

# 荧光染色法对组织病理诊断棘阿米巴性角膜炎价值的研究

杜满<sup>1,2</sup>, 亓晓琳<sup>1,2</sup>, 刘廷<sup>2,3</sup>, 鹿秀海<sup>1,2</sup>

引用:杜满,亓晓琳,刘廷,等. 荧光染色法对组织病理诊断棘阿米巴性角膜炎价值的研究. 国际眼科杂志 2021; 21(11): 1922-1926

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81900907)

作者单位:<sup>1</sup>(250021)中国山东省济南市,山东第一医科大学附属眼科医院;<sup>2</sup>(266071)中国山东省青岛市,山东第一医科大学(山东省医学科学院)山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地;<sup>3</sup>(266071)中国山东省青岛市,山东第一医科大学附属青岛眼科医院

作者简介:杜满,毕业于山东省医学科学院,硕士,主治医师,病理科副主任,研究方向:眼科病理。

通讯作者:鹿秀海,毕业于大连医科大学,硕士,副主任技师,检验科主任,研究方向:眼部感染病原微生物的形态特征及致病机制. xiuhailu@163.com

收稿日期:2021-04-14 修回日期:2021-09-24

## 摘要

目的:将荧光染色技术应用于组织病理诊断棘阿米巴性角膜炎(AK),并将阅片结果与HE染色和PAS染色的阅片结果进行比较,分析这3种染色方法的敏感性与特异性,探究荧光染色技术在角膜组织活检中检测阿米巴病原体的应用价值。

方法:回顾性研究。收集2015-05/2020-06于山东第一医科大学附属眼科医院就诊的感染性角膜炎患者的手术切除标本74例75眼。根据角膜刮片、培养和组织病理诊断结果,将感染性角膜标本分为AK组和非棘阿米巴性角膜炎(NAK)组。将连续切片的组织分别行HE染色、PAS染色和荧光染色,分析3种染色方法对AK诊断的敏感性与特异性,使用受试者工作特征(ROC)曲线计算曲线下面积(AUC),并进一步分析在同一部位相同倍率视野下,计数三种染色方法找到棘阿米巴病原体的数量,明确荧光染色法对AK的诊断价值。

结果:HE染色的敏感性为69%(27/39)、特异性为92%,PAS染色的敏感性为62%(24/39)、特异性为97%,荧光染色的敏感性为95%(37/39)、特异性为97%,3种染色方法对AK诊断的敏感性存在差异( $\chi^2 = 19.857, P < 0.001$ );进行两两比较发现,HE染色、PAS染色与荧光染色诊断AK的敏感性有差异( $P = 0.003, < 0.001$ ),HE染色与PAS染色诊断AK的敏感性没有差异( $P = 0.978$ );AUC最大为荧光染色(0.960),其次分别为HE染色(0.804),PAS染色(0.794)。计数在同一部位相同倍率视野下,HE染色、PAS染色和荧光染色查见棘阿米巴包囊数量的中位数分别为4(0, 11)、2(0, 9)、12(3, 33)个( $\chi^2 = 56.561, P < 0.001$ );进行两两比较发现,HE染色和荧光染色、PAS染色和荧光染色找到棘阿米巴包囊的数量有差异( $P < 0.001$ ),HE和PAS两种染色方法找到棘阿米巴包囊的数

量没有差异( $P = 0.210$ ),荧光染色的组织病理切片更容易辨别阿米巴病原体。

结论:荧光染色技术应用于组织病理诊断AK的敏感性比HE染色和PAS染色高,可显著提高阿米巴病原体检测的阳性率。

关键词:荧光染色;苏木素-伊红染色;过碘酸希夫染色;棘阿米巴性角膜炎;组织病理,诊断

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.11.18

## Value of fluorescence staining in histopathological diagnosis of Acanthamoeba keratitis

Man Du<sup>1,2</sup>, Xiao-Lin Qi<sup>1,2</sup>, Ting Liu<sup>2,3</sup>, Xiu-Hai Lu<sup>1,2</sup>

