

共聚焦显微镜在真菌性角膜炎诊治中的临床应用

蓝倩倩, 陈琦, 陈丽妃, 沈朝兰, 黄慧, 曾思明

引用: 蓝倩倩, 陈琦, 陈丽妃, 等. 共聚焦显微镜在真菌性角膜炎诊治中的临床应用. 国际眼科杂志 2019;19(3):523-526

Received:2018-11-17 Accepted:2019-01-18

基金项目: 广西壮族自治区卫健委自筹经费科研项目(No. Z2016623)

作者单位: (530021) 中国广西壮族自治区南宁市, 广西壮族自治区人民医院眼科

作者简介: 蓝倩倩, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 曾思明, 主任医师, 常务副主任, 研究方向: 眼前节疾病、斜弱视. gxeeye@126.com

收稿日期: 2018-11-17 修回日期: 2019-01-18

摘要

目的: 评价共聚焦显微镜联合角膜刮片在真菌性角膜炎中的临床应用。

方法: 对我院临床诊断为真菌性角膜炎的患者 56 例 56 眼行共聚焦显微镜检查和角膜刮片检查, 包括涂片后显微镜下检查和真菌培养, 并进行药物或联合手术治疗, 统计诊断的阳性率和治疗预后。

结果: 入院时共聚焦显微镜诊断阳性率为 91%, 角膜刮片病原学检测诊断阳性率为 54%, 共聚焦显微镜和角膜刮片联合诊断阳性率为 95%。治疗后, 单纯药物治疗达到临床治愈者 44 眼 (79%), 单纯药物治疗无法控制感染需要进行手术治疗者 12 眼 (21%)。

结论: 共聚焦显微镜具有非侵入性、快速、重复性好等特点, 联合角膜刮片实验室检查可以提高真菌性角膜炎的诊断阳性率, 更好地指导治疗。

关键词: 共聚焦显微镜; 角膜刮片; 真菌性角膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.3.44

Clinical application of confocal microscopy in the diagnosis and treatment of fungal keratitis

Qian-Qian Lan, Qi Chen, Li-Fei Chen, Chao-Lan Shen, Hui Huang, Si-Ming Zeng

Foundation item: Self-Financing Research Projects of the Guangxi Zhuang Autonomous Region Health Commission (No.Z2016623) Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Si-Ming Zeng. Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. gxeeye@126.com

Abstract

• **AIM:** To assess the clinical application of confocal microscopy combined with corneal scraping in the diagnosis and treatment of fungal keratitis.

• **METHODS:** Totally 56 eyes of 56 patients with fungal keratitis from our hospital were included. All patients underwent confocal microscopy and cornea scraping for smear microscopy and fungal culture. The diagnostic yield was analyzed.

• **RESULTS:** The positive diagnostic rates of confocal microscopy and cornea scraping were 91% and 54% respectively, whereas in combination the positive diagnostic rate increased to 95%. 44 eyes (79%) were clinically cured with drugs alone while 12 eyes (21%) also required surgery.

• **CONCLUSION:** Confocal microscopy examination is non-invasive, with rapid detection and strong repeatability. When combined with corneal scraping it can be used to improve diagnostic yield and guide clinical therapy.

• **KEYWORDS:** confocal microscopy; corneal scraping; fungal keratitis

Citation: Lan QQ, Chen Q, Chen LF, *et al.* Clinical application of confocal microscopy in the diagnosis and treatment of fungal keratitis. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(3):523-526

0 引言

在我国, 真菌性角膜炎患病率占感染性角膜炎的 51%~70%^[1-2], 如未及时诊治易导致角膜穿孔、眼内炎等严重后果, 早期、快速、明确的诊断有利于准确地治疗。真菌性角膜炎的常见实验室病原学检查有角膜刮片后涂片在显微镜下检查和真菌培养, 涂片简单、快速, 能粗筛病原体, 培养则是金标准, 但角膜病灶取材量少, 阳性率往往不高, 而共聚焦显微镜可以在细胞水平上对角膜进行非侵犯性、动态、活体的观察^[3-4]。近年来, 在检查真菌性角膜炎的病原、病灶的范围深度、疾病的发展阶段和治疗效果等方面取得了一定的研究成果^[5-6]。本研究旨在比较共聚焦显微镜和角膜刮片的实验室检查在诊断真菌性角膜炎中的阳性率, 以及两种方法互相补充的临床应用。

