

真菌性角膜炎的共焦显微镜影像学特点分析

张军 王丽娅 孙声桃 张月琴

【摘要】 目的 探讨应用共焦显微镜观察真菌性角膜炎患者角膜各层的活体形态学特点。**方法** 对 65 例 (65 只眼) 真菌性角膜炎患者的病灶进行活体共焦显微镜检查, 应用 NAVIS 软件测量、分析角膜各层菌丝、孢子形态、直径、密度。**结果** 通过连续共焦扫描及焦点分析: 65 例中共焦显微镜显示: ① 10 例显示上皮层下高反射直径 $2\mu\text{m}\sim 4\mu\text{m}$ 的树枝状菌丝; ② 27 例显示浅、中基质层杂乱分布的直、长线状菌丝, 直径约 $3\mu\text{m}\sim 6\mu\text{m}$, 长度 $150\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ 。③ 25 例显示浅、中基质层弥漫分布的高反射短、段状菌丝, 直径 $3\mu\text{m}\sim 6\mu\text{m}$, 长度 $40\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$ 。④ 3 例显示: 直径 $12\mu\text{m}\sim 15\mu\text{m}$ 的高亮度圆形、椭圆形实心球体孢子。菌丝侵入分布密度与炎性细胞分布密度成负相关 ($r=-0.019; p=0.026$)。**结论** 共焦显微镜下真菌性角膜炎菌丝有不同的影像学特点, 随着菌丝侵入角膜深度不同, 菌丝形态亦不相同。明确角膜基质深层菌丝形态在共焦显微镜检查中尤显重要。

【关键词】 共焦显微镜; 菌丝; 真菌性角膜炎

Imaging investigation of fungal keratitis by confocal microscopy

ZHANG Jun, WANG Li ya, SUN Sheng tao et al. Henan Ophthalmological institute HeNan key laboratory of keratopathy Zhengzhou 450006. China

【Abstract】 Objective To analyze the image of Fungal Keratitis using confocal microscopy in vivo. **Methods** Sixty-five patients, who were confirmed fungal infected by confocal microscopy. The images were analyzed visually for morphology of the hypha and the spore, as well as the densities and the diameter of the hypha and the inflammation cells were counted by NAVIS software. **Results** ① In 10 eyes, the bright hyper-reflective branching structures were revealed by confocal microscopy. The diameter of the hypha ranged 2 to $4\mu\text{m}$. ② In 27 eyes, bright hyper-reflective line structures were appeared in confocal microscopy. The diameter of the hypha ranged 3 to $6\mu\text{m}$ and 150-300 μm in length. ③ In 25 patients, short rod hyper-reflective structures were checked. The diameter ranged 3 to $6\mu\text{m}$ and 40-60 μm in length. ④ In 3 case, the hyper-reflective bulb structures were detected. The diameter ranged 12 to $15\mu\text{m}$. There was an inverse correlation between the densities of hypha and the inflammation cells. **Conclusions** The hypha appeared different configuration in different kinds of fungal keratitis, as well as in different deep by confocal microscopy.

【Keyword】 Confocal microscopy; Hypha; Fungal keratitis

共焦显微镜已渐成为早期诊断及指导真菌性角膜炎治疗的一种有临床应用价值的新型检查仪器^[1]。正常角膜的细胞形态的共焦显微镜特征已被广泛、深入的研究^[2,3]。但是, 目前对各种真菌性角膜炎的共焦显微镜的图像特点不详。我们利用共焦显微镜对真菌性角膜炎进行研究, 并分析其图像特征。结果报告如下。

资料与方法

1. 一般资料: 选择 2006 年 3 月—2006 年 10 月于河南省角膜病重点实验室确诊的真菌性角膜炎患者 65 例 (65 只眼); 其中男性 48 例, 女性 17 例, 年龄 17~75 岁。本次治疗前病程 3~45 天, 平均 12 天。所有病例均行裂隙灯显微镜观察结合角膜刮片查找菌丝, 并刮取病变角膜组织行真菌培养。角膜刮片、培养阳性且共焦显微镜查到菌丝者入选本次研究。

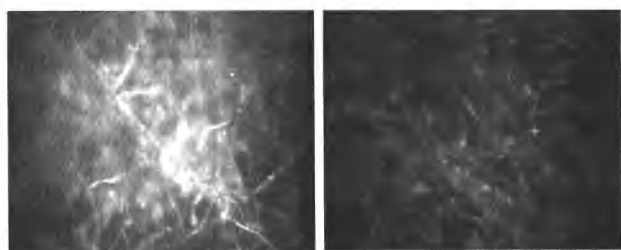
2. 检查方法: 用共焦显微镜 (Confocal 3) 半自动扫描方式检查病灶中央区及周边浸润区。放大倍数为 1000 倍, 可见 $475\mu\text{m}\times 350\mu\text{m}$ 角膜组织, 扫描厚度为 $5\mu\text{m}$; 每次扫描 350 幅图像。侧像分辨率 1~ $2\mu\text{m}$ 。共焦显微镜的 Z-Scan 曲线可以通过光亮

