

cyclosporine ophthalmic emulsion in treatment of Chinese patients with moderate to severe dry eye disease: a 12-week, multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled phase III clinical study [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98 (31): e16710 [2025-03-27]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6709181/>. DOI: 10.

1097/MD.000000000016710.

(收稿日期:2025-04-10 修回日期:2025-07-07)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

· 临床经验 ·

谲诈腐霉菌性角膜炎实验室检查特征分析

杜满 齐晓琳 鹿秀海 李晓凤

山东第一医科大学附属眼科研究所 山东第一医科大学附属眼科医院(山东省眼科医院)

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 山东第一医科大学眼科学院, 济南 250021

通信作者:鹿秀海, Email:xiuhailu@163.com

基金项目:国家自然科学基金(81900907)

Analysis of the characteristics of laboratory examination of keratitis caused by *Pythium insidiosum*

Du Man, Qi Xiaolin, Lu Xiuhai, Li Xiaofeng

Eye Institute of Shandong First Medical University, Eye Hospital of Shandong First Medical University (Shandong Eye Hospital),

State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Key Laboratory of Eye Disease, School of Ophthalmology,

Shandong First Medical University, Jinan 250021, China

Corresponding author: Lu Xiuhai, Email:xiuhailu@163.com

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81900907)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210324-00203

腐霉菌属是一种水生藻类卵菌^[1],其和瓜果腐霉菌是该属中仅有的可引起哺乳动物发生疾病的菌种^[2]。该菌对临床常用的抗真菌和抗细菌药物反应差,早期诊断和手术十分重要,但手术复发率可高达70%,严重者需行眼内容物摘出术^[3]。谲诈腐霉菌与真菌形态相似,实验室检查易将该菌误诊为真菌。目前关于谲诈腐霉菌性角膜炎实验室检查特征尚缺乏大样本报道,本研究对7例患者的实验室检查特征进行总结。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用系列病例观察方法,收集2017年1月至2020年8月在山东第一医科大学附属眼科医院就诊的腐霉菌性角膜炎患者7例,其中男5例,女2例;年龄34~72岁,平均(55.1±13.9)岁;均为单眼发病。所有病例均对真菌的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)进行测序,引物序列分别为ITS1正向:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4反向:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',明确感染病原体为谲诈腐霉菌。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,经山东第一医科大学附属眼科医院伦理委员会审核批准(批文号:SDSYKYY-2018021)。

1.2 方法 使用裂隙灯显微镜观察患者角膜病灶及眼前节情况。使用激光扫描共聚焦显微镜(HRT-III,德国海德堡公司)检查角膜病灶中心及边缘情况。患者平卧位,用盐酸丙美卡因滴眼液进行表面麻醉后,进行角膜刮片检查,共制备2张涂片,其中1张加1滴钙荧光白染液或10%氢氧化钾溶液,制备湿片,用荧光显微镜或普通光学显微镜观察有无菌丝,另外1张行革兰染色,油镜下观察有无细菌。然后进行组织病理学

检查,角膜组织经固定、脱水、透明、浸蜡,4 μm厚切片,行苏木精-伊红染色、过碘酸希夫染色和钙荧光白染色,分别置于普通光学显微镜和荧光显微镜下观察病原体的形态特点。最后,将刮取的角膜病灶组织分别接种于葡萄糖马铃薯琼脂培养基和哥伦比亚血琼脂平板,分别置于28和37℃温箱中进行培养,观察菌落生长速度、外观及菌丝在普通光学显微镜下的形态特征;待菌丝生长以后,将其接种于水草培养基,用普通光学显微镜观察游动孢子囊及藏卵器的形态。

2 结果

2.1 患者临床特点 7例患者均为农民。患者就诊时表现为眼红、眼痛、视物模糊、畏光流泪,裂隙灯显微镜下角膜溃疡灶与真菌感染类似,溃疡呈灰白色,周边可见伪足及卫星灶,均可见前房积脓(图1)。所有患者均常规抗真菌治疗效果不佳后行角膜移植手术,具体临床资料及治疗转归见表1。

