至基质不同程度水肿;炎细胞浸润;神经结构破坏;基质层结构紊乱,透过度降低;(2)真菌菌丝是本病的特异性诊断依据,不同菌种感染在镜下菌丝有不同的影像学特点;(3)不同病变时期和治疗阶段,图像有很大差异,真菌菌丝的检出并不是诊断本病的唯一依据。

结论:激光共焦显微镜检查具有无创、及时等优点,在临床诊断真菌性角膜炎中有重要参考意义,尤其是指导临床早期诊断、合理治疗及评价预后。

关键词:激光;共焦显微镜;诊断;真菌;角膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.45

引用:李昂,范忠义.应用激光共焦显微镜诊断真菌性角膜炎的临床研究.国际眼科杂志 2013;13(6):1219-1221

0 引言

真菌性角膜炎是一种由致病真菌引起的致盲率极高的感染性角膜疾病,由于发展迅速,极易造成角膜穿孔、前房积脓、眼内炎等严重后果^[1],因而危害极重,对本病的早期诊断和治疗显得尤为重要。角膜激光共焦显微镜作为一种新型检查方法,能对活体角膜进行无创、三维空间、实时检查,无需组织切片、固定和染色即能观察角膜各层组织形态结构的变化,敏感性和安全性高,越来越得到临床广泛的认可^[2,3]。我们对 41 例 41 眼真菌性角膜炎患者利用激光共焦显微镜,进行动态活体的角膜病理检查,结合临床分析其图像特征。

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2010-01/2012-12 明确诊断为真菌性角膜炎(排除其它眼疾)的患者 41 例 41 眼,其中男 23 例 23 眼,女 18 例 18 眼,年龄 35~69(平均 38±3.2)岁;其中 19 眼检查前未予抗真菌治疗,其余 22 例均在检查前行药物抗真菌治疗,疗程 3d~2mo。仪器:激光角膜共焦显微镜由德国海德堡公司提供。其主要由海德堡视网膜激光断层扫描系统 II 代(HRT II)和 Rostock 角膜模块组件(RCM)组成。其中激光波长 670nm,观察视野为 380μm×380μm,分辨率为 1μm,可放大倍数为 800。

