

棘阿米巴角膜炎病原学诊断技术的研究进展[▲]

赵 丽¹ 梁 东² 蒋 洁¹ 蓝倩倩¹

(1 广西壮族自治区人民医院,广西南宁市 530021;2 广西中医药大学,广西南宁市 530200)

【摘要】 棘阿米巴角膜炎(AK)是一种由棘阿米巴原虫感染引起的严重危害视力的,疼痛性、顽固性、进行性角膜损伤性眼病。诱发因素主要有角膜接触棘阿米巴原虫污染水源、眼部外伤、角膜接触镜佩戴不当等。AK 如未早期诊断和及时治疗,可导致永久性视力丧失。AK 主要根据病史、临床症状和病原学检查进行诊断,其中病原学检查是确诊 AK 的“金标准”。病原学检测方法包括角膜组织刮片的镜检法、培养法、分子生物学技术、免疫学检测及体内共聚焦显微镜技术等。本文就近年来国内外 AK 病原学诊断技术的研究进行综述。

【关键词】 棘阿米巴角膜炎;棘阿米巴原虫;病原学;诊断技术

【中图分类号】 R 770.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-6575(2023)04-0517-05

DOI:10.11864/j.issn.1673.2023.04.24

棘阿米巴角膜炎(acanthamoeba keratitis, AK)是一种少见的角膜感染性疾病,具有致盲性、难治愈、易复发、慢性和进行性等特点。近年来随着角膜正畸学的迅速发展及实验室诊断技术的不断提高,AK 的检出率呈上升趋势^[1]。AK 是由广泛分布于自然界的棘阿米巴原虫感染引起,主要与眼部接触被污染的水源、植物性外伤、角膜接触镜佩戴不当等因素有关^[2]。发达国家主要以佩戴角膜接触镜感染为主^[1],发展中国家主要以外伤和接触污染水源为主^[3]。角膜外伤和污水入眼是我国 AK 患者的主要发病原因,随着角膜接触镜的普及,我国因佩戴接触镜引起的 AK 发病率呈逐年上升趋势^[4]。由于 AK 的早期临床症状不典型,主要为畏光、眼睛红肿、流泪、视力下降、剧烈眼痛,易被误诊为真菌性角膜炎或病毒性角膜炎^[5]。AK 发病初期表现为浅表性角膜炎,呈慢性或亚急性进行性进展,AK 晚期溃疡可达深基层,如未及时治疗,溃疡会发展至穿孔。因此,准确、快速地诊断 AK 对于成功治疗和良好预后至关重要。AK 的诊断主要根据病史、临床症状及病原学检查,其中病原学检查是 AK 诊断的主要依据^[6]。现就 AK 病原学诊断技术的研究进展综述如下。

1 病原生物学特征

棘阿米巴原虫为自由生活原虫,广泛分布于自然

界,如自然水源、空气悬浮颗粒、土壤、游泳池、污水管道、自来水处理系统、空调系统等,甚至可以从正常人的口腔及鼻黏膜中分离出来。棘阿米巴原虫为条件病原体,可引起肉芽肿性阿米巴脑炎、棘阿米巴角膜炎,也与皮肤损害和鼻窦炎有关^[1]。目前发现的棘阿米巴属有 17 种,其中引起感染的主要有 7 种,分别为 *A. castellanii*、*A. Astronyxis*、*A. culbertsoni*、*A. polyphaga*、*A. rhyssodes*、*A. palestinensis* 及 *A. hatchetti*^[7]。棘阿米巴原虫有 22 种基因型(T1 ~ T22),超过 85% 的 AK 与 T4 基因型相关^[8]。