2.2 激光扫描共聚焦显微镜下患眼的特征性表现 7例患者均可观察到菌丝结构,菌丝呈高亮反光,在角膜基质中生长密集。与丝状真菌不同,谲诈腐霉菌以纵横交错的放射状方式生长,常可见2或3条并排生长的菌丝,菌丝连续且少见分隔(图2)。

2.3 患眼角膜刮片检查特征性表现 7例患者角膜刮片镜检均为阳性,镜下特征性表现为菌丝分隔稀疏,分隔处易断,粗细不均,局部膨大,菌丝壁薄,易褶皱,呈绶带样(图3)。

2.4 患眼角膜组织病理学检查特征性表现 7例患者角膜组织呈化脓性炎症改变,病变处角膜上皮缺损,基质变性坏死。



滴诈腐霉菌在苏木精-伊红染色和 PAS 染色的切片上均不着色,无法识别角膜标本中的病原体,但组织切片上可以看到许多圆形或椭圆形的空隙(图 4)。钙荧光白染色结果显示,滴诈腐霉菌的菌丝呈亮绿色荧光且菌丝壁较薄,但荧光亮度较真菌弱。滴诈腐霉菌在角膜中的生长方式较为特殊,表现为平行于角膜基质板层纤维并向角膜缘呈放射状生长,因此在组织标本

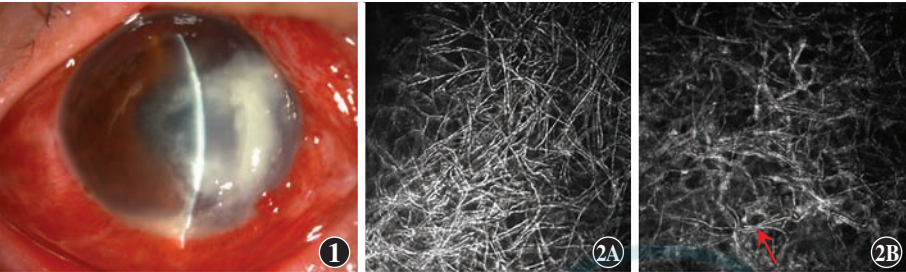


图 1 滴诈腐霉菌性角膜炎患眼裂隙灯显微镜下图像 结膜混合性充血,溃疡呈灰白色,可见前房积脓 图 2 激光扫描共聚焦显微镜下滴诈腐霉菌的特征性表现(×800) A:菌丝生长密集,呈纵横交错生长,菌丝连续且少见分隔 B:3 条菌丝并排生长(箭头)

表 1 7 例患者临床资料及治疗转归						
患者	年龄(岁)	诱因	发病到首次手术时间(d)	手术次数	手术方式	治疗转归
病例 1	72	无	15	4	LKP/PKP/PKP/眼内容物剜除	复发 3 次眼内容物摘出
病例 2	65	无	12	1	PKP	未复发治愈
病例 3	52	无	6	2	PKP/PKP+眼前节重建术	复发 1 次治愈
病例 4	69	无	15	3	PKP/病灶切除术/眼内容物摘出术	复发 2 次眼内容物摘出
病例 5	47	异物入眼(具体不详)	5	1	PKP	未复发治愈
病例 6	47	混凝土入眼	21	1	PKP	未复发治愈
病例 7	34	异物入眼(具体不详)	6	1	PKP	未复发治愈

注:LKP:板层角膜移植术;PKP:穿透角膜移植术

切片上看到的大多数是菌丝的横断面,即圆形或椭圆形的菌丝空腔,常见 2 或 3 个空腔紧密排列(图 5)。滴诈腐霉菌的菌丝可以侵犯全层角膜基质,亦可侵犯后弹力层,2 例行眼内容物摘出术患者的角膜组织切缘及后弹力层均可见菌丝(图 6)。

