

(27)

Zastosowanie mikroskopii konfokalnej do diagnostyki różnicowej zapaleń rogówki

The application of the confocal microscopy for the diagnosis of corneal inflammation

Ewa Mrukwa-Kominek, Stanisława Gierek-Ciaciura, Iwona Rokita-Wala, Aleksandra Pierzchała

Z I Katedry i Kliniki Okulistyki Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ariadna Gierek-Łapińska

Summary: In the course of keratitis, the early diagnosis is very important to start with the effective treatment. Clinical state and slit lamp biomicroscopic examination not always allows to establish etiologic factor. In this paper, usefulness of the confocal microscopy in vivo examination to diagnose cases of not clear etiology in corneal inflammation, was presented. Authors presented the correlation between the clinical signs and the confocal images basis in five examined patients.

Słowa kluczowe: zapalenie rogówki, akanthamoeba, grzybica, mikroskopia konfokalna.

Key words: keratitis, acanthamoeba, mycosis, confocal microscopy.

Dotychczasowa diagnostyka schorzeń rogówki opierała się przede wszystkim na badaniu w lampie szczelinowej. Badanie to, pozwalające na ocenę gładkości powierzchni rogówki i stanu jej nabłonka, umożliwia również przybliżoną ocenę grubości rogówki (6,7,10).

W przebiegu zapaleń rogówki ważne jest szybkie włączenie celowanego, skutecznego leczenia. Dlatego też istotna jest wczesna diagnostyka. Obraz kliniczny i badanie w biomikroskopie szczelinowym w wielu przypadkach nie pozwalają na ustalenie czynnika etiologicznego. Ważne jest szybkie wykonanie badań mikrobiologicznych. Nie w każdym przypadku jednak jest możliwa identyfikacja drobnoustroju. Szczególnie w zapaleniach rogówki na tle pierwotniakowym i grzybiczym jest ona bardzo trudna i czasochłonna (3,7).

Mikroskopia konfokalna jako badanie nieinwazyjne pozwala na przyżyciową ocenę struktury rogówki, umożliwia dokumentację i diagnozowanie zmian rogówki o niejasnej etiologii. Badanie to pozwala na dokładną ocenę wszystkich warstw rogówki i obserwacje występujących patologii bez konieczności wykonywania preparatów histologicznych (2,3,6,10).

Celem pracy jest przedstawienie możliwości diagnostyki zapaleń rogówki o niejasnej etiologii z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej.

Materiał i metodyka

Praca przedstawia obraz kliniczny uzupełniony o diagnostykę przyżyciową zmian na poziomie komórkowym 5 pacjentów (3 kobiet i 2 mężczyzn), którzy zgłosili się do Kliniki Okulistyki ŚAM w Katowicach.

Po zebraniu wywiadu pacjentów badano w biomikroskopie szczelinowym, mikroskopie konfokalnym (ConfoScan 2 – Fortune Technologies), wykonano też posiewy z wymazów worka spojówkowego w kierunku bakterii i grzybów.

Sporządzono również dokumentację fotograficzną przedniego odcinka oka.

Przypadek 1.

Mężczyzna, lat 23, przed 3 miesiącami przebył zapalenie rogówki o niejasnej etiologii. Brak było jego dokumentacji. Nosił soczewki kontaktowe w związku z krótkowzrocznością, często kąpał się w basenach i rozlewkach wodnych (przebywał na Florydzie). Znalaziono również związek przyczynowy między początkiem zapalenia a niewielkim urazem oka przy zdejmowaniu soczewki kontaktowej. Posiewy bakteriologiczne z worka spojówkowego wykazały brak wzrostu bakterii i grzybów. Ostrość wzroku OP wynosiła 2/50.

W badaniu w mikroskopie szczelinowym stwierdzono okrągłą bliznę w centrum rogówki z podminowanymi brzegami oraz obecnością palczastych nacieków (ryc. 1A).

Przypadek 2.

Kobieta, lat 25, od 4 tygodni trudno gojące się zapalenie rogówki było leczone lekami przeciwwirusowymi, przeciwbakteryjnymi miejscowo i ogólnie bez efektu. Urazu nie podawała. Często kąpała się w basenie (studentka AWF). Posiewy bakteriologiczne z worka spojówkowego wykazały brak wzrostu bakterii i grzybów. Ostrość wzroku wynosiła 5/16.

