

常见致病真菌所致角膜炎的激光扫描共焦显微镜图像特点分析

夏元 薛春燕 吴艳 黄振平

210002 南京军区南京总医院眼科

通信作者:黄振平,Email:HZP19633@hotmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.013

【摘要】 背景 真菌性角膜炎仍是中国主要的感染性眼病,传统的确诊方法主要是角膜刮片后进行菌种培养。激光扫描共焦显微镜检查是近年来使用的无创性活体眼表检查的方法,但目前关于真菌性角膜炎病灶区相关检查特点的研究工作尚不够系统和完善。目的 研究和分析中国常见的 4 种致病菌引起的真菌性角膜炎的激光扫描共焦显微镜检查特点。方法 采用回顾性研究设计,对 2007 年 1 月至 2011 年 11 月在南京军区南京总医院初诊且进行激光扫描共焦显微镜检查的 65 例真菌性角膜炎患者的临床资料进行分析,患者均为单眼患病。所有患眼均进行角膜真菌的实验室培养和激光扫描共焦显微镜检查,对不同菌种引起的真菌性角膜炎激光扫描共焦显微镜图像特点进行分析,主要包括菌丝的特点、孢子的分布及菌丝与病灶周围组织反映的关系,并总结激光扫描共焦显微镜下真菌菌丝与其他角膜组织的鉴别要点。结果 角膜感染菌的实验室培养结果显示,本研究中纳入的患眼中镰刀菌角膜炎感染者占 63.0%,曲霉菌感染者占 16.9%,念珠菌感染者占 3.0%,链格孢霉菌感染者占 4.6%。激光扫描共焦显微镜检查显示,镰刀菌感染性角膜炎病灶中的菌丝在角膜浅基质层呈树枝样高反光,而在深基质层表现为线型,病灶区炎性细胞较少;念珠菌感染性角膜炎病灶中的假菌丝位于角膜浅、中基质层,有散在的孢子和炎性细胞浸润,基质纤维增生活跃;曲霉菌感染病变区的菌丝呈蠕虫状,形状较镰刀菌细且短;链格孢霉菌感染病灶区的菌丝长、直且粗大,并有球形厚垣孢子位于菌丝顶端。激光扫描共焦显微镜下各种真菌性角膜炎病灶区的菌丝与角膜上皮神经丛、树突状细胞、角膜的增生纤维等均表现为高反射,但其形状、分布及走行均有所不同。结论 真菌菌丝是诊断和鉴别真菌性角膜炎感染菌属的主要依据,激光扫描共焦显微镜可在活体提供有用的相关信息,为真菌性角膜炎的早期诊断和治疗提供可靠依据。

【关键词】 角膜炎/微生物;真菌眼部感染/诊断;激光扫描共焦显微镜/方法;鉴别诊断

The features of *in vivo* laser confocal microscope images of frequent fungal keratitis Xia Yuan, Xue Chunyan, Wu Yan, Huang Zhenping

Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: Huang Zhenping, Email: HZP19633@hotmail.com

[Abstract] **Background** Fungal keratitis is one of primary infectious ocular diseases in China. Conventional diagnostic method is fungal cultivation. *In vivo* laser confocal microscope is a noninvasive examination of ocular surface. However, the study on features of *in vivo* laser confocal microscope images of frequent fungal keratitis is still not thorough. **Objective** This study was to analyze laser confocal microscope imaging features of four typical fungal keratitis. **Methods** The clinical data of 65 eyes from 65 patients with fungal keratitis were retrospectively analyzed. The patients were initially diagnosed in Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command PLA from January 2007 to November 2011, and laser confocal microscope examination of ocular surface and fungal cultivation were performed. The characteristics of laser confocal microscope images were investigated, including shape and type of hypha, distribution of spores and the relationship of hypha with lesion. The differentiation between fungal hypha and other corneal tissues was summarized. **Results** Fungal cultivation showed that among the 65 patients, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Candida* and *Alternaria* were common pathogenic fungus with the infected proportion 63.0%, 16.9%, 3.0% and 4.6%, respectively, and 12.5% patients were infected by other fungus. In the images of laser confocal microscope, hyphae of *Fusarium* presented the branch-like high reflective structure in the corneal superficial stromal layer and thinning line shape in the deep stromal layer. Few inflammatory cells were found. The pseudohyphae and spores from *Candida* were seen in corneal superficial and mid stroma layers, with few inflammatory cells and many

