

# 实验室诊断技术在真菌性角膜炎诊断敏感性的对比研究

陈鹏飞, 秦晓怡, 毛丽萍, 王友沛, 王大选, 郑美琴

作者单位: (325027) 中国浙江省温州市, 温州医科大学附属眼视光医院临床检查中心

作者简介: 陈鹏飞, 男, 检验师, 研究方向: 临床微生物学的实验室诊断技术及其应用。

通讯作者: 郑美琴, 主任技师, 硕士研究生导师, 研究方向: 微生物学检查、血液学检查。zmqlyllh@126.com

收稿日期: 2015-04-30 修回日期: 2015-07-15

## Comparison on the sensitivity of laboratory diagnosis technology in the diagnosis of fungal keratitis

Peng-Fei Chen, Xiao-Yi Qin, Li-Ping Mao, You-Pei Wang, Da-Xuan Wang, Mei-Qin Zheng

Clinical Examination Center, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Eye Hospital of Zhejiang Province, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

**Correspondence to:** Mei-Qin Zheng. Clinical Examination Center, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Eye Hospital of Zhejiang Province, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. zmqlyllh@126.com

Received: 2015-04-30 Accepted: 2015-07-15

### Abstract

• **AIM:** To analyze the correlation and clinical significance of fungal smear, fungal culture and pathological examination in the diagnosis of fungalkeratitis.

• **METHODS:** One hundred and ten cases (110 eyes) with fungal keratitis from January 2012 to December 2014 were collected. The results of fungal smear, fungal culture and pathological examination results were analyzed retrospectively. Fungal smear was detected by 10% KOH wet microscopy and gram staining microscopy. Fungal culture was used potato dextrose agar (PDA) medium. The specimens of pathological examination were from corneal transplantation surgery. paraffin section, HE and hexamine silver and PAS staining was used in the pathological examination.

• **RESULTS:** Of the 110 cases of fungal keratitis, fungal smear positive were observed in 50 cases (45.5%), fungal culture positive were observed in 55 cases (50.0%); pathological examination positive were observed in 88 cases (80.0%). Fifty cases were both fungal smear and pathological examination positive and 22 cases were both fungal smear and pathological

examination negative. The coincidence rate of fungal smear and pathologic examination was 65.5%. Fifty-five cases were both fungal culture and pathological examination positive and 22 cases were both fungal culture and pathological examination negative. The coincidence rate of fungal culture and pathologic examination was 70.0%. In the 60 cases of fungal smear negative results, 38 cases (63.3%) were confirmed positive through pathological examination. In the 55 cases of fungus culture negative results, 33 cases (60.0%) were confirmed positive by pathological examination.

• **CONCLUSION:** The accuracy of pathological examination is the highest. The combined application of fungal smear, fungal culture and pathological examination can improve the diagnostic accuracy of fungal keratitis.

• **KEYWORDS:** keratitis; fungal; fungal smear; fungal culture; pathological examination

**Citation:** Chen PF, Qin XY, Mao LP, *et al.* Comparison on the sensitivity of laboratory diagnosis technology in the diagnosis of fungal keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(8):1322-1326

### 摘要

**目的:** 分析真菌涂片、真菌培养和病理检查在诊断真菌性角膜炎上的相关性及其临床意义。

**方法:** 收集 2012-01/2014-12 诊断为真菌性角膜炎的患者 110 例 110 眼, 对真菌涂片、真菌培养及病理检查结果进行回顾性分析总结。真菌涂片行角膜刮片, 用 10% 氢氧化钾制成湿片镜检, 同时行革兰染色镜检; 真菌培养采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 培养; 病理检查的标本为角膜移植切除手术标本, 采用石蜡切片, 使用苏木素-伊红 (HE)、六胺银、过碘酸-雪夫 (PAS) 染色镜检。

