

感染性角膜炎的病原学诊断

杨小萱*, 王平#

三峡大学附属仁和医院眼科, 湖北 宜昌

收稿日期: 2024年3月27日; 录用日期: 2024年4月21日; 发布日期: 2024年4月28日

摘要

在世界范围内, 尤其是发展中国家, 感染性角膜炎是主要的致盲性眼病, 其地位仅次于白内障。目前, 诊断感染性角膜炎的金标准仍是微生物培养以及刮片检查, 但是其阳性率较低、耗时较长。对于眼科医生来说, 感染性角膜炎的诊断、治疗和预防方面仍然面临巨大挑战。因此, 开发快速且敏感的诊断性角膜炎的诊断方法至关重要。本文对近年来各种检测感染性角膜炎的诊断技术的研究现状进行综述, 并讨论各种诊断技术在角膜炎病原学诊断中存在的问题和应用前景。

关键词

感染性角膜炎, 实验室培养, 活体共聚焦显微镜, 下一代测序技术

Etiological Diagnosis of Infectious Keratitis

Xiaoxuan Yang*, Ping Wang#

Department of Ophthalmology, Renhe Hospital Affiliated to China Three Gorges University, Yichang Hubei

Received: Mar. 27th, 2024; accepted: Apr. 21st, 2024; published: Apr. 28th, 2024

Abstract

Infectious keratitis is the leading cause of blindness worldwide, especially in developing countries, second only to cataracts. At present, the gold standard for the diagnosis of infectious keratitis is still microbial culture and scraping, but it has the characteristics of low positive rate and long time consuming. For ophthalmologists, the diagnosis, treatment and prevention of infectious keratitis still face great challenges. Therefore, it is very important to develop a rapid and sensitive diagnostic method for infectious keratitis. This article reviews the research status of various diagnostic techniques for the detection of infectious keratitis in recent years, and discusses the problems and application prospects of various diagnostic techniques in the etiological diagnosis of keratitis.

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 杨小萱, 王平. 感染性角膜炎的病原学诊断[J]. 临床医学进展, 2024, 14(4): 2191-2195.

DOI: 10.12677/acm.2024.1441281

Keywords

Infectious Keratitis, Laboratory Culture, *In Vivo* Confocal Microscopy, Next-Generation Sequencing

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

感染性角膜炎是一种严重的致盲性眼病,在世界范围内,仅次于白内障[1]。主要诱发因素包括眼部外伤、佩戴隐形眼镜和眼表疾病[2]。引起感染性角膜炎的病因有很多,包括细菌、真菌、棘阿米巴原虫和病毒感染引起,若不能及时控制感染,极易导致角膜溃疡,甚至角膜穿孔,最终需要手术治疗。因此,对于感染性角膜炎的患者而言,早期、快速、准确的诊断是治疗的关键[3]。目前,诊断感染性角膜炎的金标准仍是实验室培养法。对于部分患者而言,其临床症状与体征并不相符,很容易导致眼科医生误诊。此外,许多患者在进行实验室培养前曾使用抗生素滴眼液,使得微生物培养阳性率偏低。近十几年中出现了许多新的诊断技术,在临床上十分受欢迎,如体内共聚焦显微镜、聚合酶链式反应以及下一代基因测序。本文对感染性角膜炎病原学诊断中的研究现状进行综述,同时探讨其在眼科诊疗过程中存在的问题,并展望其发展。