proliferating stromal fibers in the lesions. The hyphae of *Aspergillus* presented worm-like, showing the thinner and shorter shapes in comparison with those of *Candida*. The hyphae of *Alternaria* were long, straight and thick in shape, and spherical chlamydospores were found on the hyphal tip. The hyphae, subepithelial plexus, dendritic cells, fibrosis of the cornea all showed high reflection under the laser confocal microscope, but evidently differences appeared in shape, distribution and course in corneas. **Conclusions** Hyphae are the main basis to diagnose fungal keratitis and differentiate fungi. As a non-invasive examination method, laser confocal microscope can provide useful information for the early diagnosis and treatment of fungal keratitis *in vivo*.

[Key words] Keratitis/microbiology; Eye infections, fungal/diagnosis; Microscopy, confocal/methods; Differentiation

真菌性角膜炎可导致严重的角膜溃疡,植物性外伤是常见的致病原因^[1-3]。由于目前尚缺少不同真菌感染的特异性治疗药物,真菌性角膜炎对药物治疗的反应性差,致盲率高,因此早期诊断和及时治疗对降低其致盲率至关重要。激光扫描共焦显微镜在细胞水平对活体角膜进行三维扫描成像,是一种快速、有效、无创、重复性好的活体检查手段,可用于角膜病变治疗效果的动态观察,在真菌性角膜炎早期诊断和治疗检测方面发挥着重要作用^[4]。目前关于各种真菌引起的角膜炎的激光扫描共焦显微镜影像学特点尚不够明确。本研究中总结真菌性角膜炎的激光扫描共焦显微镜图像特点,为其早期临床诊断、鉴别诊断和制定针对性治疗方案提供依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

采用回顾性研究设计,收集 2007 年 1 月至 2011 年 11 月在南京军区南京总医院眼科首诊的 65 例角膜炎患者的病历资料,其中男 35 例,女 30 例,年龄 45 ~ 69 岁,均为单眼患病。纳入的患者经裂隙灯显微镜、激光扫描共焦显微镜检查均提示真菌感染,其刮片+组织培养确定位真菌感染并明确菌种。排除有任何抗真菌治疗史、尚未进行任何眼表诊断或刮片和培养者。

1.2 方法

受检眼检查前用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社)点眼 1 次,采用 HRT II-RCM 激光扫描共焦显微镜(德国海德堡公司)进行检查,设置激光波长为 670 nm,观察视野为 380 μm × 380 μm ,放大倍数为 800 倍,分辨率为 1 μm 。在物镜表面滴加卡波姆眼凝胶(山东博士伦公司),盖上一次性无菌角膜接触帽,受检者坐于操作台前,调整操作台高度和 CCD 摄像头位置,下颌与前额分别固定在下颌托和前额托上,调整物镜中心对准角膜中央部,在 CCD 监控图像引导下前移物镜,使其轻触角膜,预设两者接触的焦平面深度为 0 μm ,转动焦平面调节环以

获得不同深度的角膜图像,调整物镜位置以观察不同部位的角膜,重点观察溃疡周边和溃疡灶部位并拍照。

2 结果

2.1 不同真菌菌种感染的角膜炎激光扫描共焦显微镜图像比较

在 65 例真菌培养结果阳性的患者中,镰刀菌感染数目占首位,其次是曲霉菌、念珠菌和链格孢霉菌。将同种真菌性角膜炎患者的激光扫描共焦显微镜图像进行比对,镰刀菌角膜炎患者中有 58% 的患者病灶形态较一致,曲霉菌性角膜炎中有 70% 的病灶形态较一致,2 例念珠菌角膜炎的病灶形态一致,3 例链格孢霉菌角膜炎的病灶形态均一致,其他 8 例培养物均见真菌生长,但未能鉴别。

2.2 真菌性角膜炎激光扫描共焦显微镜的主要特征

真菌性角膜溃疡病灶周边部可见大量、交错分布、形态各异的高反光菌丝,直径为 2 ~ 6 μm ,部分菌丝旁可观察到圆形或卵圆形反光较亮的真菌孢子,直径为 10 ~ 15 μm (图 1A)。病灶周边部位的角膜上皮和基质层均出现圆形炎性细胞浸润灶(图 1B)。角膜溃疡边缘浅层组织坏死,低陷形成交界沟,呈低反光(图 1C)。前房积脓时角膜内皮出现大量高反光点,为炎性细胞附着(图 1D)。