1 对象和方法

1.1 对象 回顾 2015-02/2017-10 在我院眼科就诊的真菌性角膜炎患者 56 例 56 眼, 其中男 31 眼, 女 25 眼, 年龄 42~83(平均 64.48±13.34) 岁。本研究经医院伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。真菌性角膜炎的诊断

表1 我院初诊时的各组病史特点

指标	病原(+)	病原(-)	病原(+)	病原(-)
	共焦(+)	共焦(+)	共焦(-)	共焦(-)
眼数	28	23	2	3
发病时间($\bar{x}\pm s, d$)	8.9±1.2	11.2±7.5	24.0±8.5	20.3±4.1
外伤史(眼,%)	24(86)	20(87)	2(100)	3(100)
用过抗真菌药(眼,%)	11(39)	16(70)	1(50)	3(100)
曾行角膜刮片检查(眼,%)	8(29)	12(52)	2(100)	2(67)

表2 各治疗方案和预后统计

指标	病原(+)	病原(-)	病原(+)	病原(-)
	共焦(+)	共焦(+)	共焦(-)	共焦(-)
眼数	28	23	2	3
药物治疗至临床治愈(眼,%)	22(79)	19(83)	1(50)	2(67)
药物联合手术至临床治愈(眼,%)				
结膜瓣遮盖术	3(11)	3(13)	1(50)	0
角膜移植术	2(7)	1(4)	0	0
眼球摘除术	1(4)	0	0	1(33)

标准:结合病史及症状体征,并符合以下4项中的1项:(1)角膜刮片涂片在光学显微镜下发现菌丝或孢子;(2)真菌培养阳性;(3)共聚焦显微镜检查见真菌菌丝或孢子;(4)具有典型的真菌性角膜炎的临床表现,且抗真菌药物治疗有效。排除标准:初诊时合并角膜开放性伤口无法接受共聚焦显微镜检查者,实验室检查有细菌感染或棘阿米巴感染者,共聚焦显微镜检查发现有明确棘阿米巴原虫者,不遵医嘱治疗或随访者,患者因药物过敏或肝肾功能不全等原因无法接受药物治疗者。

1.2 方法

1.2.1 初诊时诊疗步骤

1.2.1.1 临床表现 详细询问病史,用裂隙灯显微镜检查并拍摄眼前段相片,记录病灶浸润面积、位置、深度以及内皮、前房积脓情况等。

1.2.1.2 共聚焦显微镜检查 由具有2a以上共聚焦显微镜检查经验的眼科医师操作。操作步骤:患眼滴用盐酸奥布卡因滴眼液进行表面麻醉后,将氧氟沙星眼膏滴于物镜头表面,嘱患者注视固视灯,调整物镜位置使激光光束位于病变区,前移物镜头与角膜轻微接触,扫描角膜各层见真菌菌丝或孢子记为“共焦(+)”,真菌菌丝和孢子均未检出记为“共焦(-)”。

1.2.1.3 角膜刮片实验室病原学检查 患眼滴用盐酸奥布卡因滴眼液进行表面麻醉,患者取平卧位,采用一次性手术圆头刀片对角膜病灶进行刮片,涂于载玻片和血培养皿、马铃薯培养皿中,送至医院检验科进行显微镜下涂片检查和培养及药敏试验。涂片或培养检出真菌者可记录为“病原(+)”,涂片和培养均未检出真菌者记录为“病原(-)”。

1.2.2 治疗方法

1.2.2.1 药物治疗 就诊当天立刻启动抗真菌治疗,有药敏结果者依据药敏结果选择,无药敏结果根据经验选择药物,局部或联合全身用药,每个患者根据病情严重程度和进展阶段、自身情况选择不同的药物种类及用法用量,每次随访根据病情判断药物治疗效果并调整用药,用共聚焦