棘阿米巴原虫为单细胞寄生虫,与专性寄生虫不同,致病性棘阿米巴原虫可以在不进入人类或动物宿主的情况下完成生命周期,其生活史包括滋养体和包囊两种形态。滋养体可机会性寄生于人体角膜,是棘阿米巴原虫的活动期形式,通过二分裂增殖,直径为 20 ~ 40 μm ,类圆形或不规则形,细胞质内含 1 个胞核和多个收缩泡、食物泡、线粒体、内质网、核糖体、高尔基复合体、溶酶体、脂滴等,核仁周围有透明带环绕^[7]。运动时棘阿米巴原虫多方向放射出透明的棘状或叶状突起,此时颗粒物质会流动至突起部位,虫体从突起的前端向侧方向缓慢蠕动。包囊是棘阿米巴原虫的保护形态,分为三个阶段:包囊前期、未成熟包囊期和成熟包囊期。成熟包囊期具有明显的双层囊壁,直径为 11 ~ 25 μm ,类圆形、三角形、星形或多边形,外囊壁褶皱,主要由蛋白质和多糖组成;内囊壁主要由纤维素组成^[9]。在囊化过程中,棘阿米巴滋养体经历相当大的脱水,导致细胞质体积缩小约 80% ,

▲ 基金项目:广西自然科学基金项目(编号:2021GXNSFBA075051);广西卫健委自筹经费科研课题(编号:Z2015329)

表面积减少超 65%^[10],外囊壁和内囊壁汇合可形成 1 个或数个有盖膜的棘孔。在适宜条件下棘阿米巴原虫从棘孔伸出棘突脱囊形成滋养体。

2 AK 病原学诊断

临床检查及病原学检查是 AK 诊断的主要依据,根据相关指南^[11],感染性眼病的诊断在培养、分子诊断学及免疫学检测前均应进行病原学涂片检查,遵循“即刻涂片、即刻送检、床旁接种”的原则。角膜标本由具有临床经验的眼科医师在裂隙灯显微镜下使用无菌手术刀片或无菌刮铲轻柔刮取,即刻涂片并床旁接种于相应培养基。角膜组织和活检标本建议使用手术刀片或无菌剪刀切碎后再接种^[12]。

2.1 角膜刮片镜检

2.1.1 湿片法镜检 生理盐水湿片法和氢氧化钾 (KOH) 湿片法都可用于棘阿米巴滋养体和包囊的快速检查。生理盐水湿片法适用于观察滋养体的运动情况,但组织细胞堆积时需注意上皮细胞与棘阿米巴包囊的鉴别^[13]。KOH 可以消化组织细胞,使棘阿米巴原虫清晰可见。取角膜刮片涂于载玻片上,加 1 滴生理盐水或 10% KOH 溶液,加盖玻片压薄后在普通光学显微镜下观察^[14],镜下可观察到棘阿米巴的四个不同阶段^[12],其滋养体呈不规则形,移行时形状容易发生变化,胞质内的颗粒物质可随滋养体的变形而运动。包囊前期尚未形成双层囊壁,胞质内的较粗大颗粒物质较为活跃而不停颤动;成熟包囊期静止呈类圆形,有内外囊壁双层结构;空囊期呈皱缩状、无内容物,多见于抗阿米巴治疗后。

2.1.2 染色镜检 湿封片对内部结构的观察不够明显,利用染色技术可使棘阿米巴包囊或滋养体易于识别,染色可分为湿式染色和干式染色。湿式染色将约 25 μL 角膜刮片 (棘阿米巴) 悬浮液铺在载玻片上均匀涂开,然后加入 1 滴染色剂,加上盖玻片直接镜检。干式染色是将约 50 μL 角膜刮片 (棘阿米巴) 悬液滴在载玻片上均匀涂开,用无水甲醇固定再染色镜检。常规染色方法有吉姆萨染色、伊红染色、碘染色等,其中,革兰染色不适合棘阿米巴原虫。El-Sayed 等^[15]采用多属性评价方法对多种染色技术的效果进行综合对比,发现碘染色排名最高,其次是伊红染色、吉姆萨染色。笔者通过棘阿米巴原虫对 3 种染色方法进行了探索,发现用 1:2 碘液染色 3 min 的效果最佳。荧光色素染色剂能够结合棘阿米巴包囊中的纤维素,因而用荧光染色棘阿米巴可获得较高的灵敏度 (95%) 和特异度 (97%)^[16]。笔者在染色方法对比