2.3 真菌性角膜炎菌丝形态分类及其分布

激光扫描共焦显微镜下可见真菌性角膜炎真菌菌丝主要有 3 种形态:树枝状、长线型和短粗状。树枝状菌丝呈高反射的细条形,粗细均匀,长 150 ~ 200 μm ,直径 2 ~ 4 μm ,分支角度 45° ~ 90°,呈树枝状或网状,多位于角膜上皮层和浅基质层(图 2A)。激光扫描共焦显微镜下长线样菌丝呈高反射直长线样,粗细均匀,长 200 ~ 300 μm ,直径 3 ~ 5 μm ,呈线样缠绕,易在角膜浅、中基质中发现(图 2B)。短粗样菌丝呈高反射、粗且短的形状,长 40 ~ 60 μm ,直径 3 ~ 6 μm ,呈棒状,分布杂乱,多位于角膜浅、中基质中(图 2C)。

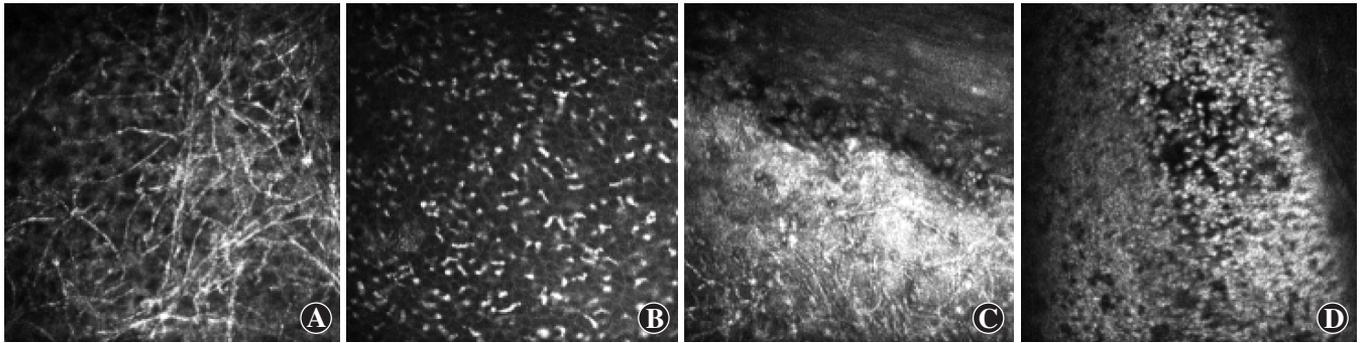


图 1 受检眼角膜激光扫描共焦显微镜图像(×800) A:病灶周边部可见大量交错分布的细长菌丝,其间有圆形的孢子,均为高反光 B:角膜上皮和基质层分布有炎性细胞浸润,呈点状高反光 C:角膜溃疡边缘形成低反光、下陷的交界沟 D:角膜内皮可见炎性细胞附着,为高反光点

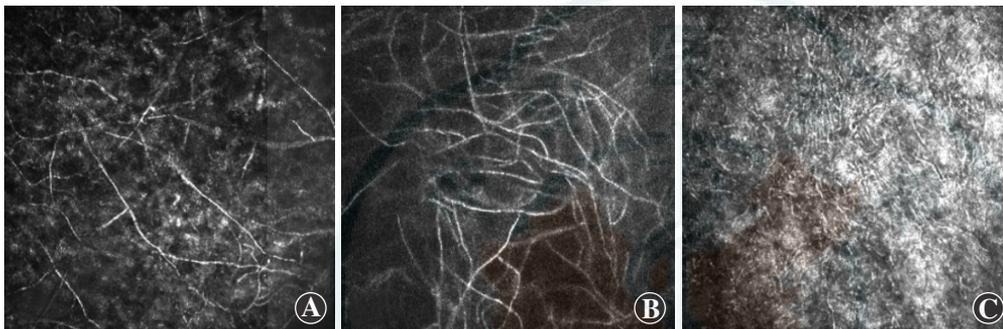


图 2 激光扫描共焦显微镜下真菌性角膜炎的主要形态(×800) A:树枝状菌丝呈高反射的细条形,菌丝间的交叉角为 45°~90° B:长线样菌丝呈高反射,相互缠绕 C:短粗样菌丝呈棒状,分布较杂乱