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81900907)

<sup>1</sup>Eye Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong Province, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao 266071, Shandong Province, China; <sup>3</sup>Qingdao Eye Hospital of Shandong First Medical University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiu-Hai Lu. Eye Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong Province, China; State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao 266071, Shandong Province, China. xiuhailu@163.com

Received:2021-04-14 Accepted:2021-09-24

## Abstract

• AIM: To investigate the application value of fluorescent staining technique in the detection of amoebic pathogens in corneal tissue biopsy, and to apply fluorescent staining technique in the histopathological diagnosis of Acanthamoeba keratitis (AK), comparing the results with those of hematoxylin-eosin staining (HE staining) and periodic acid-schiff staining (PAS staining), and analyzing the sensitivity and specificity of these three staining methods.

• METHODS: Specimens of infected corneal tissue were collected from 74 cases (75 eyes), and then they were divided into an AK group and a non-Acanthamoeba keratitis (NAK) group based on the results of corneal

scraping, culture and histopathological diagnosis. The tissues of consecutive sections were stained with HE staining, PAS staining and fluorescence respectively, and the sensitivity and specificity of the three staining methods for the diagnosis of AK were analyzed. Area under the curve (AUC) was calculated using the receiver operating characteristic (ROC) curve. Further analysis was performed to count the number of Acanthamoeba pathogens found by the three staining methods under the same magnification field of view at the same site, and to clarify the diagnostic value of fluorescent staining technique for AK.

• **RESULTS:** The sensitivity of HE staining was 69% (27/39) with a specificity of 92%; the sensitivity of PAS staining was 62% (24/39) with a specificity of 97%, and the sensitivity of fluorescent staining was 95% (37/39) with a specificity of 97%. There were differences in the sensitivity of the three staining methods for the diagnosis of AK ( $\chi^2 = 19.857$ ,  $P < 0.001$ ), and pairwise comparison revealed that the differences between HE staining and fluorescent staining, PAS staining and fluorescent staining for the diagnosis of AK were statistically significant ( $P = 0.003$ ,  $< 0.001$ ), while the difference in sensitivity between HE staining and PAS staining for the diagnosis of AK was not statistically significant ( $P = 0.978$ ). The maximum AUC was 0.960 for fluorescence staining, followed by 0.804 for HE staining and 0.794 for PAS staining, respectively. The median number of amoeba cysts detected by HE staining, PAS staining and fluorescent staining at the same site under the same magnification field of view was 4 (0, 11), 2 (0, 9) and 12 (3, 33), respectively ( $\chi^2 = 56.561$ ,  $P < 0.001$ ). Pairwise comparison revealed that the differences in the number of amoeba cysts found by HE staining and fluorescence staining, PAS staining and fluorescence staining were statistically significant ( $P < 0.001$ ), while the difference in the number of amoeba cysts found by HE staining and PAS staining was not statistically significant ( $P = 0.210$ ). Fluorescently stained histopathological sections make it easier to identify amoebic pathogens.

• **CONCLUSION:** Fluorescent staining technique is more sensitive to histopathological diagnosis of AK than HE staining and PAS staining, which can significantly improve the positive rate of detection of amoebic pathogens.

• **KEYWORDS:** fluorescent staining; hematoxylin - eosin staining; periodic acid - Schiff staining; Acanthamoeba keratitis; histopathology; diagnosis

**Citation:** Du M, Qi XL, Liu T, *et al.* Value of fluorescence staining in histopathological diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(11):1922-1926

## 0 引言

棘阿米巴性角膜炎 (acanthamoeba keratitis, AK) 是一种少见的眼部感染, 1970 年代由 Naginton 等<sup>[1]</sup> 和 Jones 等<sup>[2]</sup> 分别报道, 我国 1992 年首次报道了由棘阿米巴感染引起的角膜炎<sup>[3]</sup>。国外报道 AK 与配戴被污染的角膜接触镜密切相关, 其次是植物及昆虫外伤。我国是农业大