显微镜监测病情变化,感染控制后逐步停药。

1.2.2.2 手术治疗 如药物治疗仍无法控制感染,则采用药物联合手术治疗,根据病情选择不同手术方式,如结膜瓣遮盖术、角膜移植术、眼球摘除术等。术中感染角膜组织送实验室行病原学检查。

1.2.3 随访 根据每例患者病情严重程度决定随访频率,至感染控制停药后再随访3mo,每次随访时行裂隙灯眼前段照相和共聚焦显微镜检查。记录治疗方案和预后:单纯药物治疗临床治愈、药物联合手术治疗临床治愈。如为药物联合手术治疗,记录其具体手术方式,是否为眼球摘除术,并记录术后感染是否得到控制。

1.2.4 临床治愈标准 患者自觉畏光、疼痛、流泪等症状消失,结膜无充血,角膜上皮愈合,荧光素无染色,角膜浸润灶消失,基质无水肿,内皮无Kp,前房反应和积脓消失,角膜遗留不同程度的斑翳,共聚焦显微镜未见炎症和病原表现;停药后随访3mo仍未见复发。

统计学分析:用SPSS 19.0软件包进行统计学分析,计数资料以眼(%)表示,组间比较行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

所有患者入院时,共聚焦显微镜诊断阳性者51眼(91%),角膜刮片病原学检测诊断阳性者30眼(54%),差异有统计学意义($\chi^2 = 19.670, P < 0.05$),共聚焦显微镜和角膜刮片两者任意之一为(+)者53眼,两者联合诊断阳性率为95%。根据共聚焦显微镜和角膜刮片检查的结果分为四组,分别为“病原(+)共焦(+)”,“病原(-)共焦(+)”,“病原(+)共焦(-)”,“病原(-)共焦(-)”,各组至我院初诊时的病史特点见表1。所有患者中,单纯药物治疗达到临床治愈者44眼(79%),单纯药物治疗无法控制感染需要进行手术治疗者12眼(21%),其中接受结膜瓣遮盖术者7眼(13%),接受角膜移植术者3眼(5%),接受结膜瓣遮盖术或角膜移植术的患者均达到临床治愈标准;另外2眼(4%)因感染严重接受眼球摘除术,所有患者术后感染得到控制,各组治疗方法和预后见表2。

3 讨论

共聚焦显微镜的准确诊断依赖于检查者丰富的经验和技巧水准,在真菌性角膜炎中,共聚焦显微镜可观察到典型的真菌菌丝和孢子^[7-8]。谢立信等^[9]对 32 例确诊为真菌性角膜炎的患者行共聚焦显微镜,其中有 31 例可见真菌,共聚焦显微镜确诊率为 96.9%。美国眼科学会于 2004 年分析了 51 项相关研究表明,共聚焦显微镜是真菌性角膜炎的重要辅助诊断工具,其中一篇研究中提到共聚焦显微镜对真菌有 96.6% 的检出率^[10]。2007 年 Kanavi 等^[11]对 16 例真菌性角膜炎患者进行共聚焦显微镜检查,灵敏性为 94%,特异性为 78%,而用于评价结果的角膜涂片和真菌培养虽是诊断的金标准,不具有 100% 的特异性和灵敏性,因此存在不可忽视的假阳性和假阴性率。2011 年 Vaddavalli 等^[12]对实验室病原学检查确诊的棘阿米巴或真菌性角膜炎患者 103 例行共聚焦显微镜检查,其敏感性为 88.3%,特异性为 91.1%。Kheirka 等^[13]研究中,有经验的检查者用共聚焦显微镜在丝状真菌角膜炎中诊断的敏感性和特异性为 (71.4±0)% 和 (89.6±3.0)%。张红敏等^[14]研究揭示,93 例真菌性角膜炎中共聚焦显微镜检查诊断阳性率为 82.07%,真菌培养诊断阳性率为 43.20%。李昂等^[15]研究表明,抗真菌治疗后共聚焦显微镜诊断阳性率有所下降,降低到 59%。