2.4 不同真菌菌种性角膜感染病灶的菌丝形态比较

2.4.1 镰刀菌感染性角膜炎 病灶边缘的角膜浅基质层可见大量树枝样高反光线,长 200~300 μm,直径 3~5 μm,分支处呈 90°,多位于浅基质层,伴有炎性细

胞浸润;角膜深基质可见大量菌丝交错分布,分支较少,呈细线形,炎性细胞较少,角膜内皮层可见大量高反光点,未见明显孢子结构(图 3A, B)。

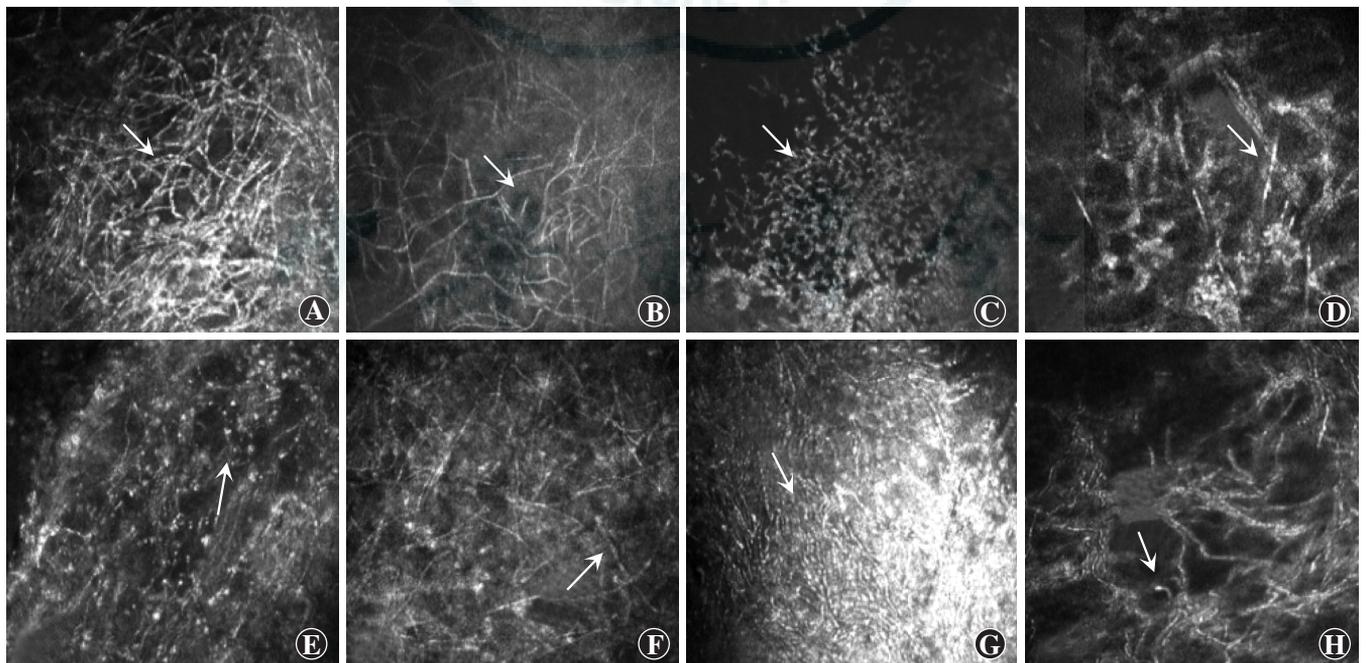


图 3 不同真菌角膜感染眼激光扫描共焦显微镜图片(×800) A:角膜镰刀菌感染病灶浅基质层均可见大量树枝样高反光线,分支呈 90°(箭头) B:镰刀菌感染灶角膜基质层可见大量交错分布的菌丝,分支较少(箭头) C:念珠菌感染灶角膜上皮层可见树突状细胞和炎性细胞浸润(箭头) D:念珠菌感染灶角膜基质层结构紊乱,可见假丝体(箭头) E:曲霉菌感染灶角膜基质层可见大量孢子(箭头) F:曲霉菌感染灶角膜浅基质层可见大量菌丝(箭头) G:链格孢霉菌感染灶角膜浅基质层可见大量菌丝(箭头) H:链格孢霉菌感染灶角膜基质层可见大量孢子(箭头)