国, AK 以农民居多, 主要与外伤和用污染的水洗眼有关。目前 AK 组织病理学检查主要应用的染色方法为苏木素-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE staining) 和过碘酸希夫染色 (periodic acid-schiff staining, PAS staining), 两种染色方法可将棘阿米巴包囊染成红色或紫红色, 从而进行诊断。但是在日常工作中发现, 严重感染的角膜组织, 其组织溶解坏死严重, 并伴有大量的炎症细胞浸润, 棘阿米巴包囊不易被识别, 另外, 送检角膜组织中棘阿米巴含量较少时也特别容易漏诊。

前期研究荧光染色对真菌性角膜炎诊断效果<sup>[4]</sup> 时发现, 荧光染色液对棘阿米巴包囊同样有很好的显色效果, 棘阿米巴包囊和真菌细胞壁一样, 也含有纤维素、几丁质和其他含  $\beta$ -1,4-糖苷键的碳水化合物。荧光染色液与这些物质结合后, 在紫外激发光 (UA 滤镜) 下棘阿米巴包囊呈亮绿色荧光, 角膜基质纤维呈蓝色, 背景呈黑色, 棘阿米巴包囊的形态特征清晰可辨。目前国内尚未将这种检查方法应用到组织病理诊断 AK, 本研究对手术切除的感染性角膜炎标本分别行 HE 染色、PAS 染色和荧光染色, 比较 3 种染色方法对 AK 的诊断效率。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 回顾性研究。收集 2015-05/2020-06 于山东第一医科大学附属眼科医院就诊的感染性角膜炎患者的手术切除标本 74 例 75 眼。根据角膜刮片、体外培养和组织病理诊断结果, 将感染性角膜炎分为 AK 组和非棘阿米巴性角膜炎 (non-acanthamoeba keratitis, NAK) 组。纳入标准: (1) 感染性角膜炎患者经角膜刮片、组织培养或病理检查明确诊断为 AK、真菌性角膜炎或细菌性角膜炎; (2) 手术切除的角膜组织均送病理检查; (3) 所有患者均知情同意。排除标准: (1) 未明确诊断的感染性角膜炎; (2) 病毒性角膜炎患者; (3) 送检组织标本太小, 无法完成病理检查者。本研究经山东省眼科医院伦理委员会审核批准 (No.SDSYKYY-2016012), 所有患者均签署知情同意书。

**1.2 方法** 将手术切除的角膜组织立即用 10% 中性福尔马林充分固定, 取材后将角膜组织用乙醇梯度脱水, 二甲苯透明和浸蜡, 石蜡切片机行 4 $\mu$ m 厚切片, 切片经二甲苯充分脱蜡后流水冲洗。分别行 HE、PAS 和荧光染色。

**1.2.1 HE 染色** 苏木素染色 10min, 盐酸酒精分化 2s, 自来水洗返蓝, 伊红染色 5min, 流水稍洗, 脱水, 透明, 封固。

**1.2.2 PAS 染色** 滴加过碘酸染液充分覆盖组织染色 10min、水洗, 希夫氏染液避光染色 20min, 倾去染液, 直接滴加偏重亚硫酸钠 1min $\times$ 2 次, 流水冲洗 10min, 苏木素淡染, 脱水, 透明, 封固。

**1.2.3 荧光染色** 将荧光染色液直接滴加 12 滴到载玻片上, 使染液充分覆盖组织, 持续染色 1min, 将盖玻片水平放置于载玻片上以减少气泡产生, 滤纸吸去多余染液。

**1.2.4 查找病原体** 将染色完成的病理切片分别置于普通光学显微镜和荧光显微镜下查找病原体, 阅片工作由一名主治医师和一名副主任医师分别独立完成, 当两人诊断结果出现分歧时, 以两人再次共同阅片达成的一致结果为准。统计分析 3 种染色方法检查阿米巴病原体的敏感性