**结果:** 真菌涂片阳性者 50 例 (45.5%); 真菌培养阳性者 55 例 (50.0%); 病理检查阳性者 88 例 (80.0%)。真菌涂片与病理检查均为阳性者 50 例, 真菌涂片与病理检查均阴性者 22 例, 真菌涂片与病理检查的符合率为 65.5%。真菌培养与病理检查均为阳性者 55 例, 真菌培养与病理检查均阴性者 22 例, 真菌培养与病理检查的符合率为 70.0%。真菌涂片结果阴性者 60 例中, 有 38 例经病理检查确诊为阳性, 占 63.3%; 真菌培养结果阴性者 55 例中, 有 33 例经病理检查确诊为阳性, 占 60.0%。

**结论:** 病理检查的敏感性最好, 真菌涂片、真菌培养及病理检查联合应用能够提高真菌性角膜炎的诊断水平, 降低漏诊、误诊。

**关键词:** 眼感染; 真菌性; 真菌涂片; 真菌培养; 病理检查

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.8.05

引用: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.国际眼科杂志 2015;15(8):1322-1326

## 0 引言

真菌性角膜炎是一种致盲率较高、治疗较棘手的感染性眼部疾病<sup>[1,2]</sup>。因此,快速、准确的病原学诊断是真菌性角膜炎及时、合理、有效治疗的前提,目前真菌性角膜炎的诊断通常建立在详细的病史询问、裂隙灯显微镜检查、激光扫描共焦显微镜检查、真菌涂片检查、真菌培养、病理检查等。但这些单独检查均有各自的局限性,如真菌涂片检查简便、快捷,可快速初步确立诊断,但其假阴性率较高。真菌培养法是真菌性角膜炎诊断的金标准<sup>[2]</sup>,但其培养周期较长,难以实现早期确诊。病理检查的阳性检出率较高,但病理标本往往是术中或术后标本,手术所需费用也较高,且无法为临床提供合理用药依据。本文着重分析真菌涂片、真菌培养及病理检查这三种实验室诊断技术在真菌性角膜炎诊治上的优缺点及临床应用,并探讨联合多种实验室诊断技术提高真菌性角膜炎的诊断水平,为诊断真菌性角膜炎提供更加全面、准确的临床治疗依据,从而为患者争取治疗时间。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 收集 2012-01/2014-12 温州医科大学附属眼视光医院 110 例 110 眼临床诊断为真菌性角膜炎的真菌涂片、真菌培养及病理检查结果(该 110 例患者均行有真菌涂片、真菌培养、病理检查三种实验室诊断方法)。110 例 110 眼患者中,男 81 例 81 眼,女 29 例 29 眼,男女比例约 3:1,年龄 19~82(平均 58±12)岁;农民 70 例,非农民 40 例;50 例患者发生在右眼,60 例患者发生在左眼;植物性眼外伤 58 例 58 眼,其他眼外伤原因 46 例 46 眼,6 例 6 眼角膜移植术后(其中 2 例为板层角膜移植术后,4 例为穿透性角膜移植术后)。74 眼术前视力为手动/眼前~0.05,29 眼前视力有光感,7 眼前视力无光感。

**1.2 方法** 涂片检查:由专业人员无菌刮取患者角膜溃疡基底部和边缘组织,制成两张片,一张滴加 10% KOH 制成湿片高倍镜下镜检,另一张涂片自然晾干并经火焰固定后,行革兰染色,在油镜下观察。培养鉴定:在无菌刮片同时,将刮取的角膜标本直接接种于马铃薯葡萄糖培养基上,置 30℃ 霉菌培养箱,培养 7d,每天记录真菌生长情况,接种 7d 仍无真菌生长者视为阴性。培养阳性者利用菌落特征、颜色、镜下真菌菌丝结构、分生孢子形态等进行菌种鉴定。病理检查:经 4% 甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋,4μm 切片 3 张,分别采用 HE、六胺银、PAS 染色镜检(六胺银染色经切片脱蜡,蒸馏水洗;50g/L 铬酸溶液氧化 1h,蒸馏水洗;10g/L 亚硫酸氢钠溶液浸润 1min,蒸馏水洗;六胺银加热到 60℃ 染色 1h,蒸馏水洗;1g/L 氯化金调色 5min,蒸馏水洗;20g/L 硫代硫酸钠浸润 2min,蒸馏水洗。HE 染色:脱水透明,封片,观察有无呈黑褐色的真菌。PAS 染色经切片脱蜡,蒸馏水洗;5g/L 高碘酸浸染 10min,蒸馏水洗;雪夫试剂避光浸染 20min,蒸馏水洗;5g/L 偏亚硫酸氢