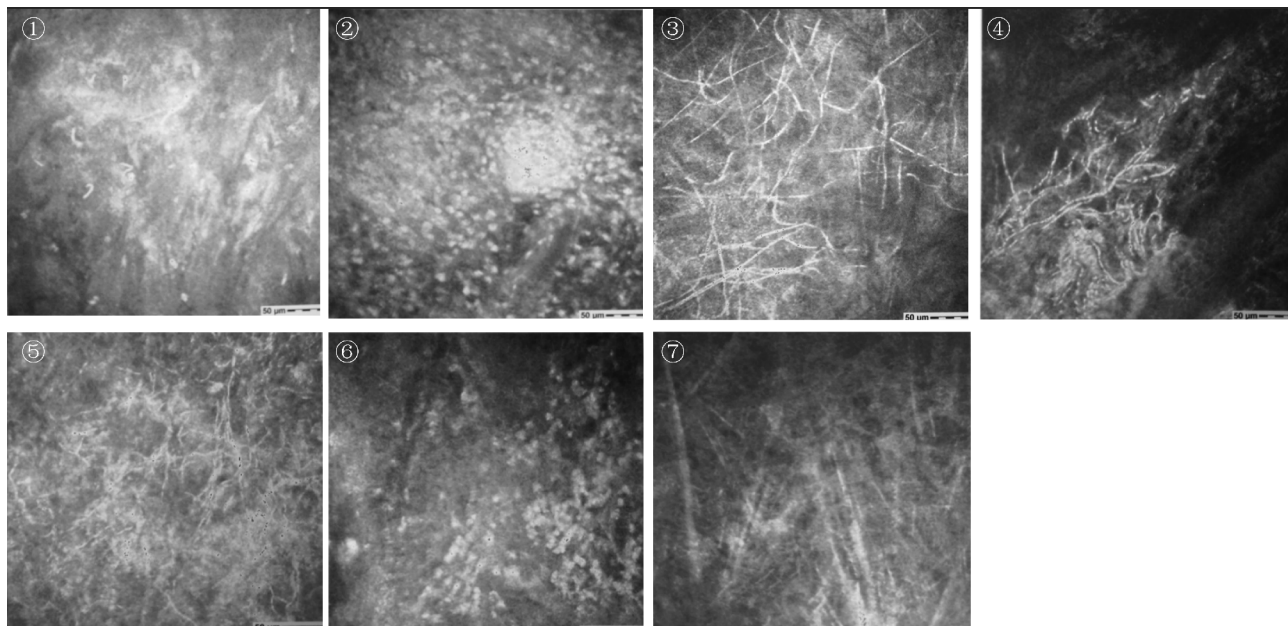


图1 抗真菌治疗20d,角膜刮片真菌培养阳性,镜下见菌丝肿胀减少,仅见少量短小、弯曲的菌丝片段。
图2 肿胀的真菌菌丝。
图3 真菌性角膜炎,可见细长真菌菌丝(活动期),分支较少(镰刀菌丝),孢子较难鉴别。
图4 抗真菌治疗1wk,浅层基质内可见大量真菌菌丝,较细,长度短小而走行弯曲,且可见较多高反光点孢子结构。
图5 经抗真菌治疗1mo,角膜病灶溶解坏死、炎症细胞浸润,成像模糊;无法识别肿胀的菌丝。
图6 经抗真菌治疗1.5mo,角膜病灶溶解坏死,其内可见肿胀的真菌菌丝、炎症细胞浸润。
图7 该患者为白内障术前患者,无真菌感染,长期应用药物在基质中形成了放射状结晶结构。

1.2 方法 受检眼用4g/L奥布卡因表面麻醉2次,仔细清洁显微镜镜头前表面,滴用Vidisc眼凝胶于物镜头表面;将无菌角膜接触帽安装于物镜头上。将受检者下颌和前额分别固定于下颌托和前额托上,并令其平视前方的固视点。调整操纵台高度和CCD摄像头位置,使CCD摄像头的光轴与激光扫描摄像头的光轴垂直。将激光扫描摄像头缓慢前移,直到患者角膜与Rostock角膜接触帽的距离在5~10mm之间,轻移动摄像头,直到角膜接触帽定位在角膜中心;再缓慢将激光扫描摄像头前移,使角膜接触帽轻微接触角膜病灶。当显示器上出现角膜图像时,微调焦距,连续扫描角膜各层的图像,重点连续扫描病变部位及病变周边部位,记录所有受检者是否发现真菌菌丝及其深度,通过显示器选取需要的图像存盘。

统计学分析:率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

真菌性角膜炎病变部位角膜各层形态结构破坏明显,我们观察到有31例患者在激光共焦显微镜下表现为角膜溃疡的改变,即角膜上皮至基质深层破坏,各层结构紊乱,溃疡灶内及周围可见不同程度的炎细胞浸润;神经纤维结构有不同程度的破坏;基质层结构紊乱,严重者溃疡底部组织透过度减低,深层基质及内皮不能窥入。

角膜上皮至基质不同程度水肿:细胞变大,结构较模糊,边界欠清,细胞内由于积液呈液性暗区;表现为不同程度的暗反光结构。

真菌菌丝的特点:强反光的线形结构,可平行或交错,

有分节或分支;直径2~6 μm ,少部分病例菌丝旁可见反光较强的孢子,多呈卵圆形,直径为10~15 μm 。

不同病变时期和治疗阶段,图像有很大差异。真菌活动期:菌丝及孢子排列密集,角膜病灶区组织结构破坏严重;经抗真菌治疗后,菌丝逐渐被大量炎细胞浸润,角膜基质层发生凝固性坏死,胶原纤维肿胀;菌丝减少或仅存残余片段(图1);恢复期可见肿胀的真菌菌丝(图2)。

未经抗真菌治疗组阳性率较高;19例19眼检查前未予抗真菌治疗患者中有18例18眼检出真菌菌丝和孢子,阳性率为95%;用药的22例22眼检查前已行抗真菌治疗患者中有13例13眼检出真菌菌丝和孢子,阳性率为59%;统计学分析表明两者差异有统计学意义(采用 χ^2 检验, $P<0.05$)。

3 讨论

大多数学者认为真菌是一种条件致病菌,只有在角膜上皮损伤或局部免疫力低下时,才会引起机会感染。目前真菌性角膜炎的诊断仍以观察到菌丝和/或孢子为依据^[4];典型的真菌菌丝呈强反光的线形结构,可平行或交错,有分节或分支。由于各种条件的限制,临床上无法对病变的整个过程进行动态研究和观察。研究表明,不同菌种感染所致的真菌性角膜炎,在镜下菌丝有不同的影像学特点,且同一菌种不同时期菌丝形态也有较大差异^[5]:如镰刀菌属菌丝呈斜行交叉分布,粗细均匀一致,长而直,分支极少;而曲霉菌属多短小,直径较细,走行弯曲,呈小虫状(图3,4)。一般曲霉菌的孢子呈高反光点,较易鉴别,而镰刀菌的孢子较难鉴别,需高放大倍率综合加以识别。