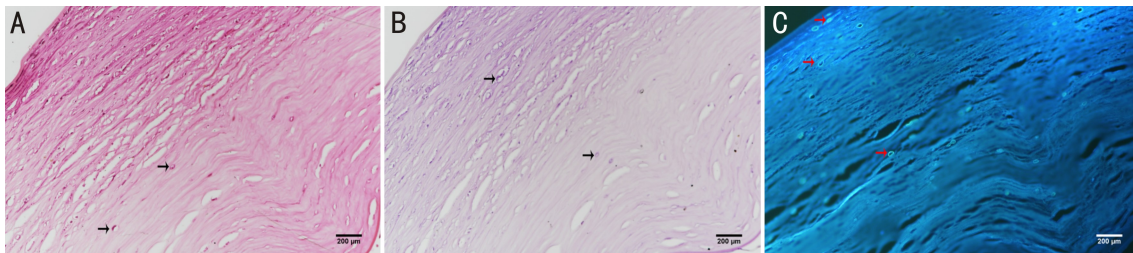


图1 AK的镜下特点 同一部位连续切片染色。A:HE染色棘阿米巴囊壁呈紫红色(箭头),可见双层壁结构,内容物呈紫色;B:PAS染色的棘阿米巴包囊呈紫红色(箭头);C:荧光染色后,棘阿米巴囊壁呈亮绿色荧光(箭头),角膜基质纤维呈蓝色,背景黑色。

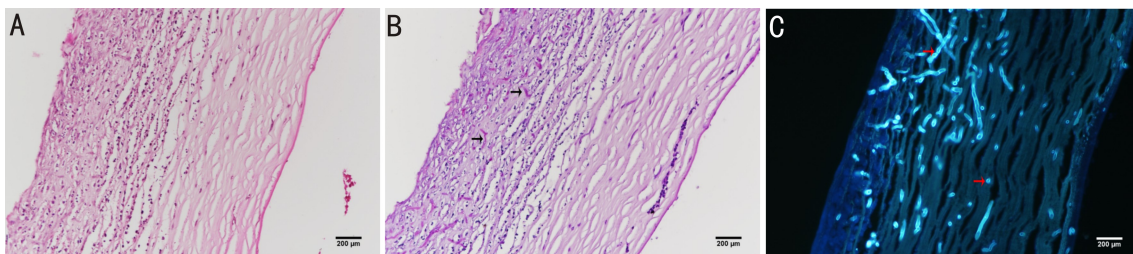


图2 真菌性角膜炎镜下特点 同一部位连续切片染色。A:HE染色角膜基质变性坏死,炎细胞浸润,呈化脓性炎症改变;B:PAS染色将真菌菌丝和孢子染成紫红色(箭头);C:荧光染色后,真菌菌丝和孢子呈亮蓝绿色荧光(箭头),角膜基质纤维呈蓝色,背景黑色。

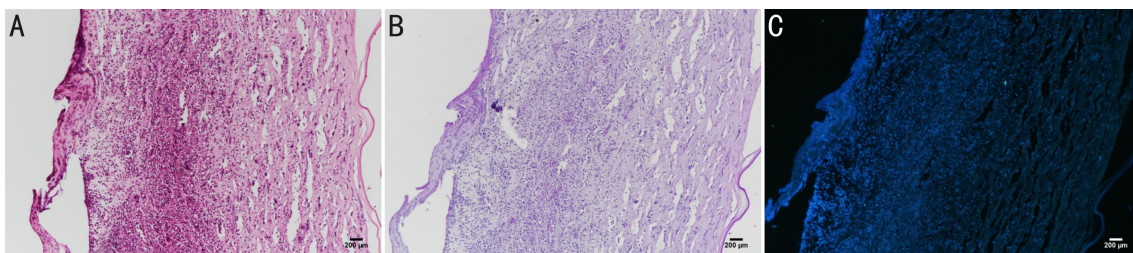


图3 细菌性角膜炎镜下特点 同一部位连续切片染色。A:HE染色示角膜基质大量炎细胞浸润,呈化脓性炎症改变;B:PAS染色呈阴性;C:荧光染色未见发出荧光的病原体。