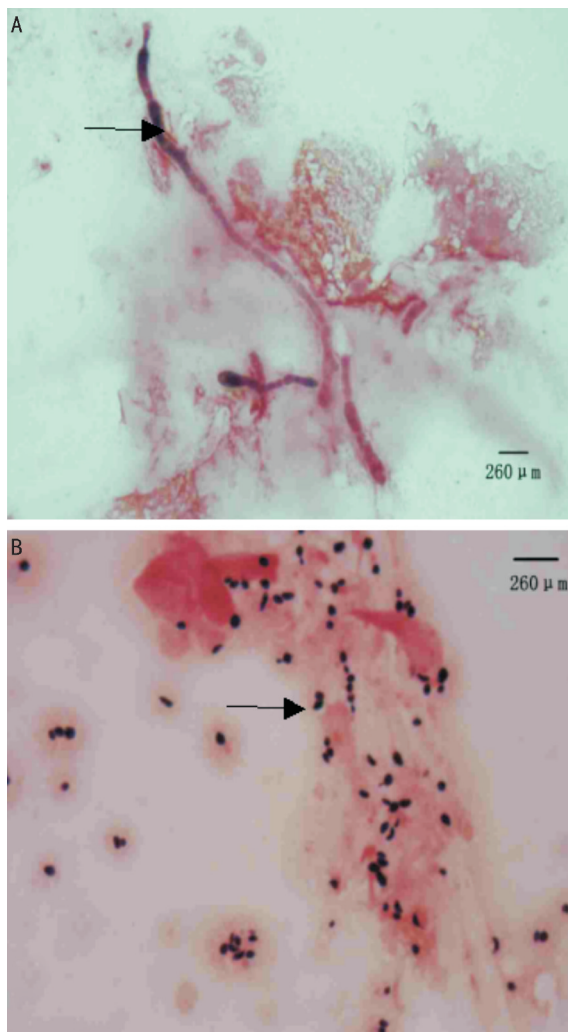


图 1 真菌涂片检查结果表现 A:真菌涂片镜检可见染为紫红色,菌丝壁和中隔透明不着色,有 1 个或多个核染成蓝紫色的真菌菌丝(箭头,革兰染色,×1000);B:真菌涂片镜检可见卵圆形、椭圆形、短棒状且大小不一,革兰染色为深紫红色的真菌孢子(箭头,革兰染色,×1000)。

钠溶液清洗,自来水冲洗 10min;脱水透明,封片,观察有无呈紫红色的真菌)。

统计学分析:数据采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行统计学分析,统计学方法采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三种实验室诊断方法的检查表现

**2.1.1 真菌涂片检查结果** 角膜病变组织刮片镜检时可观察到细丝管样结构,10% KOH 湿片下角膜坏死组织溶解,高倍镜下可见透明有折光的真菌菌丝、孢子;革兰染色可见真菌菌丝壁透明不着色,核呈蓝紫色,且有 1 个或多个细胞核(图 1A)。有 1.0% 的标本可检出真菌孢子<sup>[3]</sup>,镜检时可观察到卵圆形、短棒状,大小不一,革兰染色呈深紫红色的孢子(图 1B)。

**2.1.2 真菌培养检查结果** PDA 平板上可观察到淡红色菌落、黑色菌落、绿色菌落等。镜检时根据孢子形态、大小、结构等可鉴定到属。其中 29 例为镰刀菌(图 2A),14 例霉菌(图 2B),5 例酵母菌(图 2C),5 例链格孢(图 2D),