结合本组病例我们看到,真菌性角膜炎的临床特征与其生长方式关系密切,镜下观察结果也各不相同,大致可分为以下几种形式:(1)水平生长型,表层地毯式覆盖,中间为炎性坏死组织,并无真菌菌丝长入,内层为正常角膜组织。临床表现为角膜表层的病灶,面积较大,病程较慢,角膜基质水肿轻,角膜表层易找到真菌菌丝;(2)垂直和斜行生长:菌丝只在病灶处垂直和水平扩散,病灶周边组织炎细胞浸润;离病灶越远,角膜越接近正常;(3)严重者,全层可见真菌菌丝,菌丝垂直嵌在组织间,呈杂乱生长,有的伸入到后弹力层,炎症严重处为凝固性坏死,炎症反应轻处为炎症组织与正常组织相间。临床表现为炎症反应明显,病灶范围广,常为全角膜炎性反应,病程短,伴前房积脓。

通过观察,我们认为尽管共焦显微镜检查具有安全无创、早期检查阳性率高、可重复性高、能及时判断病情、评价疗效及预后等诸多优点,但应注意到以下问题:(1)检查前一定要结合病史、病程、专科检查及用药治疗等情况综合加以判定;真菌菌丝或孢子并非本病诊断的唯一依据;如我们在检查中发现:未经抗真菌治疗的病例较经过治疗的病例菌丝阳性率高,占95%,而经过抗真菌治疗的病例阳性率仅占59%;有2例未用药前发现菌丝,经抗真菌治疗后,转为阴性;1例虽经真菌培养确诊,但经多次复查,仍未找到菌丝,考虑原因:真菌浸润至角膜基质,坏死组织较重,影响成像质量,造成病灶处图像模糊,无法观察到菌丝(图5,6);(2)尽管通过上述影像学特点可以在共焦显微镜下区分常见的感染真菌菌属,但由于经过临床治疗后菌丝形态会发生很大变化,因此必须结合角膜刮片、真菌培养等实验室检查方法,以进一步完善鉴别诊断和治

疗;(3)注意真伪菌丝的鉴别:长期应用降压药物而在基质中形成的放射状结晶结构、神经纤维结构都与菌丝相似;初学者很难鉴别,需结合病史或观察细微结构、形态及分布特点、周围炎细胞数量等仔细区别;通常药物结晶反光强,两端呈放射状(图7);神经纤维反光低于菌丝,多呈“Y”或倒“Y”形分支,垂直走行,直径较粗,周围少见炎细胞^[6];(4)如何有效提高分辨率的问题:患者配合程度、操作者经验与熟练程度、角膜干燥程度等均对图像质量有很大影响,因此,必须通过充分麻醉,提高患者配合程度、根据病情需要滴用人工泪液、及时调整亮度、选择病灶中心及多个观察点等提高检查的准确性。

总之,激光角膜共焦显微镜检查为真菌性角膜炎的早期诊断、病情疗效判断及预后提供了较客观的依据,相信随着临床应用的不断普及和研究的不断深入,必将成为更准确的活体生物检查技术。

参考文献

- 1 刘昭升,谢素贞,闫蕾,等. 福建地区真菌性角膜炎的流行病学研究. 国际眼科杂志 2009;9(5):976-977
- 2 Cavanagh HD, Petroll WV, Alizadeh H, et al. Clinical and diagnostic use of *in vivo* confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 1993; 100:1444
- 3 李文娟,黄振平,李仲群,等. 激光共焦显微镜观察兔眼角膜缘干细胞缺乏羊膜移植后的形态. 国际眼科杂志 2007;7(3):671-674
- 4 谢立信,李绍伟,史伟云,等. 共焦显微镜在真菌性角膜炎临床诊断中的应用. 中华眼科杂志 1999;1:321-325
- 5 张伟宏,王丽娅,韩雪,等. 腐皮镰刀菌和黄曲霉菌感染小鼠角膜的共焦显微镜研究. 广东医学 2009;30(6):863-866
- 6 潘飞,张蓓,姚玉峰,等. 共焦显微镜在临床诊断真菌性角膜炎的应用. 中国实用眼科杂志 2004;22(1):23-25