实验中发现荧光染色的特异度最高,镜下特征最明显。但荧光染色需使用专用的荧光显微镜,染料成本昂贵,染色后荧光性会衰减消失不便于长久观察,且在混合真菌、棘阿米巴感染的情况下,2 种病原体均可染色,增加了鉴别难度,需要有经验的实验人员进行鉴定,以上因素均制约了荧光染色的广泛使用。对于可疑 AK 的角膜刮片染色镜检,笔者首推荧光染色,对于无条件的实验室推荐使用碘染色。

2.2 角膜组织培养 角膜刮片刮取溃疡浅表边缘组织,当棘阿米巴原虫数量较少时,镜检方法不易检出,为了提高检出率,应进行角膜组织培养。角膜组织培养出棘阿米巴原虫是确诊棘阿米巴原虫感染的“金标准”。1930 年 Castellani^[17] 在实验中发现阿米巴原虫可以消耗细菌和酵母菌,从而建立了体外培养自由生活阿米巴的方法。鹿秀海等^[18]用 100 g 纯化琼脂加 1 000 mL 蒸馏水配制的无营养琼脂培养基,于培养基表面平铺一层活的大肠埃希菌液,再将角膜标本点种于琼脂中心,培养阳性率可达 77%,17 例阳性标本中 10 例培养 3 d 后可观察到包囊,6 例培养 5 d 后可见包囊,1 例 20 d 才观察到包囊。Yera 等^[19] 研究中,培养基培养的灵敏度为 66.7%,严重感染者培养 24~48 h 便可观察到包囊,用药后需延长培养时间 (可达 21 d) 或者会出现假阴性。棘阿米巴培养的灵敏度在较大程度上受样品质量的影响,Muino 等^[20] 建议使用改良勺状针头 (由智利 Dr. Rodrigo Donoso 带领的角膜学家团队研发的新方法),其可深入基质获得最佳角膜样本以增加培养阳性率,使用手术刀或常规针具取样无法获得有效的深层刮取,导致培养阳性率的可能偏低,而适用于细菌培养的棉签采集标本阳性率更低。角膜样本可以在加有活性大肠埃希菌无营养琼脂培养基或蛋白胨酵母葡萄糖液体培养基中进行培养,使用蛋白胨酵母葡萄糖液体培养基可离心培养基,然后取沉淀镜检,能更快地检出棘阿米巴^[21]。在培养基 pH 6.0、培养温度 25~30 $^{\circ}\text{C}$ 和加有大肠埃希菌的条件下培养 72 h,棘阿米巴原虫生长良好,活力较强,包囊多数转化成滋养体^[22]。棘阿米巴原虫在极酸 (pH 1.5)、极碱 (pH 10.0) 及 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下均不能存活^[23]。

2.3 病理组织检查 角膜活检被誉为“微生物进行性角膜炎的最终调查”,但对于角膜严重溃疡者,棘阿米巴原虫已侵入基质层,角膜刮片难以保证准确的阳性率而导致漏诊^[24]。角膜组织病理检查有助于 AK 的诊断,但对患者造成较大痛苦。行眼球摘除术或角膜移植术时,可将手术切除的角膜材料进行病理检

查。角膜材料应切碎后再进行苏木精 - 伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色, HE 染色将棘阿米巴包囊的囊壁和胞质染成紫色,但在实际应用过程中具有局限性,其无法对部分特殊结构进行染色区分。改良三色蓝染色法^[15]利用苯胺蓝取代亮绿,镜下棘阿米巴原虫胞质呈亮粉红色,背景为蓝色,具有鲜明对比。杜满等^[16]用荧光染色法诊断 AK,结果发现荧光染色的灵敏度高于 HE 染色和过碘酸雪夫染色(均 $P < 0.05$)。