W badaniu w lampie szczelinowej stwierdzono nieco paracentralnie umiejscowione owalne, gęste przymglenie, o nieco nieregularnym brzegu, z niewielkim ubytkiem nabłonka w centrum (ryc. 2A).

Przypadek 3.

Kobieta, lat 35, dwa lata po przeszczepie rogówki i związanym z tym leczeniem immunosupresyjnym, cierpiąca od kilku

miesiący na grzybicę ogólnoustrojową (narządy rodne, okresowo jama ustna, paznokcie). Zgłosiła się w celu diagnostyki zmiany znajdującej się w obrębie płatka przeszczepionej rogówki. Posiewy bakteriologiczne z worka spojówkowego wykazały brak wzrostu bakterii i grzybów. Ostrość wzroku wynosiła 4/50.

Wykonując badanie w lampie szczelinowej, stwierdzono obecność nacieku w dolnych kwadrantach przeszczepionego płatka rogówki dawcy, z wrastającymi naczyniami od obwodu i centralnym przymgleniem rogówki (ryc. 3A).

Przypadek 4.

Dziewczynka, lat 12, owrzodzenie rogówki w następstwie erozji spowodowanej urazem zausznikami okularów, leczone bez powodzenia antybiotykami i lekami przeciwgrzybiczymi. Posiewy bakteriologiczne z worka spojówkowego wykazały brak wzrostu bakterii i grzybów. Ostrość wzroku wynosiła 1/50.

W badaniu w lampie szczelinowej stwierdzono w centrum rogówki obrzęk nabłonka z naciekiem podnabłonkowym, gęstszym w centrum, otoczonym „halo” (pierścieniem) przymgłonej rogówki z palczastymi wypustkami (ryc. 4A).



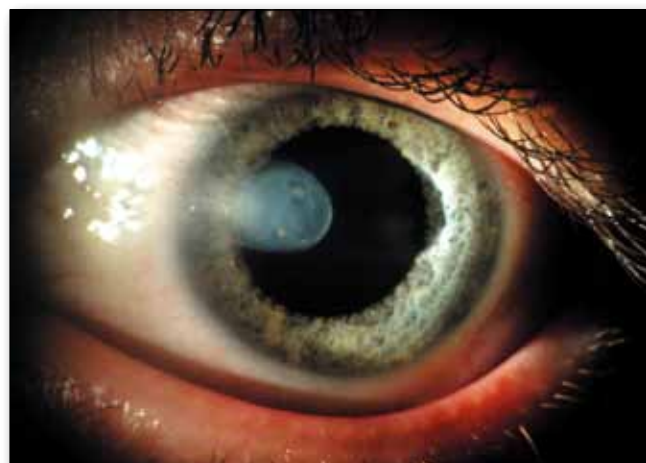
Ryc. 3A. Przypadek 3. – naciek w dolnych kwadrantach przeszczepionego płatka rogówki dawcy.
Fig. 3A. Case 3 – infiltration in the inferior quadrants of donor corneal graft.



Ryc. 4A. Przypadek 4. – naciek podnabłonkowy.
Fig. 4A. Case 4 – subepithelial infiltration.



Ryc. 1A. Przypadek 1. – blizna w centrum rogówki.
Fig. 1A. Case 1 – central corneal scar.



Ryc. 2A. Przypadek 2. – gęste owalne przymglenie rogówki.
Fig. 2A. Case 2 – dense, oval corneal haze.



Ryc. 5A. Przypadek 5. – owrzodzenia w centrum rogówki, obrzęk i przymglenie całej rogówki.
Fig. 5A. Case 5 – central corneal ulcer with edema and haze of the whole cornea.

Przypadek 5.

Mężczyzna, lat 54, niewielkie owrzodzenie, które wystąpiło 3 tygodnie po tęym urazie drewnem, ze znacznym spadkiem ostrości wzroku do liczenia palców przed okiem. Posiewy bakteriologiczne z worka spojówkowego wykazały brak wzrostu bakterii i grzybów.