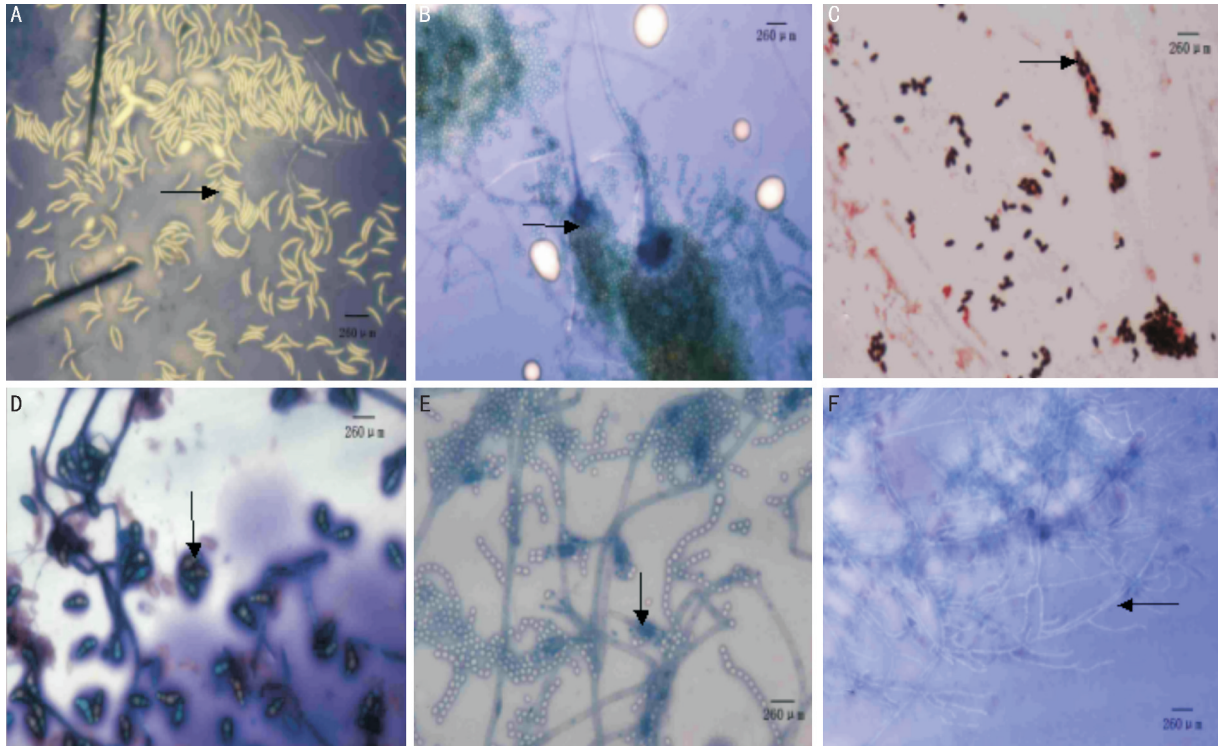


图2 真菌培养检查结果表现 A:镜检可见光滑、透明呈镰刀状的分生孢子(箭头,美兰染色,×1000);B:镜检可见呈疏松、放射状的球形分生孢子(箭头,美兰染色,×1000);C:镜检可见卵圆形、椭圆形、短棒状深紫红色的真菌孢子(箭头,革兰染色,×1000);D:镜检可见壁厚光滑、淡橄榄色、卵圆、砖格状的孢子(箭头,美兰染色,×1000);E:镜检可见从基质长出的呈柱状的分生孢子链(箭头,美兰染色,×1000);F:镜检可见呈丝状的真菌菌丝,未见孢子(箭头,美兰染色,×1000)。