2.4 分子生物学诊断 接受抗生素治疗的患者,其棘阿米巴原虫的密度通常较低,常规的涂片镜检和培养阳性率低,分子生物技术可作为一种必不可少的补充检测方法^[25]。靳雷等^[26]根据棘阿米巴基因组位于 229bp 区,利用特异性引物 5'GTT TGA GGC AAT AAC AGGT3'/5'GAA TTC CTC GTT GAA GAT 3'从 13 例疑似 AK 病例成功检测出 11 例棘阿米巴原虫感染,其中 5 例镜检发现棘阿米巴包囊。吴静等^[27]设计的多重 PCR 体系可同时诊断单纯疱疹病毒、真菌及棘阿米巴角膜炎。由于常规 PCR 需要提取标本 DNA,如病变部位取材量少会影响阳性的检出结果,袁青等^[28]探讨不用提取组织 DNA 扩增棘阿米巴虫株 18SrRNA 的序列,体现了直接 PCR 法在 AK 快速诊断中的可行性。Lorenzo-Morales 等^[25]使用 PCR 检测棘阿米巴属的基因特异性,数据显示大多数临床分离株属于 T4 基因型。PCR 具有灵敏度高、特异度高、标本需要量少、检测速度快等优点,但也具有一定的局限性。由于高灵敏度容易发生交叉污染,且不能区分临床样本中的活棘阿米巴和死棘阿米巴,因此难以确定角膜感染是否仍然存在,仅可用于鉴定棘阿米巴存在与否及其基因型。相对于 PCR,有研究^[29]采用高通量测序技术 (next-generation sequencing, NGS) 检测棘阿米巴原虫,其灵敏度和特异性分别为 88% 和 100%,并且还可对棘阿米巴原虫进行基因分型。但目前,NGS 受标本量、标本处理、核酸提取、文库制备及测序深度的影响,结果的准确性和特异度有待临床进一步验证,基于 NGS 诊断 AK 的报道仍有限^[12]。

2.5 免疫学诊断 活棘阿米巴原虫的培养和 PCR 扩增 DNA 已成为检测棘阿米巴原虫和诊断 AK 的主要方法。然而,角膜样本采集过程中造成的疼痛可能会使患者感到不适。业界需致力于开发一种非侵入性 AK 诊断方法,以准确、快速地鉴定棘阿米巴属,且不需要特殊专门的设备。由于棘阿米巴原虫分布广泛^[30],棘阿米巴特异性免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig)G 和 IgA 抗体可存在于健康人的血清和泪液中,

因此大多数人群血清抗棘阿米巴抗体反应呈阳性,这不利于棘阿米巴原虫感染的特异性检测。王月华等^[31]用 ELISA 法检测兔体内抗体,发现感染 14 d 后血清抗体水平逐渐升高,感染后 28 d 血清抗体含量最高,这与疾病发展进程时间相对应。近年来,多项研究^[32-34]报道了基于开发新的多克隆抗体的 AK 诊断方法,尽管这些发现强调了抗体对 AK 诊断的重要性,但尚未研究棘阿米巴原虫的特异性抗体与角膜炎其他病原体之间可能发生的种间相互作用,且仅有体外研究提示此类抗体具有高度敏感性,表明其在鉴别诊断 AK 中的潜在应用。Toriyama 等^[35]开发了一种基于免疫层析的荧光二氧化硅纳米颗粒检测试剂盒,用于 AK 快速诊断。易用性和快速性是该方法的主要优点,但此试剂盒对棘阿米巴包囊检测的灵敏度较低,且对棘阿米巴原虫检测的特异性有待进一步研究。目前,基于商品化抗体的 AK 诊断仍不可用,需进一步研究。在未来,基于免疫学诊断,角膜刮片样本采集的方法或被收集角膜细胞分泌物、泪液等其他非侵入性方法替代。