Wykonując badanie w biomikroskopie szczelinowym, zaobserwowano obecność niewielkiego owrzodzenia w centrum rogówki z występowaniem obrzęku i przymglenia całej rogówki (ryc. 5A).

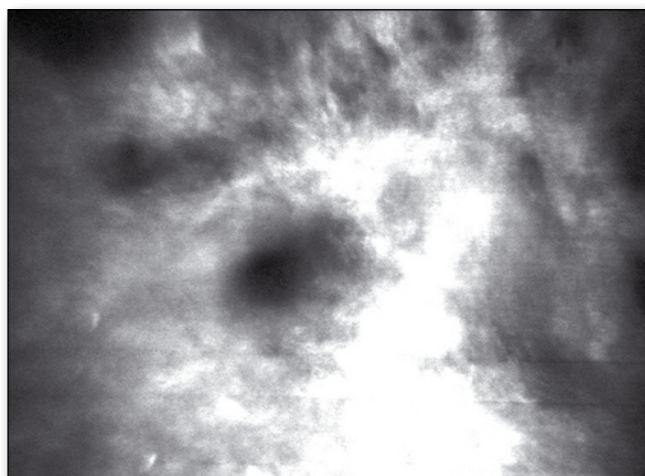
Wyniki badań w mikroskopie konfokalnym

W przypadkach 1., 2. i 4. stwierdzono zatarcie struktury istoty właściwej, obecność jamek (ryc. 1B), wzmożenie refleksywności z widocznymi zarysami keratocytów, obecność aktywnych trofozoitów tuż pod nabłonkiem i/ lub cyst o podwójnej ścianie. Takie obrazy mikroskopu konfokalnego wskazywały na infekcję pierwotniakiem *Acanthamoeba*.

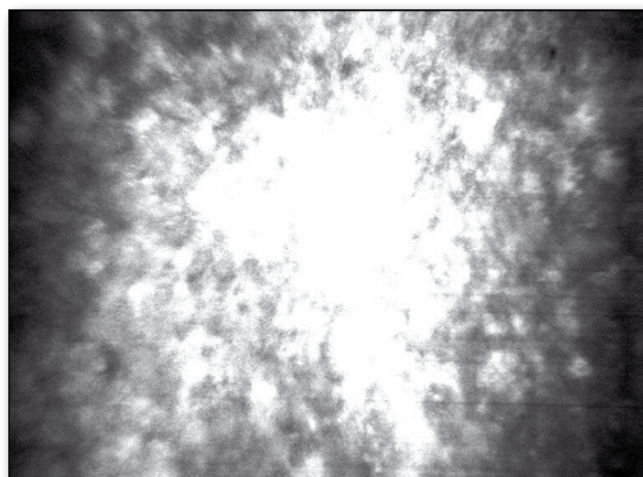
W przypadkach 1. i 2. obserwowano występowanie licznych złożeń, skupisk granulocytów, tkanki bliznowatej o różnym wysyceniu (ryc. 2B).

W przypadku 4. uwidoczniiono litą tkankę bliznowatą, w obrębie której obserwowano obszary hiporeflektywne (ciemne tło), tworzące jamki. W obrębie zmiany i na jej obrzeżach występowały cysty i trofozoity *Acanthamoeba*, zagęszczenie keratocytów, wzrost refleksywności tła, złoże, granulocyty. Pojedyncze pseudopęcherze były zlokalizowane na obrzeżach zmiany, podnabłonkowo (ryc. 4B). W obrębie prawidłowej istoty właściwej zaobserwowano twory igłopodobne. Znaczne złuszczenie komórek powierzchniowych nabłonka rogówki miało miejsce w obrębie zmiany, natomiast poza zmianą w obrębie nabłonka nie zaobserwowano odchyleń od normy.

W przypadkach 3. i 5. obrazy mikroskopu konfokalnego przedstawiały zatarcie struktury istoty właściwej, wzrost refleksywności w obszarze odpowiadającym naciekowi zapalnemu, skupisko jasnych, podłużnych, rozgałęzionych tworów nitkowatych (grzybnia) (ryc. 3B, 4B). Zmiany obserwowano również w pozostałych obszarach rogówki i dotyczyły zarówno struktury nabłonka, istoty właściwej, jak i śródbłonka rogówki. Uzyskane obrazy przemawiały za etiologią grzybiczą zmian (ryc. 1B, 2B, 3B, 4B, 5B).