和特异性。同一标本进行连续切片,选取同一部位相同倍率视野下,分别计数3种染色方法找到阿米巴病原体的数量。

统计学分析:使用SPSS 23.0软件进行数据分析。计数资料以例数和百分比表示,非正态分布计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。采用Cohen's Kappa检验评价两位病理医师对相同病理切片阅片结果的一致性。三种染色方法的敏感性比较采用Cochran Q检验,使用Dunn's检验(经Bonferroni法校正)进行事后两两比较。诊断效能比较使用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线计算ROC曲线下面积(area under receiver operating characteristics curve, AUC)。计数在同一部位相同倍率视野下,3种染色方法找到棘阿米巴病原体的数量比较采用非参数检验的Friedman法,使用Dunn's检验(经Bonferroni法校正)进行事后两两比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 患者一般情况 本研究共收集感染性角膜炎患者74例75眼,其中AK组38例39眼,NAK组36例36眼(其中真菌性角膜炎30例30眼,细菌性角膜炎6例6眼)。男42例,女32例,年龄9~78(平均 $48.8 \pm 16.2$ )岁。初发71例,复发3例,复发3例均为AK。

### 2.2 不同角膜炎病原体在不同染色方法的镜下特点

2.2.1 AK 组织切片经HE染色,观察到角膜组织呈化脓性炎症改变,角膜基质纤维变性坏死,大量炎细胞浸润,基

质间可见棘阿米巴包囊,囊壁呈紫红色,可见双层壁结构,内容物呈紫色,有时偏位于包囊一侧。PAS染色棘阿米巴包囊表现与HE染色相似,但经PAS染色的角膜基质纤维和棘阿米巴包囊颜色都较淡,有时不如HE染色容易分辨。荧光染色后,棘阿米巴的囊壁呈亮绿色荧光,包囊中央的荧光略弱于囊壁的荧光,有时只可见空的囊壁结构,角膜基质纤维呈蓝色,背景黑色(图1)。

2.2.2 真菌性角膜炎 HE染色在绝大多数真菌不着色,很难在受感染的角膜病灶中辨别出真菌菌丝或孢子,PAS染色可以将菌丝壁和孢子染成紫红色,角膜基质呈粉红色。经荧光染色后,真菌菌丝和孢子呈亮蓝绿色荧光,可见菌丝的横隔及分支,角膜基质纤维呈蓝色,背景黑色(图2)。

2.2.3 细菌性角膜炎 病理组织切片使用以上3种染色方法都无法观察到细菌的病原体,HE染色和PAS染色可以观察角膜受感染的病理变化,荧光染色可以用于排除棘阿米巴或真菌感染(图3)。

2.3 不同染色方法对AK诊断的效能比较及阅片医师一致性检验结果 HE染色的敏感性为69%(27/39)、特异性为92%,PAS染色的敏感性为62%(24/39)、特异性为97%,荧光染色的敏感性为95%(37/39)、特异性为97%,对组织病理应用3种染色方法诊断AK的敏感性进行分析,发现3种染色方法对AK诊断的敏感性的差异有统计学意义( $\chi^2 = 19.857, P < 0.001$ ),采用Dunn's检验(经Bonferroni法校正)进行两两比较发现,HE染色与荧光染