2.4.2 念珠菌感染性角膜炎 假丝体位于角膜浅、中基质层,长 10~40 μm ,宽 5~10 μm ,有孢子散在分布;病灶旁角膜上皮层可见树突状细胞和炎性细胞浸润,角膜基质结构紊乱,形成大量条索样基质纤维,基质纤维的增生活跃(图 3C,D)。

2.4.3 曲霉菌感染性角膜炎 病灶中菌丝长 200~300 μm ,宽 3~4 μm ,分支呈 45°,与镰刀菌感染的菌丝相比直径较细,长度较短,走形弯曲,呈蠕虫状,可见孢子,未见明显的炎性细胞浸润(图 3E,F)。

2.4.4 链格孢霉菌感染性角膜炎 病灶中菌丝长 150~300 μm ,直径 5~6 μm ;有球形厚垣孢子位于菌丝顶端或与之相连,直径 10~15 μm (图 3G,H)。

2.5 激光扫描共焦显微镜下真菌菌丝与生理和病理状态下角膜其他组织结构的鉴别

2.5.1 真菌菌丝与角膜神经纤维的鉴别 激光扫描共焦显微镜下正常角膜上皮神经纤维呈高反射的丛状结构,纤维的走行方向一致,相互间不交叉(图 4A);角膜基质层神经数量较少,多位于角膜深基质层,神经纤维无分支,角膜基质层无炎性细胞浸润(图 4B)。单纯疱疹病毒性角膜炎患者角膜神经纤维变细,可发生卷曲、成环等改变,周围有大量树突样细胞浸润,此外角膜病灶散在,上皮层可见高反光点,浅基质层可见角膜变性及其环绕其周围的树突状细胞浸润呈

菊花状样(图 4C)。重度干眼患者激光扫描共焦显微镜下可见角膜有广泛的神经纤维断裂和变性,伴全角膜的上皮细胞损害,大量的树突状细胞位于角膜缘(图 4D),而菌丝分布相对局限且更加密集。

2.5.2 真菌菌丝与角膜纤维增生的鉴别 激光扫描共焦显微镜下角膜纤维组织增生也呈大量线样的高反光,但增生的纤维线条粗细不均匀,纤维间交叉现象明显,没有菌丝的弯曲或枝杈样分支,增生的纤维组织反光均一,无菌丝的透亮感,病变组织周围无炎性细胞浸润(图 4E)。

2.5.3 真菌菌丝与树突状细胞的鉴别 炎症反应时角膜病灶内可出现大量高反射的树突状细胞浸润,激光扫描共焦显微镜下其形态类似于菌丝,但树突状细胞有明显的细胞体和自细胞体发出的触手,较短,且无菌丝的透亮感(图 4F)。

3 讨论

3.1 激光共聚焦显微镜在诊断真菌性角膜炎中的作用

目前真菌性角膜炎的实验室诊断方法主要包括角膜刮片细胞学检查、真菌培养法、组织活检法等,但易造成假阴性结果,且取材过程有可能加重角膜组织的损伤。激光扫描共焦显微镜检查为活体无创检查法,

其具有快速、直观、重复性好等特点,可为临床治疗方案的调整及用药提供客观依据^[6]。

3.2 根据激光扫描共焦显微镜图像中真菌的形态判断菌属

可引起角膜感染的真菌约有 70 余种^[7],因各地区地理环境、气候特点、经济发展状况的不同,其主要的致病菌属可发生变化。20 世纪 90 年代,真菌性角膜溃疡的主要致病真菌主要为曲霉菌,其次为镰刀菌,而在卫生条件好的地区,主要致病真菌为念珠菌^[8-9]。中国主要的致病真菌菌属为镰孢菌属和曲霉菌属^[10]。本研究中显示,在激光共焦显微