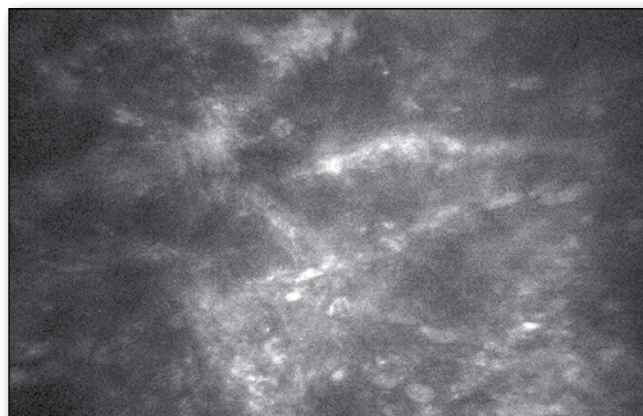


Ryc. 1B. Jamki w przedniej części istoty właściwej.
Fig. 1B. Cavities in the anterior stroma.



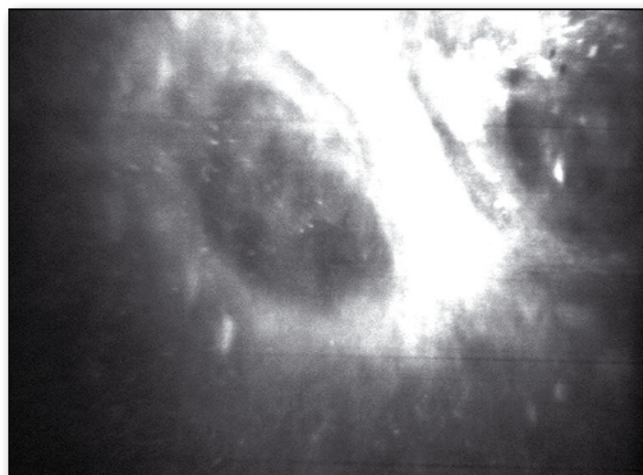
Ryc. 2B. Obecność trofozoitów i cyst *Acanthamoeba* tuż pod nabłonkiem, w obrębie tkanki bliznowatej; liczne złoże i skupiska granulocytów.

Fig. 2B. The presence of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts just below the epithelium, scar tissue, numerous deposits and granulocytes concentrations.



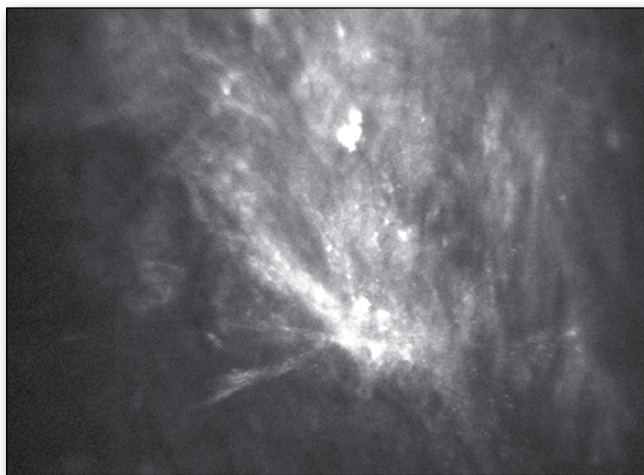
Ryc. 3B. Skupisko jasnych podłużnych, rozgałęzionych tworów nitkowatych; obszary hiporeflektywne.

Fig. 3B. Concentration of branching bright filamentous structures, hyporeflectivity.



Ryc. 4B. Pseudopęcherze zlokalizowane pod nabłonkiem rogówki, na obrzeżach nacieku.

Fig. 4B. Pseudobullae localized below the epithelium, at the infiltration border.



Ryc. 5B. Zatarcie struktury istoty właściwej, złogi, rozgałęzione twory nitkowate tworzące grzybnię.