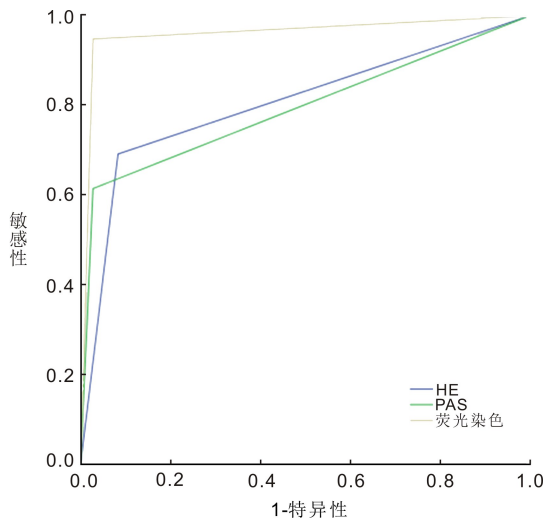


图4 三种染色方法诊断 AK 的 ROC 曲线图。

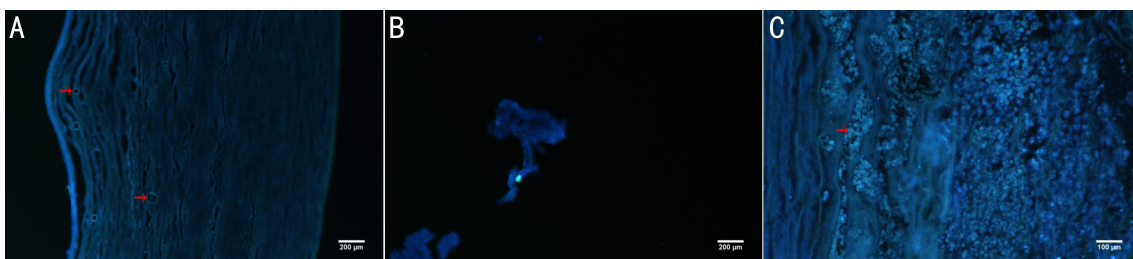


图5 棘阿米巴与其他物质的鉴别诊断 A: 荧光染色示气泡(箭头); B: 荧光染色示杂质; C: 荧光染色示念珠菌孢子。

表1 三种染色方法诊断 AK 的效能比较

染色方法	敏感性 (%)	特异性 (%)	AUC
HE 染色	69	92	0.804
PAS 染色	62	97	0.794
荧光染色	95	97	0.960

色、PAS 染色与荧光染色诊断 AK 的敏感性差异具有统计学意义 ( $P=0.003, <0.001$ ), HE 染色与 PAS 染色诊断 AK 的敏感性差异无统计学意义 ( $P=0.978$ )。3 种染色方法的效能指标见表 1。AUC 最大为荧光染色 0.960, 其次分别为 HE 染色 0.804, PAS 染色 0.794, 3 种染色方法的 ROC 曲线见图 4。

对角膜标本进行连续切片, 计数在同一部位相同倍率视野下, 对 3 种染色方法找到棘阿米巴病原体的数量进行分析, HE 染色找到棘阿米巴包囊个数的中位数为 4 (0, 11) 个, PAS 染色找到棘阿米巴包囊个数的中位数为 2 (0, 9) 个, 荧光染色找到棘阿米巴包囊个数的中位数为 12 (3, 33) 个, 3 种染色方法找到棘阿米巴包囊的数量差异具有统计学意义 ( $\chi^2 = 56.561, P < 0.001$ )。采用 Dunn's 检验 (经 Bonferroni 法校正) 进行两两比较发现, HE 染色和荧光染色、PAS 染色和荧光染色找到棘阿米巴包囊的数量差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), HE 和 PAS 两种染色方法找到棘阿米巴包囊的数量差异无统计学意义 ( $P = 0.210$ ), 荧光染色的组织病理切片更容易辨别棘阿米巴病原体。

HE 染色、PAS 染色和荧光染色诊断 AK 在两位病理医师间表现出较好的一致性, Kappa 值分别为 0.916、0.875 和 0.947。

**2.4 棘阿米巴与其他物质的鉴别诊断** 荧光染色液除了能与棘阿米巴囊壁的成分结合产生荧光外, 在制片过程中,

染液在组织间产生的气泡, 混入的杂质都可以产生荧光。用荧光染液进行染色封片过程中产生的气泡, 其边缘会发出荧光, 类似于棘阿米巴的空囊壁, 但是这种气泡大小不一, 外形比棘阿米巴包囊圆润, 通过调节显微镜的细准焦螺旋, 将焦点聚焦在气泡, 这时会发现气泡是在组织标本上方贴近盖玻片的位置。制片过程中也可能会混入棉絮或其他纤维性杂质, 但杂质产生的荧光强烈, 看不到囊壁样结构。棘阿米巴包囊还需要与念珠菌的孢子相鉴别, 后者体积明显偏小, 呈大小一致的圆形或椭圆形, 无双层壁结构, 成团聚集在角膜基质纤维间 (图 5)。