本研究中,对临床诊断为真菌性角膜炎患者,共聚焦显微镜诊断阳性率为 91%,角膜刮片病原学检测诊断阳性率为 54%,两者联合诊断阳性率上升为 95%。聚焦显微镜诊断阳性率远大于角膜刮片病原学检测,是一种快捷、有效的诊断手段,而两种检查方法联合应用可以进一步提高诊断的阳性率。

我院初诊时,发病时间长、在外院使用过抗真菌药或外院行角膜刮片检查均会影响共聚焦显微镜和病原学检查的阳性率。因为这类患者病情往往比较严重,可能已经辗转过几家医院,在外院治疗效果不佳才转至我院进一步诊治,加上多种药物毒性等因素混杂,导致初诊时裂隙灯下临床表现不典型,辅助检查阳性率不高。

本研究中,角膜刮片病原学检查阳性而共聚焦显微镜阴性的 2 眼患者中,有 1 眼我院首诊时已有近 1mo 的病程,角膜水肿明显,溃疡表面坏死组织过多,角膜内皮和前房可见团块状病灶,共聚焦显微镜光线穿透力有限,未能穿透混浊的坏死组织探查至角膜深层和内皮面的病原体;另 1 眼角膜刮片见孢子未见菌丝,提示为酵母菌感染,当孢子形态不典型、量少及炎症细胞量多时,共聚焦显微镜对酵母菌的诊断难度提高,需要依赖检查者丰富的经验。此外,Shah 等^[16]和 Sago 等^[17]分别报道了微孢子真菌性角膜炎,微孢子的大小约 1~2 μm ,共聚焦显微镜不容易被分辨出,因此漏诊率高。有 3 眼患者检查“病原(-)共焦(-)”,但抗真菌治疗有效,临床诊断为真菌性角膜炎。其中 1 眼是在外院接受的角膜刮片,可能是角膜刮片导致菌丝遭到破坏、断裂致形态不典型和数量减少,影响了共聚焦显微镜对病原体形态的观察,此提示在临床上应先行共聚焦显微镜检查再行角膜刮片检查,以免影响共聚焦显微

镜对病原体的观察;第 2 眼是在外院已经接受过抗真菌治疗,推测病原体得到一定程度的控制,因此实验室检查和共聚焦显微镜都是阴性;第 3 眼有植物外伤史,角膜有微小穿通伤,虽就诊时伤口已闭合,但真菌除了感染角膜还透过角膜伤口穿透到前房,引起眼内炎,行眼球摘除后在眼球组织里培养到真菌,由于病灶主要聚集在角膜深基质层、角膜内皮面,术前角膜浅基质层刮片未找到病原体,角膜基质水肿和伤口周围的坏死组织也影响了共聚焦显微镜光线的穿透力。

本研究对药物治疗无法有效控制感染的患者行手术治疗,手术方式有结膜瓣遮盖术、羊膜移植术、角膜移植术、眼球摘除术,所有患者在手术后感染得到了控制,未见真菌感染蔓延至眼眶组织及全身,其中有 2 眼接受了破坏性的眼球摘除术,1 眼初诊时发病 25d,在外院有激素使用史,我院检查“共焦(+)病原(+)”,初诊时病情重,全角膜感染合并眼内炎,考虑真菌直接穿透角膜进入眼内引起眼内炎;另 1 眼初诊时“共焦(-)病原(-)”。