2. 实验室培养法

当就诊患者涉及到微生物感染导致的角膜炎时,准确、快速的微生物诊断是治疗的关键,同时也是眼科医生在用药不能达到理想疗效时的治疗关键[4]。尽管实验室培养耗时且阳性率偏低,微生物培养仍是感染性角膜炎诊断的金标准。角膜病灶区刮片镜检是便捷、迅速粗筛病原微生物的有效方法,因此在临床上广泛应用。而细菌培养则是当前诊断细菌性角膜炎最常用的方法[5]。对于细菌性角膜炎,在细菌培养结果未出的前提下,可以作为临床用药的指标,以免延误病情。而对于真菌性角膜炎,角膜刮片检出率较高,因此是临床上理想的诊断指标。角膜刮片和培养主要适用于以下情况:1) 角膜病灶浸润区较大且居中,和(或)有明显的角膜基质受损或溶解。2) 慢性感染或对广谱抗生素治疗无效。3) 有角膜手术史。4) 临床体征不明显。5) 角膜有多处浸润灶[6]。通过对我国发表的相关文献查阅,我们发现细菌培养的阳性率较低,孙旭光等对1989至1998年十年间送检的4705份细菌性角膜炎患者角膜培养标本进行染色与分类,培养阳性菌1339株,平均培养阳性率为28.6% [7]。山东省眼科研究所对1102例1997至2005年间疑似细菌性角膜炎患者的分析发现,培养阳性率仅为18.2%。王智群等对2007至2016年在首都医科大学附属北京同仁医院眼科649例感染性角膜炎进行刮片检查阳性率为21.6% [8]。分析原因:一方面是因为国内病原学研究并未引起眼科医师的重视,缺少多中心的流行病学调查;另一方面是因为许多患者就诊前已使用抗生素滴眼液和激素类滴眼液,从而降低了细菌培养的阳性率。尽管是金标准且具有良好的特异性,但角膜病灶刮片和培养的阳性率远不够理想。微生物培养的阳性率在32.7%至79.4%之间[9]。此外,微生物培养还需7~10天的时间。角膜病灶刮片的阳性率在27.35%至61.6%之间[9]。先前研究报告表明,刮片的敏感性高于培养,这可能是因为培养需要存活的微生物,而刮片能区分存活和死亡的微生物[10]。刮片和培养的阳性率低的原因可能与患者在检查前使用过广谱抗生素滴眼液、病程拖延、角膜病灶区取材部位不当或者较少、杂菌污染情况、以及依赖技术人员的诊断经验有关[2] [11] [12]。

3. 角膜活检和角膜组织病理学检查

尽管角膜活检可以准确对病原体做出诊断,但是这种方法对角膜的伤害较高[13]。角膜活检存在的风险较高,可以导致角膜穿孔、角膜瘢痕形成和不规则散光的可能性,对视力有较大影响。因此,只有当角膜病灶刮片和微生物培养阴性,而用药后临床感染症状不断进展,又高度怀疑为致病微生物感染的情况下,才考虑角膜活检[14]。角膜移植术后将角膜组织放置 10%中性甲醛溶液中放置 12 h,采用常规石蜡包埋方法制作切片,用切片机切成 3 毫米或 5 毫米的切片,再进行染色,常规的染色包括过碘酸-雪夫染色(PAS)、苏木精-伊红染色(HE)等,最后放置在显微镜下观察。陈鹏飞[15]等对 110 例真菌性角膜炎样本进行病理检查以及真菌涂片、真菌培养,分析后发现病理检查敏感性最好(80%)。病理检查能确诊真菌性角膜炎,且能明确真菌在角膜内生长的深度和形态,但不能鉴定真菌的种属,也不能为临床提供合理的用药指导。病理检查阳性率较高,但病理标本往往是在术中或术后标本,手术费用一般较高,无法做出快速诊断,且无法为临床提供合理的用药依据,因此,在基层医院的普及度和开展难度都不及角膜刮片染色和培养。

4. 活体共聚焦显微镜

活体共聚焦显微镜(*In Vivo* Confocal Microscopy, IVCM)是一种非侵入式成像技术,可以提供高分辨率角膜成像,对感染性角膜炎的诊断提供良好依据。IVCM 通过 400 倍放大倍率对角膜、角膜缘、结膜提供清晰的成像,从细胞水平对正常和病变眼表进行分析。目前,国内外大量研究者表明,IVCM 为真菌性角膜炎和棘阿米巴角膜炎辅助诊断和治疗提供较大价值。在棘阿米巴角膜炎的病例中,报告的敏感性通常大于 80%,敏感性大于 84%。在真菌性角膜炎的病例中,大多数研究报告的敏感性 > 85%,特异性 > 90% [16] [17]。IVCM 可以帮助眼科医生立即诊断真菌性角膜炎,尤其是丝状真菌[18]。丝状真菌主要包括曲霉菌属和镰刀菌属,曲霉菌直径约 5~10 微米,由 45°分叉的两个菌丝组成[19]。镰刀菌和曲霉菌外观上相似,但菌丝的分支呈 90° [19]。近年,Wang 等[20]在 61 名真菌性角膜炎患者的 IVCM 上发现明显的真菌菌丝和孢子,这显著弥补了真菌培养的不足。迄今为止,IVCM 在鉴别丝状真菌和非丝状真菌上具有明显差别,但在其它特异性真菌上还缺乏更多的 IVCM 图像来区分。棘阿米巴性角膜炎早期表现缺乏特异性,其诊断通常困难。同时,IVCM 还不能很好的鉴别真菌菌种。IVCM 可以显示与棘阿米巴性角膜炎相关的四种临床表现:包囊、滋养体、放射性角膜神经炎和病变后期角膜基质中的空腔。由于 IVCM 是一种非侵入性诊断工具,因此,这种检查很容易在角膜炎发展的各个阶段重复检查,以明确治疗效果。因此,IVCM 不仅是一种诊断手段,还可以评估角膜炎的治疗效果。虽然并未报道 IVCM 有何副作用,但其是一种角膜接触性检查,可能会引起患者眼部不适,对操作者有一定要求。