### 3 讨论

AK 是一种少见的但具有潜在破坏性的眼部感染, 发病初期症状较隐匿, 病程相对缓慢, 本研究中 AK 患者病程平均为 57d, 比真菌性角膜炎患者和细菌性角膜炎患者病程长。国外研究报道, AK 主要是由配戴被污染的角膜接触镜引起<sup>[5-6]</sup>, 其次是角膜表面划伤、用被污染的水洗眼。社会经济地位较低的人群中 AK 发病率较高<sup>[7]</sup>。在我国 AK 主要是由外伤和接触被污染的水引起<sup>[8-9]</sup>, 在本研究中主要的危险因素是灰尘及其他异物入眼造成的角膜划伤, 其次是配戴被污染的角膜接触镜。

AK 的症状与其他类型角膜炎相似, 常被误诊为单纯疱疹病毒性角膜炎、真菌性角膜炎以及细菌性角膜炎等<sup>[10]</sup>。如何快速准确的诊断 AK 对指导临床诊治具有重要的意义。体外培养是检查感染性角膜炎有效的实验室检查方法, 刮取角膜病灶部位的组织或者用手术切除的角膜标本进行培养, 接种在添加大肠埃希菌的无营养琼脂培养基上, 培养周期为 2wk, 培养阳性率为 30%~60%<sup>[11-12]</sup>。角膜刮片检查是一种快速、简便的实验室检查方法, 只需刮取角膜病灶组织涂于载玻片上, 然后滴加 10% KOH 溶



液于普通光学显微镜下检查,相关报道阳性率为27%<sup>[13]</sup>,但这种方法需要检查者有丰富的阅片经验,因为在未染色的湿片上辨别棘阿米巴病原体比较困难,容易与退变的角膜上皮细胞或单核细胞混淆,另外,取材质量的好坏直接影响诊断结果的准确性。共聚焦显微镜是一种无创性检查方法<sup>[14-16]</sup>,分辨率可达1 $\mu$ m,可以在细胞水平上对角膜进行观察,典型的棘阿米巴包囊成双层壁结构,容易诊断,但是在角膜溃疡严重的病例,其穿透性差,无法成像。

对于因角膜严重感染而行角膜移植手术的病例,病理组织活检是重要的检查方法,它可以明确感染性角膜疾病的类型,直观的观察角膜组织的病理生理变化。HE染色是组织病理最常用的染色方法,可以将棘阿米巴囊壁染成紫红色,内容物染成紫色,但是HE染色对真菌的着色力较差;棘阿米巴包囊在PAS染色下呈紫红色,与HE染色相似,真菌细胞壁和孢子也可被染成紫红色;棘阿米巴包囊和真菌细胞壁都含有几丁质,属于一类 $\beta$ -型多糖,可与荧光染色液特异性结合,形成强的荧光复合物,使用荧光显微镜可以观察到角膜组织中的病原体。以往研究报道,组织病理诊断AK的阳性率为31%~65%<sup>[10]</sup>,这与本研究中应用HE染色和PAS染色诊断AK的阳性率相似。本研究中使用的荧光染色法方便、快捷,组织标本充分脱蜡后滴加一滴荧光染液,作用1min便可在荧光显微镜下诊断。本研究中,荧光染色法诊断AK的阳性率为95%,明显高于常规HE染色和PAS染色的阳性率。HE染色和PAS染色虽然可以将棘阿米巴囊壁染色,但是检查者要想准确鉴别棘阿米巴病原体还需要积累一定的经验<sup>[17]</sup>,而且角膜组织坏死严重并伴有大量炎细胞浸润时,分辨混在坏死组织中的棘阿米巴病原体就比较困难。有时组织中棘阿米巴数量很少,HE染色或PAS染色对于少量不典型的棘阿米巴包囊很难做出准确判断。为了进一步验证荧光染色诊断棘阿米巴病原体的效力,本研究将同一部位相同倍率视野下,分别将三种染色方法所能识别的棘阿米巴数量进行比较,结果荧光染色识别的棘阿米巴数量明显多于其他两种染色方法,荧光染色液可以特异性的与棘阿米巴囊壁成分结合,在紫外激发光作用下产生亮绿色荧光,与角膜组织中其他成分形成鲜明的对比,在坏死严重的病灶区域,也很容易识别棘阿米巴病原体。对于经验较少的病理诊断医师,应用荧光染色也可以容易的识别组织中的病原体,通过对照常染色组织切片,可以进一步学习和积累诊断经验。