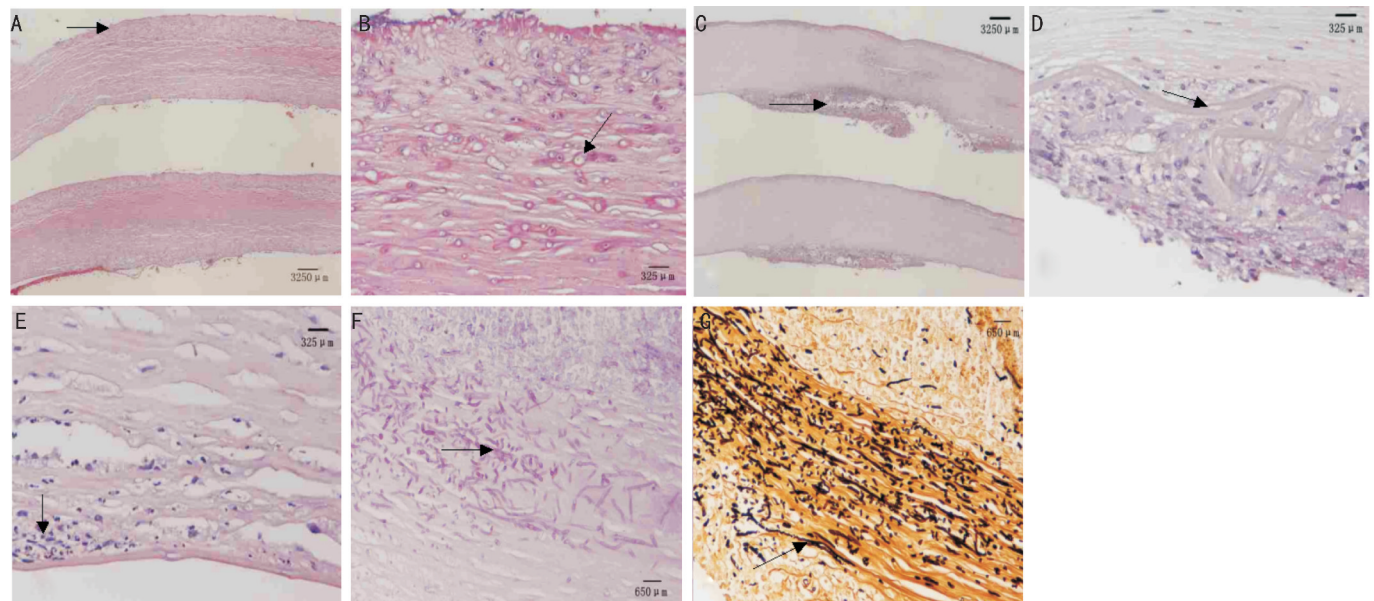


图3 病理检查结果表现 A:镜检可见角膜表面有溃疡,溃疡表面及下方基质层内可见不同程度的大量中性粒细胞浸润与真菌菌丝浸润(箭头,HE染色,×40);B:镜检可见角膜表面有溃疡,溃疡表面及下方基质层内可见不同程度的大量中性粒细胞浸润与真菌菌丝浸润(箭头,HE染色,×400);C:镜检可见角膜表面无病变,基质中、深层可见坏死、大量中性粒细胞浸润与真菌菌丝浸润(箭头,HE染色,×40);D:镜检可见角膜表面无病变,基质中、深层可见坏死、大量中性粒细胞浸润与真菌菌丝浸润(箭头,HE染色,×400);E:镜检可见角膜后弹力层真菌菌丝浸润(箭头,HE染色,×400);F:PAS染色见真菌呈颜色深浅不一的紫红色(×200);G:六胺银染色见真菌呈棕色至黑褐色(×200)。

1例青霉菌(图2E),1例丝状真菌(未定型,图2F)。  
**2.1.3 病理检查结果** 染色结合 HE、六胺银、PAS,部分角膜切除标本显示角膜表面有溃疡,溃疡表面及下方基质层内可见不同程度的大量中性粒细胞浸润与真菌菌丝浸润(图3A,3B);部分角膜切除标本显示角膜表面无病变,基

质中、深层可见坏死、大量中性粒细胞浸润与真菌菌丝浸润(图3C,3D);部分角膜后弹力层可见真菌菌丝浸润并穿过后弹力层到前房内(图3E)。六胺银、PAS染色可见大部分真菌菌丝逐步向深部实质层扩散或垂直于角膜板层纤维生长(图3F),也可见在角膜基质层内平行于板层