Fig. 5B. Blurred structures of the anterior stroma, deposits, branching fungal hyphae.

Omówienie

W wyniku procesu zapalnego niezależnie od etiologii dochodzi do uszkodzenia struktury rogówki, w której powstają zmiany typowe dla danej etiologii. Tkanka rogówki nigdy nie osiąga takiej przezierności i rozciągliwości jak rogówka nieuszkodzona. Najczęściej są to przymglenia lub blizny różnej wielkości. Dość typowy obraz charakteryzuje blizny powstałe w wyniku infekcji rogówki grzybiczych, akantamoebowych czy wirusowych (3,5,8).

Zmiany histopatologiczne w rogówce ludzkiej, które powstały w wyniku procesu zapalnego, są obserwowane nawet po wielu latach (13).

Ważnymi komórkami, które mają wpływ na zachowanie prawidłowego kształtu i przezierności rogówki, są keratocyty (populacja wszechobecnych fibroblastów). Produkują one i utrzymują homogenną strukturę rogówkowego kolagenu, wpływają na homogenną przestrzeń poprzez produkcję hydrofilnych proteoglikanów (1).

Twory igłopodobne, widoczne w badaniu w mikroskopie konfokalnym, a niewidoczne w badaniu w lampie szczelinowej, są aktywnymi keratocytami i mogą świadczyć o toczącym się procesie zapalnym lub odczynie immunologicznym. Można je obserwować w stanach zapalnych rogówki niezależnie od etiologii, po przeszczepach drążących, w trakcie gojenia po zabiegach refrakcyjnych (u niektórych pacjentów). Z kolei stan komórek śródbłonna rogówki (np. polimegatyzm i pleomorfizm) pozwala na ocenę jego funkcji, co umożliwia prognozowanie co do występowania ewentualnej dekompensacji rogówki (przy spadku ich gęstości) (1,10).

Obserwacje przeprowadzone za pomocą tandemowego mikroskopu konfokalnego w eksperymentalnym bakteryjnym, grzybiczym i pętlakowym zapaleniu rogówki przedstawił Chew (4). Stwierdził występowanie aktywnych keratocytów w różnych stadiach zaawansowania infekcji.

Cavanagh (3) w 1993 roku, opisując przydatność mikroskopii konfokalnej do diagnostyki rogówki, opisał wygląd świńskiej rogówki zainfekowanej pierwotniakiem *Acanthamoeba castellanii*. W swoich badaniach uwidoczniał tuż pod nabłonkiem obec-

ność aktywnych trofozoitów i cyst o podwójnej ścianie. Stwierdził, że ten drobnoustrój powoduje zmiany w rogówce nie tylko w nabłonku i pod nim, ale również w przedniej części istoty właściwej. Ze względu na wygląd nazwał rogówkę „wyjedzoną przez termity”. W przedniej bowiem części istoty właściwej występują tzw. mikrojamki, w środku których znajdują się pojedyncze cysty. Zmiany te uwidoczniono również w zainfekowanej rogówce ludzkiej (2,3).

Cysty amebowe w obrazach mikroskopu konfokalnego mają wielkość około 10-30 μm , są podobne do keratocytów, dłuższe niż bakterie, nieco szersze niż leukocyty polimorfonuklearne. Zazwyczaj mają kształt elipsoidalny, są bardziej refleksyjne niż bakterie albo leukocyty (wysoko refleksyjne okrągłe twory). Leukocyty wielojądrzaste są mniejsze, okrągłe i wysoko refleksyjne. Natomiast trofozoity to podnabłonkowo umiejscowione twory o wielkości około 15-50 μm , otoczone małą przestrzenią przejrzystą mogącą wskazywać na obrzęk (2,9,11).

W przebiegu grzybicy rogówki obserwowano obecność rozgałęzionych strzępków grzybni (około 3-5 μm szerokości, różnej długości) otoczonych przez obszary średnio obrzękniętej rogówki. Włókna nerwowe były pogrubiałe (5,12,14).