2.5 患者角膜组织微生物培养特征性表现及体外药敏结果 葡萄糖马铃薯培养基中菌落生长速度中等,37℃血琼脂平板更利于其生长,48 h 可以长满直径 90 mm 的平板。菌落呈白色至黄白色,表面湿润,呈波状或放射状,成熟菌落可呈玫瑰花瓣样外观,多为基内菌丝,气生菌丝缺如或稀少,呈短绒状(图 7)。水草培养基中可见有性期结构的藏卵器和大量的游动孢子囊(图 8)。真菌的体外药敏试验标准根据分生孢子的浓度或数量制定,而滴诈腐霉菌不产分生孢子,故无法按标准进行体外药敏试验。用 Etest 药敏纸条粗略做两性霉素 B、氟康唑和伏立康唑的体外药敏,均表现耐药(图 9)。

3 讨论

腐霉菌性角膜炎是由滴诈腐霉菌感染引起的一种破坏性极强的角膜感染,国外报道的相关病例主要在泰国^[4-5],我国尚无腐霉菌感染病例的报道,这可能与对该病的认识不足有关。腐霉菌性角膜炎主要发生在温暖潮湿的环境中,患者以农民居多,但 Agarwal 等^[3]的研究中患者主要为软件工程师或家庭主妇,地中海贫血被认为是泰国腐霉菌性角膜炎患者的诱发因

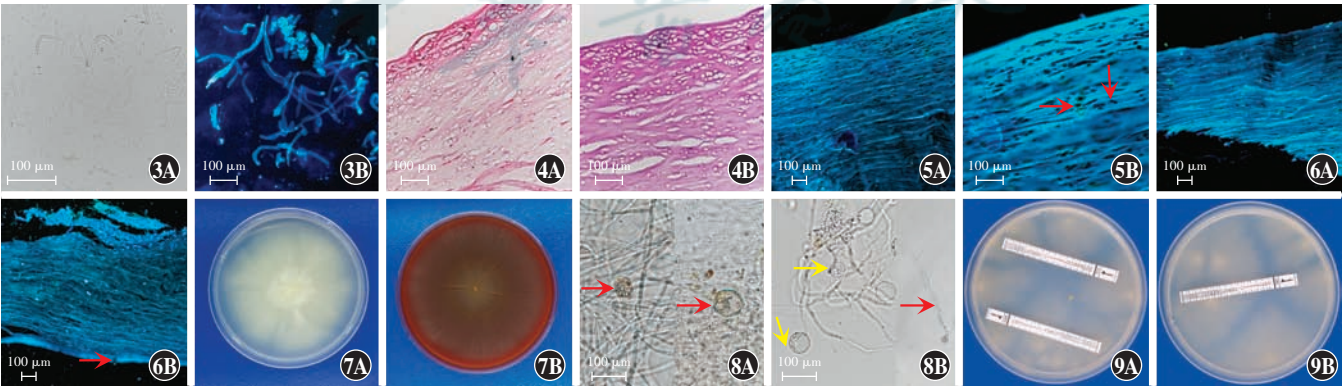


图 3 滴诈腐霉菌性角膜炎角膜刮片检查(标尺=100 μm) A:角膜刮片 10% KOH 溶液湿片检查 B:角膜刮片钙荧光白染色 图 4 滴诈腐霉菌性角膜炎组织病理学表现(标尺=100 μm) A:角膜组织呈化脓性炎症改变,组织中可见许多圆形或椭圆形空隙(HE) B:组织中可见许多圆形或椭圆形的空隙(PAS) 图 5 滴诈腐霉菌性角膜炎角膜组织钙荧光白染色(标尺=100 μm) A:菌丝呈亮绿色,可见多个菌丝的横断面,即圆形或椭圆形的菌丝空腔 B:2 或 3 个菌丝空腔紧密排列(箭头) 图 6 滴诈腐霉菌在角膜组织中的侵犯程度(标尺=100 μm) A:角膜切缘可见菌丝 B:菌丝侵犯角膜后弹力层(箭头) 图 7 葡萄糖马铃薯培养基和血琼脂平板培养滴诈腐霉菌 A:葡萄糖马铃薯培养基 28℃培养 10 d 的菌落 B:血琼脂平板 37℃培养 2 d 的菌落 图 8 水草培养基中可见滴诈腐霉菌有性期结构(标尺=100 μm) A:圆形的端生藏卵器(箭头) B:游动孢子囊(黄色箭头),圆柱形孢子囊内有圆形的游动孢子(红色箭头) 图 9 滴诈腐霉菌体外药敏结果 A:对两性霉素 B 和氟康唑耐药 B:对伏立康唑耐药