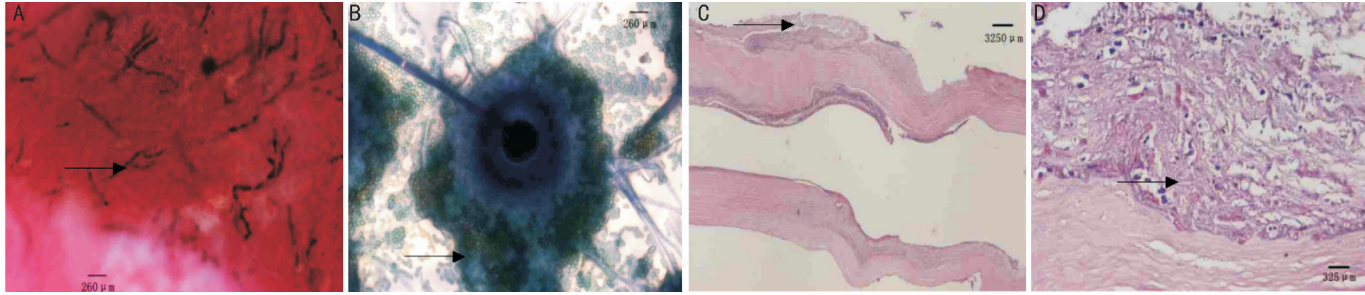


图4 霉菌感染真菌性角膜炎患者的真菌涂片镜检、真菌纯培养镜检、病理检查的检查表现 A:真菌涂片镜检可见染为深紫红色的真菌菌丝(箭头,革兰染色, $\times 1000$ );B:真菌纯培养镜检可见呈疏松、放射状的球形分生孢子(箭头,美兰染色, $\times 1000$ );C:病理检查见局部角膜上皮、前弹力层及浅层基质坏死脱落,其下基质浅中层见大片坏死伴较多中性粒细胞浸润,表层见大量真菌菌丝浸润,局部后弹力层前基质大片变性、坏死伴少量中性粒细胞浸润,内表面大量炎性渗出(HE染色, $\times 40$ );D:病理检查见局部角膜上皮、前弹力层及浅层基质坏死脱落,其下基质浅中层见大片坏死伴较多中性粒细胞浸润,表层见大量真菌菌丝浸润,局部后弹力层前基质大片变性、坏死伴少量中性粒细胞浸润,内表面大量炎性渗出(HE染色, $\times 400$ )。

纤维(图3G),穿透角膜后弹力层导致角膜穿孔和真菌性眼内炎,角膜呈现全层炎细胞浸润组织坏死病理改变。

**2.1.4 特殊病例** 霉菌感染真菌性角膜炎患者1例的三种不同实验室诊断方法的具体检查表现见图4。

## 2.2 三种实验室诊断方法结果的一致性比较

**2.2.1 真菌涂片检查与病理检查的一致性比较** 临床诊断为真菌性角膜炎110例中,真菌涂片阳性50例(45.5%),病理检查阳性88例(80.0%),将病理检查与真菌涂片检查的阳性率进行比较,差异有显著统计学意义( $\chi^2 = 28.074, P < 0.01$ )。真菌涂片与病理检查均为阳性者50例,阳性符合率为45.5%(50/110),真菌涂片与病理检查均阴性者22例,阴性符合率20.0%(22/110),真菌涂片与病理检查的总符合率为65.5%(72/110)。真菌涂片结果阴性的60例中,有38例经病理检查确诊为阳性,占63.3%。没有发现病理检查阴性而真菌涂片阳性的患者。