角膜刮片的实验室病原检查方法是传统的检查方法,可以准确地检出病原体并且能去除部分病原和组织坏死物,显微镜下涂片检查是快速而便捷的方法,培养则是金标准,但受取材限制阳性率低,而且培养的时间长,不利于及时地诊治,做为侵犯性检查手段也不适合反复检查以监测病情变化。共聚焦显微镜在活体水平快速无创地探查真菌病原体,以早期确诊启动抗真菌药物治疗,此外还能准确地探查病灶的深度,客观评估预后,另可方便无创地动态监测病情变化,可监测角膜中菌丝的数量、密度和深度变化。本研究中,根据共聚焦显微镜判断病情严重程度和病情变化趋势,为治疗方案的制定和调整、药物使用的种类和频率、手术方式和时机的选择、停药时机提供了客观有利的依据。但共聚焦显微镜检查也有其局限性,例如依赖检查者的技能水准不易普及至基层医院;对被检查者的配合程度要求较高;难以始终检测同一区域,不利于精确对比不同时间点的细微变化;角膜的透明性会影响激光穿透力;对于一些不典型的图形特征的不恰当解读会造成一定的假阴性率和假阳性率等。

共聚焦显微镜和角膜刮片的实验室检查各有优缺点,但联合使用可以互相补充,我们建议每个临床拟诊为真菌性角膜炎患者在首诊时启动药物治疗之前,都应该同时采用两种方法联合检查,以提高病原学检查的阳性率,提高诊断的准确性,更好地指导治疗,而在随访过程中,则可以使用共聚焦显微镜监测病情变化。共聚焦显微镜虽然还不能替代真菌培养成为诊断的金标准,但是其高敏感性、无创性、可重复性、快捷性为真菌性角膜炎等临床诊断及治疗提供了有利工具,具有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 谢立信. 我国角膜基础和临床研究的现状及发展. 中华眼科杂志 2010;46(10):883-887
- 2 Foster CS(编),李莹(译). 角膜理论基础与临床实践. 天津:天津科技翻译出版公司 2007;403-404
- 3 Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. *In vivo* laser confocal

- microscopy findings in patients with map-dot-fingerprint (epithelial basement membrane) dystrophy. *Clin Ophthalmol* 2012;6:1187
- 4 Wakamatsu TH, Sato EA, Matsumoto Y. Conjunctival *in vivo* confocal scanning laser microscopy in patients with Sjögren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(1):144
- 5 Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, *et al.* Normal human corneal cell population evaluated by *in vivo* scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998;17(5):485-492
- 6 黎明, 林跃生, 姚晓明, 等. 人体角膜内皮细胞的共焦显微镜研究. *中国实用眼科杂志* 2007;25(5):479-482
- 7 赵家良. 眼科疾病临床诊疗规范教程. 北京:北京大学医学出版社 2007:95
- 8 Kumar RL, Cruzat A, Hamrah P. Current state of *in vivo* confocal microscopy in management of microbial keratitis. *Semin Ophthalmol* 2010;25(5-6):166-170
- 9 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;35(1):7-9
- 10 Kaufman SC, Musch DC, Belin MW, *et al.* Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2004;111(2):396-406
- 11 Kanavi MR, Javadi M, Yazdani S, *et al.* Sensitivity and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis. *Cornea* 2007;26(7):782-786
- 12 Vaddavalli PK, Garg P, Shamm S, *et al.* Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2011;118(1):29-35
- 13 Kheirikhah A, Syed ZA, Satitpitakul V, *et al.* Sensitivity and specificity of laser-scanning *in vivo* confocal microscopy for filamentous fungal keratitis: role of observer experience. *Am J Ophthalmol* 2017;179(7):81-89
- 14 张红敏, 窦新岩, 杨柯, 等. 激光扫描共焦显微镜结合裂隙灯显微镜检查对真菌培养阴性的常见丝状真菌性角膜炎诊断的可行性. *中华实验眼科杂志* 2018;36(2):119-123
- 15 李昂, 范忠义. 应用激光共聚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
- 16 Shah GK, Pfister D, Probst LE, *et al.* Diagnosis of microsporidial keratitis by confocal microscopy and the chromatrope stain. *Am J Ophthalmol* 1996;121(1):89-91
- 17 Sagoo MS, Mehta JS, Hau S, *et al.* Microsporidium stromal keratitis: *in vivo* confocal findings. *Cornea* 2007;26(7):870-873