素之一,其他诱因包括配戴角膜接触镜、接触河水和患有糖尿病。本研究中患者均为农民,其中 3 例有明确的异物入眼史,其他患者无明显诱因。由于辅助检查结果均支持真菌感染,所有患者均积极进行局部和全身抗真菌治疗,但疗效差,所有患者均接受了手术治疗,其中 3 例患者复发,最终 2 例患者未能保住眼球。Krajaeun 等^[4]收集了泰国 1985—2003 年感染腐霉菌的患者,其中 79% (15/19) 最终进行了眼球摘出术。Permpalung 等^[6]研究报道中有 55% (5/9) 眼部腐霉菌感染患者进行了眼球摘出术,并指出年龄可能是影响患者预后的一个因素,需行眼球摘出术的患者年龄较大。本研究中 2 例进行眼球摘出术的患者年龄也较大,分别为 72 和 69 岁。为了能明确感染菌种的类型,本研究将所有标本进行 DNA 测序,证实均为谡诈腐霉菌,但 DNA 测序时间长,程序繁杂,对实验室硬件要求高,不适合作为常规的检查方法。

由于腐霉菌的细胞膜缺乏麦角固醇,而这是眼科常用的唑类和多烯类抗真菌药的作用靶点,临床研究发现该菌对其他抗真菌药物亦不敏感,早期手术彻底清除感染灶是唯一有效的治疗方法^[7]。依据腐霉菌的实验室检查特征性表现,可以简便快速地为临床诊断提供客观依据。角膜刮片检查方法简单,刮片检查真菌的阳性率可达 76.3%^[8],本研究中所有刮片镜检均可见丝状菌丝。角膜刮片中腐霉菌的菌丝呈透明带状,有褶皱,可见稀疏的菌丝分隔或无分隔^[9],与本研究观察到的腐霉菌形态一致。腐霉菌多数不能在沙堡弱培养基中生长,但可以在葡萄糖马铃薯培养基和血琼脂平板中生长,而且 37℃ 的血琼脂平板更适宜该菌生长。如果角膜刮片发现大量菌丝,而体外培养不生长,则应重新更换培养基进行培养。常规的体外培养,其不产生孢子,只能看到稀疏分隔的菌丝。Sharma 等^[9]指出,培养产生游动的孢子可以诊断腐霉菌,本研究水草培养基中发现大量的游动孢子囊和有性期结构。

本研究中所有手术切除组织均行组织病理学检查,PAS 染色可以将真菌菌丝或孢子染成紫红色。但本研究所有标本经 PAS 染色后,均未查见病原体,组织切片上只看到许多圆形或椭圆形的空隙。腐霉菌的菌丝壁含有纤维素,但缺乏几丁质和麦角固醇,过碘酸对纤维素的氧化作用比对几丁质的作用弱,需要作用较长时间才可以使醛基游离^[10],但过度的氧化作用会使整个组织标本染色加深,从而影响诊断。钙荧光白染色可以很好地显示谡诈腐霉菌^[11],本研究中所有标本经荧光染色后,均可见呈亮绿色荧光的菌丝,但菌丝的荧光亮度不如真菌,这可能与腐霉菌细胞壁缺少几丁质有关。