**2.2.2 真菌培养检查与病理检查的一致性比较** 临床诊断为真菌性角膜炎110例中,真菌培养阳性55例(50.0%),病理检查阳性88例(80.0%),将病理检查与真菌培养检查的阳性率进行比较,差异显著( $\chi^2 = 21.758, P < 0.01$ )。真菌培养与病理检查均为阳性者55例,阳性符合率为50.0%(55/110),真菌培养与病理检查均阴性者22例,阴性符合率20.0%(22/110),真菌培养与病理检查的总符合率为70.0%(77/110)。真菌培养结果阴性的55例中,有33例经病理检查确诊为阳性,占60.0%。没有发现病理检查阴性而真菌培养阳性的患者。

**2.2.3 真菌涂片检查与真菌培养检查的阳性率比较** 将真菌涂片检查与真菌培养检查的阳性率进行比较,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.455, P = 0.500$ )。

## 3 讨论

近年来,真菌性角膜炎的发病率有所增加<sup>[4,5]</sup>。在我国,真菌性角膜炎的发病率更是有逐年增多的趋势<sup>[6]</sup>,其导致角膜穿孔的可能性是细菌性角膜炎的5~6倍<sup>[7]</sup>,这引起越来越多的眼科医师的重视。本研究发现真菌培养检出菌株以镰刀菌最常见,霉菌次之,这与国内外多篇文献报道相吻合。Gopinathan等<sup>[8]</sup>研究中,南印度眼部感染的真菌以镰刀菌最常见,占37.2%,其次是曲霉属,占

30.7%;鹿秀海等<sup>[9]</sup>国内报道中镰刀菌占63.2%,曲霉属占14.1%。经我们研究发现,来我们所在医院就诊的真菌性角膜炎患者多有稻草、板栗、玉米等农作物划伤刺伤等外伤史,而镰刀菌、曲霉等真菌正是自然环境中比较常见的腐生菌,也是重要的植物病原菌<sup>[10]</sup>。本研究观察的110例患者大多来自农村,由于频繁地参与农业活动,极大增加了被植物枝叶划伤割伤角膜从而导致真菌性角膜炎的概率<sup>[11]</sup>。这就要求我们对农民一定要做好宣教工作,日常耕作时一定要做好防护措施。由于真菌性角膜炎在我国的高发性及危害性,若诊断及治疗不及时,将会导致角膜穿孔、失明,更严重者行眼球摘除术<sup>[12]</sup>。因此,尽早诊断真菌性角膜炎显得非常重要,根据角膜病史和角膜病灶的特点虽可以做出初步诊断<sup>[13]</sup>,但是需要实验室检查来支持诊断。

直接涂片镜检方法简便、快捷,可快速初步确立诊断,但阳性检出率最低。真菌培养是目前鉴定真菌的有效方法,且其体外药物敏感试验为临床合理用药提供了理论参考。但是真菌培养耗时较长(3d~1wk)。本研究中单独病理检查的阳性率为80.0%,真菌培养阳性率为50.0%,真菌涂片阳性率为45.5%,病理检查较真菌涂片和真菌培养有更高的敏感性。病理检查还能够确诊真菌性角膜炎,能够明确真菌在角膜内的生长情况,但病理组织学结合特殊染色无法鉴定真菌,也无法为临床提供合理用药依据,且病理标本往往是术中或术后标本,无法做到快速诊断,手术所需费用也较高,医疗单位中的普及率及开展难易度都不如涂片与培养。因此,联合多种实验室诊断技术能够提高真菌性角膜炎的诊断水平,为诊断真菌性角膜炎提供更加全面、准确的临床治疗依据,从而为患者争取治疗时间。有文献指出角膜炎患者(包括细菌性角膜炎和真菌性角膜炎)应同时做涂片和培养检查<sup>[14]</sup>,以提高诊断准确率,进而尽快地缩短角膜炎的病程,这从侧面肯定了以上这一结论。

真菌涂片或真菌培养阳性而病理检查阴性的情况在本研究中不存在,进一步说明了病理检查较真菌涂片和真菌培养有更高的敏感性。这与部分真菌性角膜炎患者的病灶在深层不在表面,导致临床取材不到位,造成真菌涂