2.6 共聚焦显微镜活体诊断 共聚焦显微镜是一种非侵入性成像技术,可在数分钟内获得角膜各层的图像,直接显示角膜内的病原体,是近年来新发展的新型眼科检查设备,可从细胞水平观察角膜,具有无创性、清晰度好、放大率高等优点,在 AK 的诊断中具有较高的灵敏度和特异度^[36]。在检查前,将适量的表面麻醉剂滴入患者眼部下结膜穹窿进行麻醉,由眼科医生或技术员在角膜病灶中心和周围溃疡边缘进行多面扫描^[37]。棘阿米巴包囊主要见于上皮细胞和前间质,具有高亮圆形或椭圆形的高反光双壁特征,有时可观察到呈簇状或链状分布^[38]。研究^[36]表明共聚焦显微镜在 AK 的快速诊断、判断疾病的发展及治疗效果的监测有明显优势。共聚焦显微镜可识别棘阿米巴包囊明显的双壁,但不能准确区分白细胞和棘阿米巴滋养体^[39-40]。在早期 AK 病例中,虽然滋养体很活跃,可包囊的数量较少、图像不典型,通过共聚焦显微镜进行诊断非常困难^[41]。目前,推荐体内共聚焦显微镜和体外病原学联合检测快速诊断 AK。

2.7 新兴技术诊断 棘阿米巴原虫的 PCR 诊断灵敏度为 73.3% ~ 86.7%,特异性为 99.3% ~ 100%,而培养灵敏度仅为 66.7%^[19]。共聚焦显微镜需要在专家指导下或医师经过特定培训才能获得较高的灵敏度和特异度,且仅有棘阿米巴包囊能被很好地识别。为了避免疾病早期被误诊,需要新的诊断工具评估棘阿米巴原虫感染。Pastrana 等^[42]开发了一种基

于双模比色法的方法,使用金纳米颗粒能够快速、直观和准确地检测棘阿米巴,该方法通过肉眼可在20 min内检测出0.02 μm 和0.009 μm 的未扩增棘阿米巴基因组,并能使用智能手机进行颜色分析。此外,mil-kin[®]是一种使用智能手机的移动实验室显微镜,从采集样本到诊断仅需几分钟,且无需固定和染色即可1 000倍放大样本^[43]。此显微镜的应用在感染性角膜炎患者中检测和鉴定病原体值得期待。对于临床,除了确定感染病原体,还需确定包囊浸润的程度,以便更好地辅助临床治疗。一种新的角膜定位活检技术可以确定顽固性AK中棘阿米巴包囊浸润的程度^[24]。该方法可指导临床行角膜移植术时确定切除角膜组织的边缘范围,防止供体移植物的再次感染。根据临床和非临床棘阿米巴分离株的不同生化特征,高分辨率1H核磁共振波谱可以快速识别致病性棘阿米巴分离株,具有高灵敏度和特异度^[44],但此检测目前仅限于科研阶段。

3 小 结

AK是一种潜在的高危性角膜感染,早期诊断是成功治疗的关键。诊断AK具有挑战性,需联合多种诊断方法。角膜刮片简单易行但受取材深度的限制;培养法依旧是诊断的金标法,但所需时间较长;病理组织切片在角膜移植或行眼球摘除术时有较高的诊断价值;聚合酶链反应对实验室条件要求高且检测费用高;共聚焦显微镜和扫描成像设备昂贵且对检查人员要求高而未能普及。特异性抗体诊断和纳米颗粒是具有前景的筛查和快速诊断方法,与其相关的研究已取得了相当程度的进展。目前,我国仍缺乏大量可靠的流行病学资料,基层眼科医生及实验室人员对AK的病原学诊断缺乏经验导致误诊漏诊,希望未来有机会在专业学术活动中进行深入广泛的交流和培训,以提高AK的总体诊断水平。此外,还需积极开发新的具有良好灵敏度和特异度的诊断方法,在快速确诊的同时具有较好的成本效益。