本研究中,所有角膜标本均按照垂直于角膜基质的方向进行切片,以保证可以观察角膜标本的解剖层次,7 例患者的角膜标本中,菌丝均平行于角膜基质板层纤维生长,而且观察到的菌丝主要为横断面,即圆形或椭圆形的菌丝空腔,常见 2 或 3 个空腔紧密排列,这与既往观察到的真菌在角膜内的生长方式不同。腐霉菌在激光扫描共聚焦显微镜下与真菌无明显区别^[7]。但本研究通过术前对患者进行激光扫描共聚焦显微镜检查,发现了谡诈腐霉菌一些特征性的表现:菌丝呈交织密集分布,菌丝弯曲度大,粗细不均,菌丝连续且少见分隔,少见炎

性细胞及坏死组织,未见明显孢子结构,常可见 2 或 3 条并排生长的菌丝,这些特点与组织病理观察到的结果一致。根据组织病理和激光扫描共聚焦显微镜的表现,本研究推测谡诈腐霉菌在角膜中的生长方式为平行于角膜基质板层纤维并向角膜缘呈放射状生长。

谡诈腐霉菌性角膜炎虽然在我国尚未见报道,但这种病原体对角膜的破坏性极大,其形态与真菌极其相似,易被误诊。本研究通过角膜刮片、激光扫描共聚焦显微镜、组织病理检查和体外培养发现了腐霉菌的一些特殊表现,其中湿片及荧光染色镜检形态是该菌表现比较特殊的地方,也是检验人员检出该菌最快的方法。另外激光扫描共聚焦显微镜下如果能发现并排生长的菌丝,也应提高警惕。这些特殊表现可以帮助我们早期快速地对这种病原体做出诊断,为临床诊治提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gastra W, Lipman LJ, De Cock AW, et al. *Pythium insidiosum*: an overview [J]. Vet Microbiol, 2010, 146(1-2): 1-16. DOI: 10. 1016/j. vetmic. 2010. 07. 019.
- [2] Calvano TP, Blatz PJ, Vento TJ, et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10): 3710-3713. DOI: 10. 1128/JCM. 01209-11.
- [3] Agarwal S, Iyer G, Srinivasan B, et al. Clinical profile of *pythium* keratitis: perioperative measures to reduce risk of recurrence [J]. Br J Ophthalmol, 2018, 102(2): 153-157. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2017-310604.
- [4] Krajaeun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand [J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(5): 569-576. DOI: 10. 1086/506353.
- [5] Thanathane O, Enkvetchakul O, Rangsin R, et al. Outbreak of *pythium* keratitis during rainy season: a case series [J]. Cornea, 2013, 32(2): 199-204. DOI: 10. 1097/ICO. 0b013e3182535841.
- [6] Permpalung N, Worasilchai N, Plongla R, et al. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(6): 1885-1892. DOI: 10. 1093/jac/dkv008.
- [7] Lelievre L, Borderie V, Garcia-Hermoso D, et al. Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler [J]. Am J Trop Med Hyg, 2015, 92(2): 270-273. DOI: 10. 4269/ajtmh. 14-0380.
- [8] Badiee P, Nejabat M, Alborzi A, et al. Comparative study of Gram stain, potassium hydroxide smear, culture and nested PCR in the diagnosis of fungal keratitis [J]. Ophthalmic Res, 2010, 44(4): 251-256. DOI: 10. 1159/000313988.
- [9] Sharma S, Balne PK, Motukupally SR, et al. *Pythium insidiosum* keratitis: clinical profile and role of DNA sequencing and zoospore formation in diagnosis [J]. Cornea, 2015, 34(4): 438-442. DOI: 10. 1097/ICO. 0000000000000349.
- [10] Mittal R, Jena SK, Desai A, et al. *Pythium insidiosum* keratitis: histopathology and rapid novel diagnostic staining technique [J]. Cornea, 2017, 36(9): 1124-1132. DOI: 10. 1097/ICO. 0000000000001244.
- [11] 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 [J]. 中华实验眼科杂志, 2021, 39(2): 119-125. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190702-00284.

Du M, Zhang L, Li P, et al. Comparison of fluorescence staining and periodic acid-Schiff staining in the diagnosis of fungal keratitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39(2): 119-125. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190702-00284.

(收稿日期: 2025-02-10 修回日期: 2025-08-28)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)