5. 分子生物学技术

病原微生物一旦感染机体,便可以在体内留下身体印记,核酸就是其中一种。随着基因检测技术的提高和广泛应用,各种微生物核酸序列被发现,因此根据病原微生物在体内留下的特异性核酸序列,通过分子生物学诊断技术即可识别。目前,在感染性角膜炎中广泛使用的是核酸扩增技术,其中最常见的是聚合酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction, PCR),但 PCR 无法分析样本中所有病原体,具有很大局限性。近年来,随着二代测序技术(Next-Generation Sequencing, NGS)的普及和成熟,为感染性角膜病的诊断提供了一种新的有价值的诊断技术。NGS 技术是一项能将数万至数百万条 DNA 片段同时和独立测序的技术[21],可迅速、高效、精准地获取整个检测标本内所有的基因组信息,从而分析致病微生物,突破传统方法无法一次性检测多种病原微生物的限制[22]。在一项回顾性研究中,Li 等[23]采用 NGS 技术评估率 16 例感染性角膜炎和 4 例无感染的对照角膜病例,能准确鉴定出细菌、真菌、棘阿米巴、病毒

感染。分子诊断技术与实验室检测方法相比虽然阳性率高, 但存在假阳性的风险。另外, 组织样本取材较少、操作环境受污染、操作流程不合格以及专业技术人员对结果的解读等均有可能造成假阳性结果。此外, 专业技术实验室、设备在基层医院不能完备, 因此, 很难在基层医院普及。

6. 总结

现如今, 感染性角膜炎的发病率越来越高, 疑难病原体的感染也随之增加, 从而增加了眼科医师治疗的难度, 若不能明确诊断、及时治疗, 很大可能导致角膜穿孔、眼内炎最终甚至危及生命。近年来开发了许多检测工具。尽管培养时间周期较长且阳性率较低, 但诊断的金标准仍是微生物培养。IVCM 是一种无创、快速的工具, 具有高度的特异性和敏感性, 特别是在真菌和棘阿米巴病的病例中具有很大的价值。如今国内外十分重视分子诊断技术的发展, 分子诊断技术的灵敏、迅速、准确势必成为感染性疾病的主流。但是, 分子诊断技术对实验室要求较高, 在基层医疗单位还不能普及, 眼科医师应当注意实际情况, 以实验室诊断为主, 分子诊断技术为辅来提高感染性角膜炎的诊断水平, 为患者争取最佳治疗时机。