W badanej przez nas grupie u dwóch pacjentów (P2 i P4) mimo obrazu wskazującego na infekcję grzybiczą badanie w mikroskopie konfokalnym wykazało obecność cyst i trofozoitów akantamoeb. U jednego pacjenta (P1) potwierdzono wstępnie postawioną diagnozę dotyczącą pierwotniakowego podłoża zapalenia rogówki. Natomiast u dwóch pacjentów stwierdzono obecność infekcji grzybiczej (P3 i P5).

Wielu autorów (3,4,9,11,12), opisujących przydatność mikroskopii konfokalnej w badaniach rogówki, zwraca uwagę na to, że najważniejsza wydaje się możliwość stwierdzenia obecności cyst lub trofozoitów akantamoeb w celu właściwego leczenia. Również cenne wydają się możliwości monitorowania efektów leczenia oraz możliwości różnicowania pomiędzy pogorszeniem stanu rogówki wywołanym zaostreniem infekcji a toksycznym działaniem stosowanych leków (3,5,11).

Podsumowanie

1. Badanie przyżyciowe struktury rogówki stanowi poszerzenie diagnostyki u pacjentów z zapaleniami rogówki.
2. Ocena struktury rogówki w przebiegu zapalenia rogówki z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej pozwala na określenie etiologii zapalenia, co może być pomocne w podejmowaniu decyzji dotyczącej dalszego leczenia.

PIŚMIENNICTWO:

1. Cameron J.D.: *Corneal reaction to injury*. In: Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J.: *Cornea*. Mosby, 1997, Chapter 8.: 163-182.
2. Cavanagh H.D., El-Agha M.S., Petroll W.M., Jester J.V.: *Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy. Diagnostic tools of the past quarter century*. *Cornea*, 2000, 19, 712-722.
3. Cavanagh H.D., Petroll W.M., Alizadeh H., He Y.-G., McCulley J.P., Jester J.V.: *Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal diseases*. *Ophthalmology*, 1993, 100, 1444-1454.

4. Chew S.-J., Beuerman R.W., Assouline M., Kaufman H.E., Barron B.A., Hill J.M.: *Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy*. CLAO J., 1992, 18(3), 197-201.
5. Florakis G.J., Moazami G., Schubert H., Koester Ch.J., Auran J.D.: *Scanning slit confocal microscopy of fungal keratitis*. Arch. Ophthalmol., 1997, 115, 1461-1463.
6. Gierek-Łapińska A., Gierek-Ciaciura S., Mrukwa E., Rokita-Wala I., Sarzyński A.: *Obserwacje przyżyciowe prawidłowych ludzkich rogówek przy użyciu mikroskopu konfokalnego*. Klin. Oczna, 1998, 100(5), 275-280.
7. Kański J.J.: *Okulistyka współczesna*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 1997.
8. Kaufman S.C., Laird J.A., Cooper R.: *Diagnosis of bacterial contact lens related keratitis with in vivo real-time confocal microscopy*. CLAO J., 1996, 22, 274-277.
9. Mathers W.D., Sutphin J.E., Folberg R.: *Outbreak of keratitis presumed to caused of Acanthamoeba*. Am. J. Ophthalmol., 1996, 121, 129-142.
10. Petroll W.M., Cavanagh H.D., Jester J.V.: *Confocal microscopy*. W: Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J.: Cornea. Mosby, 1997, 20, 335-350.
11. Pfister D.R., Cameron J.D., Krachmer J.H.: *Confocal microscopy findings if Acanthamoeba keratitis*. Am. J. Ophthalmol., 1996, 121, 119-128.
12. Shah G.K., Pfister D., Probst L.E.: *Diagnosis of microsporidial keratitis by confocal microscopy and the chromatope stain*. Am. J. Ophthalmol., 1996, 121, 89-91.
13. Soong K., Farjo O., Sugar A.: *Late deniscence of healing corneal scars (letter)*. Br. J. Ophthalmol., 1999, 83, 987.
14. Winchester K., Mathers W.D., Sutphin J.E.: *Diagnosis of Aspergillus keratitis in vivo with confocal microscopy*. Cornea, 1997, 16, 27-31.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.04.2004 r. (573).
Zakwalifikowano do druku 18.01.2006 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr n. med. Ewa Mrukwa-Kominek
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 5
ul. Ceglana 35
40-952 Katowice