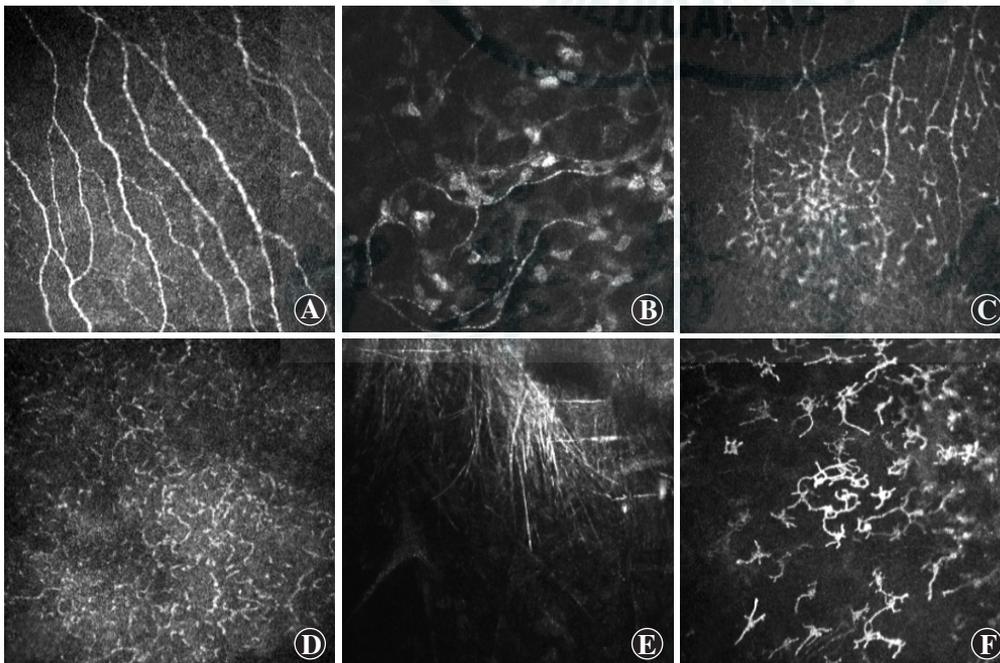


图 4 激光扫描共焦显微镜下真菌菌丝与其他角膜组织的鉴别($\times 800$) A:正常角膜基底膜部位神经丛呈分布规律、相互不交叉的高反射线 B:正常角膜浅基质层神经纤维呈弯曲的高反射线 C:单纯疱疹病毒性角膜炎可见角膜神经纤维不连续,病灶周围伴有大量树突状细胞浸润 D:重度干眼患者角膜神经纤维数量减少、断裂,伴大量树突状细胞浸润 E:角膜淀粉样变性病灶,角膜基质可见大量高反光纤维束 F:重度干眼患者可见角膜缘大量树突状细胞浸润

镜下真菌性角膜炎的典型特征是菌丝聚集成致密的丛状,菌丝为中间透亮的高反光条带,其形态随菌种不同而异,激光扫描共焦显微镜显示的菌丝图像同活体组织检查标本的光学显微镜下表现相似,同一菌属不同菌种感染所致的真菌性角膜炎的激光扫描共焦显微镜下表现较为一致^[11-12]。本研究中发现,镰刀菌在角膜浅基质层中的菌丝多较粗较长,呈树枝样分叉,走行陡直,在角膜深基质层中的菌丝多细长,无明显分叉,菌丝附近炎症细胞较少;曲霉菌的菌丝分布在角膜浅基质层中且较镰刀菌菌丝细,弯曲呈蠕虫样,伴发的高反光点可能为孢子,深基质层中菌丝较直,呈树枝样,分叉较镰刀菌少,高反光点较浅基质层减少;念珠菌在角膜上皮层可见大量的炎症细胞和树突状细胞,浅基质层中可见假丝体,有断点,角膜基质的增生较活跃;链格孢霉菌的菌丝较镰刀菌粗,浅基质层中菌丝较密集,呈短棒样,深基质层菌丝呈簇分布,似树枝,可观察到菌丝末端有球形厚垣孢子,是链格孢霉菌较特征的表现。

不同致病真菌具有不同形态的菌丝,但同一真菌菌种在不同感染个体及不同感染时期的菌丝及孢子形态也有所差别^[4,13-14]。本研究中发现,纳入例数较少的曲霉菌或链格孢霉菌感染角膜病灶中菌丝形态基本一致,而例数较多的镰刀菌或曲霉菌感染角膜炎患者角膜中菌丝形态并不完全一致,而且感染个体在接受检查前如接受过局部的治疗或进行刮片、取样等操作等对菌丝的形态均有明显影响,即使同种真菌的菌丝形态在同种环境下也或多或少地存在差异,样本量越大,一致性越差。因此单纯依靠真菌菌丝的激光扫描共焦显微镜图像特点判断菌种尚不可行,但其可为临床诊断与治疗提供参考依据。