参 考 文 献

- [1] McKelvie J, Alshiakhi M, Ziaei M, et al. The rising tide of Acanthamoeba keratitis in Auckland, New Zealand: a 7-year review of presentation, diagnosis and outcomes (2009 – 2016) [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2018, 46(6): 600 – 607.
- [2] Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoebaspp. as agents of disease in humans [J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(2): 273 – 307.
- [3] Sharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related Acanthamoeba keratitis [J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(10): 1103 – 1108.
- [4] 朱智勇,王敬亭,董燕玲,等. 棘阿米巴性角膜炎120例临床特征及治疗转归 [J]. 临床眼科杂志, 2020, 28(3): 228 – 232.
- [5] 李绍伟,谢立信,史伟云,等. 棘阿米巴性角膜炎误诊病例的回顾性研究 [J]. 中华眼科杂志, 2002(1): 21 – 23.
- [6] Rayamajhee B, Willcox MD, Henriquez FL, et al. Acanthamoeba keratitis: an increasingly common infectious disease of the cornea [J]. Lancet Microbe, 2021, 2(8): e345 – e346.
- [7] 吴忠道,诸欣平. 人体寄生虫学 [M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2015: 63 – 67.
- [8] Diehl MLN, Paes J, Rott MB. Genotype distribution of Acanthamoeba in keratitis: a systematic review [J]. Parasitol Res, 2021, 120(9): 3051 – 3063.
- [9] Garajová M, Mrva M, Vašková N, et al. Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for Acanthamoeba cyst wall architecture [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 4466.
- [10] Bowers B, Korn ED. The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment [J]. J Cell Biol, 1969, 41(3): 786 – 805.
- [11] Leal SM Jr, Rodino KG, Fowler WC, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Diagnosis of Ocular Infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2021, 34(3): e0007019.
- [12] 北京医学会检验分会. 感染性眼病的病原微生物实验室诊断专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(1): 14 – 23.
- [13] 王智群,李然,张琛,等. 阿米巴角膜炎刮片细胞学特征 [J]. 中华眼科杂志, 2010, 46(5): 432 – 436.
- [14] D'Aversa G, Stern GA, Jr Driebe WT. Diagnosis and successful medical treatment of Acanthamoeba keratitis [J]. Arch Ophthalmol, 1995, 113(9): 1120 – 1123.
- [15] El-Sayed NM, Hikal WM. Several staining techniques to enhance the visibility of Acanthamoeba cysts [J]. Parasitol Res, 2015, 114(3): 823 – 830.
- [16] 杜满,亓晓琳,刘廷,等. 荧光染色法对组织病理诊断棘阿米巴性角膜炎价值的研究 [J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(11): 1922 – 1926.
- [17] Castellani A. Acanthamoeba found in cultures of yeast: Preliminary note [J]. J Trop Med Hyg, 1930, 33: 160.
- [18] 鹿秀海,魏芳,姜丽红,等. 角膜感染棘阿米巴原虫的实验室培养 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(9):

1104 - 1105.