作者单位: 450003 郑州, 河南省眼科研究所, 河南省角膜病重点实验室 (现郑州大学第一附属医院博士研究生 张军)

通讯作者: 王丽娅 E-mail: liyawang@yahoo.com

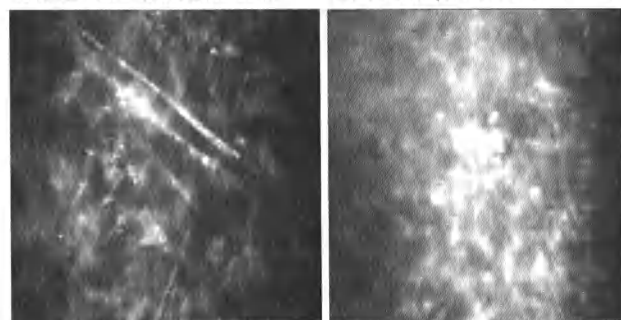
值的变化来区别不同组织, 波形完整的 Z-Scan 曲线用于测量、获取数据。角膜厚度是内皮层与上皮层波峰之间的距离, 上皮层细胞波峰与最后一张菌丝图像之间为菌丝侵入深度。

3. 统计参数与统计学处理: ①菌丝密度 ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$): 1 幅图像内菌丝的总长度为其密度, 图像面积 0.1376mm^2 , 再计算单位面积 (1mm^2) 内菌丝的长度为菌丝密度。②炎性细胞密度 (个/ mm^2): 单位面积 (1mm^2) 内炎性细胞的个数。采用 SPSS10.0 统计软件, 应用 spearman rho 非参数相关检验法分析各指标之间的相关性。



树枝状真菌菌丝 (放大倍数 1000 倍)

短、段状真菌菌丝 (放大倍数 1000 倍)



直、长线状真菌菌丝 (放大倍数 1000 倍)

真菌孢子 (放大倍数 1000 倍)

结 果

所有图像均以发现菌丝及孢子并与相应角膜刮片结果对比研究:

1. 病灶中心区: 所有角膜病灶中心区均表现为强烈反光物质, 失去正常角膜组织结构特征。

2. 病灶周边浸润区有多种表现形式: ①树枝状菌丝: 表现为大量弥漫交错分布的分支角度不同, 高反光的树枝状菌丝。表现出与光学显微镜下相似的形态学特征。多分布在上皮细胞层及基底细胞层。②直、长的线状菌丝: 表现为基质层杂乱分布的长度 $150\sim 300\mu\text{m}$, 直径 $3\sim 6\mu\text{m}$ 长而支挺, 粗细均匀, 有隔, 很少见分支的线状菌丝, 与光学显微镜下菌丝略有区别。③短、段状菌丝: 弥漫、交错分布的粗壮的短、段状真菌菌丝, 长 $40\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$, 直径 $3\mu\text{m}\sim 6\mu\text{m}$ 。④真菌孢子: 直径 $12\mu\text{m}\sim 15\mu\text{m}$ 的圆形或卵圆形球体。

3. 角膜组织菌丝与炎性细胞分布密度呈负相关: $r=-0.019$; $P<0.026$ 。菌丝密度为 (2419.85 ± 850.36) 个/ mm^2 ; 炎性细胞密度为 (36.5 ± 22.9) 个/ mm^2 。

讨 论

1. 真菌菌丝、孢子在光镜下的表现

真菌在生长和发育过程中, 表现出多种形态特征, 菌丝和孢子是其中之一。光镜下菌丝分为有隔膜或无隔膜两种类型。多数真菌的菌丝具有隔膜, 叫有隔菌丝。一般菌丝直径的增长是有限的, 通常在 $3\mu\text{m}\sim 7\mu\text{m}$ 。真菌孢子一般表现为圆形或卵圆形直径 $6\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$, 过碘酸雪夫氏 (PAS) 染色呈紫红色, 孢子壁较厚, 有明显的折光性。菌丝、孢子光镜的形态学特点与其在共焦显微镜下的特点有一定的相似。