综上所述,激光扫描共焦显微镜提供了一个新的无创活体角膜检查方法,在真菌性角膜炎早期即可观察到真菌结构,有助于及早对病变进行控制。就真菌性角膜炎而言,早期诊断、早期治疗不但可减轻患者的痛苦,也能有效降低角膜病的致盲率。本研究中对真菌性角膜炎的激光扫描共焦显微镜图像特点进行初步分析,更多信息仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Xie L, Dong X, Shi W. Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(9): 1070-1074.
- [2] Chowdhary A, Singh K. Spectrum of fungal keratitis in north India [J]. Cornea, 2005, 24(1): 8-15.
- [3] Upadhyay MP, Karmacharya PC, Koirala S, et al. Epidemiologic characteristics predisposing factors, and etiologic diagnosis of corneal ulceration in Nepal [J]. Am J Ophthalmol, 1991, 111(1): 92-99.
- [4] Winchester K, Mathers D, Sutphin E. Diagnosis of Aspergillus keratitis in vivo with confocal microscopy [J]. Cornea, 1997, 16(1): 27-31.
- [5] Vemuganti GK, Garg P, Copinathan U, et al. Evaluation of agent and host factors in progression of mycotic keratitis: a histologic and microbiologic study of 167 corneal buttons [J]. Ophthalmology, 2002, 109(8): 1538-1546.
- [6] 史伟云, 牛晓光, 王富华, 等. 真菌性角膜炎药物治疗后转归的共焦显微镜观察 [J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(7): 614-619. DOI: 10.3760/J. issn. 0412-4081. 2005. 07. 010.
Shi WY, Niu XG, Wang FH, et al. Evaluation of antifungal chemotherapeutic effects on fungal keratitis by confocal microscopy [J]. Chin J Ophthalmol, 2005, 41(7): 614-619.
- [7] Tanure MA, Cohen EJ, Sudesh S, et al. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania [J]. Cornea, 2000, 19(3): 307-312.
- [8] 孙声桃, 王丽娅, 王刚生, 等. 90 例真菌性角膜炎真菌菌种鉴定 [J]. 眼科研究, 2002, 20(3): 247-248.
Sun ST, Wang LY, Wang GS, et al. Spectrum of 90 cases with mycotic keratitis [J]. Chin Ophthalmic Res, 2002, 20(3): 247-248.
- [9] 张文华. 应重视感染性角膜病的综合治疗 [J]. 中华眼科杂志, 1998, 34(1): 5-7.
- [10] 王丽娅, 张月琴, 王印其, 等. 中国三地区真菌性角膜炎致病菌种的调查 [J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(2): 138-140.
- [11] 姚晓明, 黎明, 聂丹瑶, 等. 曲霉菌在活体剿灭溃疡和培养菌落中的共焦显微镜比较 [J]. 中国实用眼科杂志, 2010, 28(9): 954-957. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1006-4443. 2010. 09. 008.
Yao XM, Li M, Nie DY, et al. In vivo study of Aspergillus corneal ulcer and culture colony smears [J]. Chin J Prac Ophthalmol, 2010, 28(9): 954-957.
- [12] 张军, 王丽娅, 孙声桃, 等. 真菌性角膜炎的共焦显微镜影像学特点分析 [J]. 中国实用眼科杂志, 2007, 25(11): 123-125. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1006-4443. 2007. 11. 010.
Zhang J, Wang LY, Sun ST, et al. Imaging investigation of fungal keratitis by corfocal microscopy [J]. Chin J Practical Ophthalmol, 2007, 25(11): 123-125.
- [13] Florakis GJ, Moazami G, Schubert H, et al. Scanning slit confocal microscopy of fungal keratitis [J]. Arch Ophthalmol, 1997, 115(11): 1461-1463.
- [14] 曾庆延, 董晓光, 史伟云, 等. 真菌孢子黏附和基质金属蛋白酶在角膜真菌感染中的作用 [J]. 中华眼科杂志, 2004, 40(11): 774-776. DOI: 10.3760/j. issn. 0412-4081. 2004. 11. 013.
Zeng QY, Dong XG, Shi WY, et al. Function of adhesion and matrix metalloproteinases of fungal spores in fungal keratitis [J]. Chin J Ophthalmol, 2004, 40(11): 774-776.

(收稿日期: 2015-10-14)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)