但荧光染色技术也有一些不足之处,首先荧光染色的组织荧光性会衰减消失,所以染色后要尽快进行检查,并拍照留存。而且应用荧光染色技术时,也要注意一些非特异性染色所造成的影响,如制片过程中产生的气泡、混入的纤维性杂质都会发出荧光从而影响诊断。另外,棘阿米巴包囊还需要与真菌的孢子相鉴别。

综上所述,本研究分析了荧光染色技术在AK诊断中的应用价值,并与其他两种染色方法进行了对比,该方法可以快速、准确的识别棘阿米巴病原体,并为定量分析组织中棘阿米巴病原体的含量提供客观依据。

#### 参考文献

- 1 Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, et al. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974;2(7896):1537-1540
- 2 Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. Acanthamoeba polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1975;95(2):221-232
- 3 金秀英, 罗时运, 杨宝铃, 等. 棘阿米巴角膜炎的诊断和治疗探讨. *眼科研究* 2000;18(2):143-145
- 4 杜满, 张莉, 李鹏, 等. 荧光染色与过碘酸希夫染色对真菌性角膜炎诊断效果的比较. *中华实验眼科杂志* 2021;39(2):119-125
- 5 Butler TK, Males JJ, Robinson LP, et al. Six-year review of Acanthamoeba keratitis in New South Wales, Australia: 1997-2002. *Clin Exp Ophthalmol* 2005;33(1):41-46
- 6 Acharya NR, Lietman TM, Margolis TP. Parasites on the rise: a new epidemic of Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol* 2007;144(2):292-293
- 7 Sharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related Acanthamoeba keratitis. *Br J Ophthalmol* 2000;84(10):1103-1108
- 8 朱智勇, 王敬亭, 董燕玲, 等. 棘阿米巴性角膜炎120例临床特征及治疗转归. *临床眼科杂志* 2020;28(3):228-232
- 9 李绍伟, 谢立信, 史伟云, 等. 棘阿米巴性角膜炎误诊病例的回顾性研究. *中华眼科杂志* 2002;1:21-23
- 10 Szentmáry N, Daas L, Shi L, et al. Acanthamoeba keratitis-Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *J Curr Ophthalmol* 2019;31(1):16-23
- 11 Bacon AS, Frazer DG, Dart JK, et al. A review of 72 consecutive cases of Acanthamoeba keratitis, 1984-1992. *Eye (Lond)* 1993;7(Pt 6):719-725
- 12 Parmar DN, Awad ST, Petroll WM, et al. Tandem scanning confocal corneal microscopy in the diagnosis of suspected Acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 2006;113(4):538-547
- 13 McKelvie J, Alshiakhi M, Ziaei M, et al. The rising tide of Acanthamoeba keratitis in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation, diagnosis and outcomes (2009-2016). *Clin Exp Ophthalmol* 2018;46(6):600-607
- 14 Huang P, Tepelus T, Vickers LA, et al. Quantitative analysis of depth, distribution, and density of cysts in Acanthamoeba keratitis using confocal microscopy. *Cornea* 2017;36(8):927-932
- 15 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
- 16 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
- 17 Grossniklaus HE, Waring GO, Akor C, et al. Evaluation of hematoxylin and eosin and special stains for the detection of Acanthamoeba keratitis in penetrating keratoplasties. *Am J Ophthalmol* 2003;136(3):520-526