2. 真菌菌丝、孢子在共焦显微镜下的表现

在本次研究中我们将真菌性角膜炎共焦显微镜图像具体分为四种表现: ①树枝状菌丝: 表现为菌丝粗细较均匀, 直径约 $2\mu\text{m}\sim 4\mu\text{m}$, 分支角度大小不一, 呈树枝状或局部连成网状, 有一定的生理弯曲度。与光镜下所见真菌菌丝形态特征十分相似。在共焦显微镜检查中多位于上皮层或基底细胞层。常在具有典型羽毛状边缘临床体征的浅层真菌性角膜炎检查到。②直、长线状菌丝: 此型真菌菌丝较易在角膜浅、中基质层中发现, 菌丝粗细均匀, 直径约 $3\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$, 长而支挺, 直线经过或斜行交叉, 可见菌丝分隔为其特征。菌丝周围可伴有炎性细胞的浸润。③短、段状菌丝: 本型菌丝较直、长线状菌丝长度略短, 长度约 $40\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$, 直径 $3\mu\text{m}\sim 6\mu\text{m}$; 弥漫、杂乱分布。亦较易于角膜组织的浅、中基质层中检查到。④孢子型: 在共焦显微镜下较难检查到典型的真菌孢子。本次研究中仅 3 例确诊, 并且在光镜下同一位点同时发现。真菌孢子通常表现为直径 $10\mu\text{m}\sim 15\mu\text{m}$ 的圆形或椭圆形球体, 检查中应与棘阿米巴的包囊仔细区分, 棘阿米巴包囊通常直径较真菌孢子大, 典型的包囊具有双层囊壁^[4]。

3. 菌丝、孢子分布密度的相关性分析

在本研究中, 我们观测到活体角膜组织中菌丝的分布密度与炎性细胞分布密度呈负相关。Vemuganti 等在病理角膜组织切片证实真菌菌丝分布密度与炎性细胞分布密度呈负相关^[5]。与我们在共焦显微镜下活体角膜组织中观察到的结果相一致。在一些图像中我们可见单核巨噬细胞与菌丝的黏附现象。从而我们可以推测单核巨噬细胞对菌丝的吞

噬作用。Diamond 证实,白色念珠菌的产物可释放特异性作用于多形核巨细胞 (PMN) 的物质,抑制多形核巨细胞 (PMN) 的趋化、吸附及吞噬作用^[6]。可以解释角膜组织中菌丝分布密度与炎性细胞分布密度的负相关性,与此有一定关系。

4. 共焦显微镜下真菌菌丝、孢子的鉴别诊断

(1) 真菌菌丝与角膜基质神经及纤维条索的鉴别:直长的线状菌丝容易与角膜基质神经相混淆。菌丝是在相对暗的背景下较亮的线状形态,多数可见菌丝的分隔,弥漫分布,相互交织,一般直径 < 6 μm ,而角膜基质中的神经分布有一定规律,多呈 Y 或倒 Y 形分支,走行一般呈上下垂直方向,直径较粗 10~15 μm 。角膜组织修复期可见一些纤维条索与菌丝相似,纤维条索通常反光度低于菌丝,直线经过且边界模糊,其周围少见炎性细胞。

(2) 短段状菌丝与角膜活化细胞的鉴别:在真菌性角膜炎患者的角膜组织中常可见活化的角膜细胞,其细胞核伸长,不规则排列,应仔细与短、段状菌丝区分。活化的角膜细胞核常呈梭形,长度 < 30 μm ,其周围有正常的尖角形、长棒槌形正常角膜细胞。

(3) 真菌孢子与棘阿米巴包囊的鉴别:真菌孢子与棘阿米巴包囊形态相近,难与不典型棘阿米巴

包囊鉴别。一般情况下棘阿米巴包囊的直径略大于孢子;另外,棘阿米巴角膜炎通常伴有放射性神经炎,可见角膜神经纤维的肿胀、增粗及角膜接触镜佩带史,综合分析可予以鉴别。

当然,我们仅仅是真菌性角膜炎的共焦显微镜图像特征的初步分析,更多的信息有待于我们进一步的研究。

参考文献

- 1 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.中华眼科杂志,2005,41:614-619
- 2 Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, et al. Normal human corneal cell population evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. Cornea, 1998, 17: 485-492
- 3 Hollingsworth J, Perz-Gonez I, Mutabib HA, et al. A population study of the normal cornea using an in vivo slit scanning confocal microscopy. Optom Vis Sci, 2001, 78: 706-711
- 4 Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, et al. Confocal microscopy findings of acanthamoeba keratitis. Am J Ophthalmol, 1996, 121: 119-128
- 5 Vemuganti GK, Garg P, Gopinathan V, et al. Evaluation of agent and host factors in progression of mycotic keratitis: a histologic and microbiologic study of 167 corneal buttons. Ophthalmology, 2002, 109: 1538-1546
- 6 吴绍溪,郭宁如,廖万清,等.真菌病诊断治疗学,第一版,北京,北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997,53

(收稿时间:2007-01)