参考文献

- [1] Whitcher, J.P., Srinivasan, M. and Upadhyay, M.P. (2001) Corneal Blindness: A Global Perspective. *Bulletin of the World Health Organization*, **79**, 214-221.
- [2] Cabrera-Aguas, M., Khoo, P. and Watson, S.L. (2022) Infectious Keratitis: A Review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, **50**, 543-562. <https://doi.org/10.1111/ceo.14113>
- [3] 何晓婕, 潘俊如, 王春芳, 等. 感染性角膜炎临床特征与病原菌及其耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(15): 2334-2337.
- [4] 赵格, 谢立信. 感染性角膜炎的分子诊断技术研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2015, 51(9): 709-714. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.09.018>
- [5] Zemba, M., Dumitrescu, O.M., Dimirache, A.E., et al. (2022) Diagnostic Methods for the Etiological Assessment of Infectious Corneal Pathology. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **23**, Article No. 137. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.11060>
- [6] Lin, A., Rhee, M.K., Akpek, E.K., et al. (2019) Bacterial Keratitis Preferred Practice Pattern[®]. *Ophthalmology*, **126**, P1-P55. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.10.018>
- [7] 孙旭光, 王智群, 陈琳, 等. 细菌感染性眼病病原学分析(1989-1998) [J]. 中华医学杂志(英文版), 2002, 115(6): 933-935.
- [8] 王智群, 张阳, 孙旭光. 2007 至 2016 年儿童感染性角膜炎病原学分析[J]. 中华眼科杂志, 2022, 58(6): 433-440. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112142-20210809-00372>
- [9] Ung, L., Bispo, P.J.M., Shanbhag, S.S., et al. (2019) The Persistent Dilemma of Microbial Keratitis: Global Burden, Diagnosis, and Antimicrobial Resistance. *Survey of Ophthalmology*, **64**, 255-271. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2018.12.003>
- [10] Abu Eleinen, K.G., Mohalhal, A.A., Elmekawy, H.E., et al. (2012) Polymerase Chain Reaction-Guided Diagnosis of Infective Keratitis—A Hospital-Based Study. *Current Eye Research*, **37**, 1005-1011. <https://doi.org/10.3109/02713683.2012.698357>
- [11] Kaye, S.B., Rao, P.G., Smith, G., et al. (2003) Simplifying Collection of Corneal Specimens in Cases of Suspected Bacterial Keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**, 3192-3197. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3192-3197.2003>
- [12] 窦新岩, 王丽娅, 孙声桃, 等. 真菌性角膜炎临床常用诊断方法比较分析[J]. 中国实用眼科杂志, 2016, 34(6): 564-568.
- [13] Nisar, M. (2020) Influence of Next-Generation Sequencing on Advancements in the Diagnosis of Major Psychiatric Diseases—A Review. *Pakistan Journal of Medicine and Dentistry*, **13**, 127-134. <https://doi.org/10.36283/PJMD9-2/022>
- [14] Robaei, D., Chan, U.T., Khoo, P. et al. (2018) Corneal Biopsy for Diagnosis of Recalcitrant Microbial Keratitis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, **256**, 1527-1533.

- <https://doi.org/10.1007/s00417-018-3981-1>
- [15] 陈鹏飞, 秦晓怡, 毛丽萍, 等. 实验室诊断技术在真菌性角膜炎诊断敏感性的对比研究[J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(8): 1322-1326. <https://doi.org/10.3980/j.issn.1672-5123.2015.8.05>
- [16] Wang, Y.E., Tepelus, T.C., Vickers, L.A., Baghdasaryan, E., Gui, W., Huang, P., Irvine, J.A., Sadda, S., Hsu, H.Y. and Lee, O.L. (2019) Role of *in Vivo* Confocal Microscopy in the Diagnosis of Infectious Keratitis. *International Ophthalmology*, **39**, 2865-2874. <https://doi.org/10.1007/s10792-019-01134-4>
- [17] Kanavi, MR., Javadi, M., Yazdani, S. and Mirdehghanm, S. (2007) Sensitivity and Specificity of Confocal Scan in the Diagnosis of Infectious Keratitis. *Cornea*, **26**, 782-786. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318064582d>
- [18] Bakken, I.M., Jackson, C.J., Utheim, T.P., Villani, E., Hamrah, P., Kheirkhah, A., Nielsen, E., Hau, S. and Lagali, N.S. (2022) The Use of *in Vivo* Confocal Microscopy in Fungal Keratitis—Progress and Challenges. *The Ocular Surface*, **24**, 103-118. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2022.03.002>
- [19] Winchester, K., Mathers, W.D. and Sutphin, J.E. (1997) Diagnosis of Aspergillus Keratitis *in Vivo* with Confocal Microscopy. *Cornea*, **16**, 27-31. <https://doi.org/10.1097/00003226-199701000-00006>
- [20] Wang, J.S., Du, Y.L., Deng, N., Peng, X., Wong, H., Xie, H.T. AND Zhang, M.C. (2023) Characteristics of *in Vitro* Culture and *in Vivo* Confocal Microscopy in Patients with Fungal Keratitis in a Tertiary Referral Hospital in Central China. *Microorganisms*, **11**, Article 406. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020406>
- [21] Wilson, M.R., *et al.* (2014) Actionable Diagnosis of Neuroleptospirosis by Next-Generation Sequencing. *New England Journal of Medicine*, **370**, 2408-2417. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1401268>
- [22] Gu, W., Miller, S. and Chiu, C.Y. (2019) Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, **14**, 319-338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
- [23] Li, Z., Breitwieser, F.P., Lu, J., *et al.* (2018) Identifying Corneal Infections in Formalin-Fixed Specimens Using Next Generation Sequencing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **59**, 280-288. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21617>