- [19] Yera H, Ok V, Lee Koy Kuet F, et al. PCR and culture for diagnosis of Acanthamoeba keratitis [J]. Br J Ophthalmol, 2021, 105(9): 1302 - 1306.
- [20] Muino L, Rodrigo D, Villegas R, et al. Effectiveness of sampling methods employed for Acanthamoeba keratitis diagnosis by culture [J]. Int Ophthalmol, 2019, 39(7): 1451 - 1458.
- [21] Peretz A, Geffen Y, Socea SD, et al. Comparison of Fluorescence Microscopy and Different Growth Media Culture Methods for Acanthamoeba Keratitis Diagnosis [J]. Am J Trop Med Hyg, 2015, 93(2): 316 - 318.
- [22] 许琴英,徐珠锦,邵正,等. 棘阿米巴角膜炎患者分离株在不同环境中的形态观察[J]. 广东医学院学报, 2015, 33(1): 56 - 58, 62.
- [23] 高敏,张琛,肖扬,等. 温度及酸碱度对角膜分离棘阿米巴虫株活性影响的实验研究[J]. 眼科研究, 2009, 27(8): 685 - 687.
- [24] Simpson A, Sarode D, Lockington D, et al. Novel Map Biopsy Technique to Define the Extent of Infection Before Penetrating Keratoplasty for Acanthamoeba Keratitis[J]. Cornea, 2023, 42(3): 365 - 368.
- [25] Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment[J]. Parasite, 2015, 22: 10.
- [26] 靳雷,井上美智子. 聚合酶链反应技术对棘阿米巴角膜炎诊断的临床应用[J]. 临床眼科杂志, 2003, 11(2): 124 - 125.
- [27] 吴静,胡东,杨小康,等. 多重 PCR 快速诊断单纯疱疹病毒、真菌及棘阿米巴角膜炎[J]. 广东医学, 2014, 35(15): 2317 - 2320.
- [28] 袁青,宋子成,孙士营,等. 直接 PCR 法对感染性棘阿米巴角膜炎的诊断价值[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 32(11): 1011 - 1015.
- [29] Holmgaard DB, Barnadas C, Mirbarati SH, et al. Detection and Identification of Acanthamoeba and Other Nonviral Causes of Infectious Keratitis in Corneal Scrapings by Real-Time PCR and Next-Generation Sequencing-Based 16S-18S Gene Analysis [J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(2): e02224 - e02220.
- [30] Wang M, Sun G, Sun Y, et al. Identification and Genotypic Characterization of Potentially Pathogenic Acanthamoeba Isolated from Tap Water in Wuxi, China [J]. Korean J Parasitol, 2018, 56(6): 615 - 618.
- [31] 王月华,李正花,陈琳,等. ELISA 法分析棘阿米巴角膜炎兔模型血清抗体的滴度[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(22): 3224 - 3225.
- [32] Kim MJ, Quan FS, Kong HH, et al. Specific Detection of Acanthamoeba species using Polyclonal Peptide Antibody Targeting the Periplasmic Binding Protein of A. castellanii [J]. Korean J Parasitol, 2022, 60(2): 143 - 147.
- [33] Lee HA, Chu KB, Kim MJ, et al. Chorismate mutase peptide antibody enables specific detection of Acanthamoeba [J]. PLoS One, 2021, 16(4): e0250342.
- [34] Kim MJ, Chu KB, Lee HA, et al. Detection of Acanthamoeba spp. using carboxylesterase antibody and its usage for diagnosing Acanthamoeba-keratitis [J]. PLoS One, 2022, 17(1): e0262223.
- [35] Toriyama K, Suzuki T, Inoue T, et al. Development of an immunochromatographic assay kit using fluorescent silica nanoparticles for rapid diagnosis of Acanthamoeba keratitis [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(1): 273 - 277.
- [36] 蓝倩倩,陈丽妃,黄慧,等. 共聚焦显微镜对感染性角膜炎病原学的诊断价值[J]. 中国临床新医学, 2019, 12(6): 626 - 629.
- [37] Chidambaram JD, Prajna NV, Larke NL, et al. Prospective Study of the Diagnostic Accuracy of the In Vivo Laser Scanning Confocal Microscope for Severe Microbial Keratitis [J]. Ophthalmology, 2016, 123(11): 2285 - 2293.
- [38] 王婵婵. 5 例棘阿米巴角膜炎在角膜共聚焦显微镜下特征分析[J]. 江西医药, 2019, 54(8): 957 - 959.
- [39] Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, et al. Confocal microscopy findings of Acanthamoeba keratitis [J]. Am J Ophthalmol, 1996, 121(2): 119 - 128.
- [40] Szentmáry N, Daas L, Shi L, et al. Acanthamoeba keratitis-Clinical signs, differential diagnosis and treatment [J]. J Curr Ophthalmol, 2018, 31(1): 16 - 23.
- [41] Kobayashi A, Yokogawa H, Yamazaki N, et al. In vivo laser confocal microscopy findings of radial keratoneuritis in patients with early stage Acanthamoeba keratitis [J]. Ophthalmology, 2013, 120(7): 1348 - 1353.
- [42] Pastrana C, Elumalai M, et al. Dual-Mode Gold Nanoparticle-Based Method for Early Detection of Acanthamoeba [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 14877.
- [43] Kato N, Shimizu T, Shimizu E, et al. Rapid detection of fungi and Acanthamoeba from corneal ulcers using a novel mobile laboratory microscope and a smartphone [J]. Eye (Lond), 2023, 37(4): 785 - 786.
- [44] Hauber S, Parkes H, Siddiqui R, et al. The use of high-resolution 1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in the clinical diagnosis of Acanthamoeba [J]. Parasitol Res, 2011, 109(6): 1661 - 1669.

(收稿日期:2023-05-18 修回日期:2023-07-29)