片及真菌培养假阴性,而病理检查都是手术标本,取材较深入,阳性检出率较高;第二个原因是一部分真菌性角膜炎患者经过药物治疗,病情康复,此时真菌涂片及病理检查或可见残留的真菌菌丝,但真菌培养则无法培养出菌株。除了技术原因外,是否还与不同真菌具有不同的侵袭力有关<sup>[15]</sup>,这有待进一步研究。本文列举霉菌感染真菌性角膜炎患者的三种不同实验室诊断方法的不同表现,其他不同真菌菌种感染导致的真菌性角膜炎是否有不同、特殊的检查表现还有待进一步研究。

分子诊断技术由于其高度的敏感性,且其诊断所需时间较短(4~8h),已得到越来越多的关注<sup>[16]</sup>。但是,分子诊断技术对实验室设备要求较高,在基层医疗单位还不能得到普及<sup>[17]</sup>。临床医师应根据实际情况,结合多种实验室诊断技术以提高真菌性角膜炎的诊断水平,为患者争取治疗时间。通过本次研究,将有助于临床医生了解真菌性角膜炎的实验室诊断技术的特点。

#### 参考文献

- 1 Pellegriano F, Carrasco MA. Argon laser phototherapy in the treatment of refractory fungal keratitis. *Cornea* 2013;32(1):95-97
- 2 Al-Badriyeh D, Neoh CF, Stewart K, et al. Clinical utility of voriconazole eye drops in ophthalmic fungal keratitis. *Clin Ophthalmol* 2010;6(4):391-405
- 3 王楠,赵桂秋,高昂,等. 刮片镜检法联合激光扫描共焦显微镜快速诊断真菌性角膜炎的临床评价. *中华实验眼科杂志* 2013;5(31):493-495
- 4 Badiee P, Alborzi A, Nejabat M. Detection of aspergillus keratitis in ocular infections by culture and molecular method. *Int Ophthalmol* 2011;31(4):291-296
- 5 Sonogo-Krone S, Sanchez-Di Martino D, Ayala-Lugo R, et al. Clinical results of topical fluconazole for the treatment of filamentous fungal keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(7):782-787

- 6 Xuguang S, Zhixin W, Zhiqun W, et al. Ocular fungal isolates and antifungal susceptibility in northern China. *Am J Ophthalmol* 2007;143(1):131-133
- 7 Keay LJ, Gower EW, Iovieno A, et al. Clinical and microbiological characteristics of Fungal Keratitis in the United States, 2001-2007: A Multicenter Study. *Ophthalmology* 2011;118(5):920-926
- 8 Gopinathan U, Garg P, Fernandes M, et al. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care center in South India. *Cornea* 2002;21(6):555-559
- 9 鹿秀海,高彦,张莉,等. 真菌性角膜炎 334 例的病原学分析. *中华眼科杂志* 2013;49(1):12-15
- 10 贺丹,万雪,高嵩,等. 真菌性角膜炎的病原学分析及鉴. *中华微生物学和免疫学杂志* 2014;34(1):19-22
- 11 Gopinathan U, Sharma S, Garg P, et al. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol* 2009;57(4):273-279
- 12 杨燕宁,但婧,宋秀胜,等. 恩施地区外伤性真菌性角膜炎回顾性分析. *中华眼外伤职业眼病杂志* 2014;36(6):420-422
- 13 武鹏安,阎艳,催家瑞. 真菌性角膜炎两中特殊染色辅助诊断的比较. *国际眼科杂志* 2011;11(6):1076-1077
- 14 Bhadange Y, Sharma S, Das S, et al. Role of liquid culture media in the laboratory diagnosis of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol* 2013;156(4):745-751
- 15 马林,谢立信,董晓光,等. 白色念珠菌胞外磷脂酶 B 在兔角膜真菌感染中毒力作用的研究. *中华眼科杂志* 2008;44(8):237-243
- 16 Eleinen KG, Mohalhal AA, Elmekawy HE, et al. Polymerase chain reaction-guided diagnosis of infective keratitis—a hospital-based study. *Curr Eye Res* 2012;37(11):1005-1011
- 17 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. *Ophthalmic Res* 2010;44(4):251-256