

眼部感染症之診斷技術與進展

Development of Diagnostic Technology in Ocular Infectious Diseases

郭明澤、林其昌、張長泉、張憲彰

Ming-Tse Kuo, Chi-Chang Lin, Tung Chain Chang, Hsien-Chang Chang

眼睛是人類的靈魂之窗，正常人 80% 對外部的察知都是透過雙眼來感測，所以它是人類最重要的感官之一，一旦受到感染而失能，人類當即受到相當的威脅與不便。本文將先簡介眼部的構造及疾病的診斷，繼而廣泛介紹眼部各種感染症與其當下所能使用診斷方法，以及較新穎的實驗室輔助新技術，從而對較特殊之感染症深入陳述。最後更對於「眼部感染症－微生物角膜炎之診斷技術」詳述目前本研究群的一些進展。微生物角膜炎是一種威脅視力的嚴重疾病，病患視力之預後有賴於早期正確的診斷與治療。吾人以臨床為導向，承接聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅技術之基礎，發展及運用微生物角膜炎 DNA 診斷鑑識晶片，並著力於拉曼光譜光學技術的導入與應用，以發展快速診斷角膜潰瘍肇因之輔助鑑別技術。在醫療使命上，期能挽救更多微生物角膜炎患者之視力、減少眼球損傷及不得已的手術需求。在診斷科技上，期能達成輔助現有標準診斷程序之可能，以達提升微生物角膜炎更優質診斷之宏願。

Most of the information into our brain to get the feeling in our mind must depend on one of the most important sensing organs-eyes. The infection to the eye is a critical threatening to human, not only the vision, but also the following recognition. In this context, we will simply introduce anatomy of the eye and diagnosis of the diseases of the eye in the first. Then we will generally describe the infectious diseases in the ophthalmology, and describe deeply a little bit for the uncommon infection of the eye. Finally, we will focus on the diagnostic technology of microbial keratitis, which is a vision-threatening disease necessitating rapid and correct diagnosis. In our study group, we integrate and develop the probes of microbial discrimination as a microbial keratitis DNA array, which oriented to important pathogens causing microbial keratitis. For the mission of rapid diagnosis in the clinic, we apply the optic technology-Raman microspectroscopy to help the differential diagnosis of corneal ulcer. We hope our efforts for the promotion of diagnostic quality for microbial keratitis will rescue the vision of many patients suffered from microbial keratitis.

一、前言

素有靈魂之窗比喻的雙眼，是人類最重要感官之一。藉由眼皮的張開閉合的控制構成雙眼的第一道防線－主動與自動控制閘門，接著在眼皮與眼球

表面間，淚液構成了第二道防線－川流不息的護城河。經此二道防線的保護，眼球方能不受外界物理性、化學性與生物性的傷害，專注於收集外界透過光子傳遞來的訊息。透過神經網路的傳導至中樞大腦裡進行解讀，結合過去累積的經驗資訊及來自其

他感官的訊息加以整合，形成個體的視覺。而在眼球的本體、包覆眼球的軟組織、控制眼球轉動的眼外肌，亦存在豐富的淋巴及血管網路，誠然也建構出一套區域與中樞銜接的免疫防衛系統。然當此三道防線因外傷或疾病之故未能完全發揮其作用時，眼球便易受到傷害。本文將聚焦於生物性的傷害，亦即眼部感染症的討論。吾人會依臨床上解剖部位與感染源之大類，舉出常見之眼部感染症，並回顧不同微生物所造成的感染症之可行輔助診斷方式。最後，透過前述現況之掌握，介紹本研究群著眼於眼部之主要感染症之一——微生物角膜炎所做的努力，引領讀者進一步預見未來相關臨床診斷技術應用之潛能。

二、眼部結構之簡易剖析

首先將以眼部解剖部位來切入眼科感染症，來幫助讀者大略瞭解眼部構造。眼球基本構造(圖 1)，我們可以拿平常生活最常使用之記錄工具——照相機加以比擬。眼球外部有眼瞼(眼皮)，類比於照相機鏡頭蓋，鏡頭部分才不至於被風砂所傷。介於眼瞼與眼球之間的淚液及內涵之組成物質，大多是淚腺

所分泌，其水質佔據淚液大部分體積，以水分占絕大部分(99%以上)，提供眼表沖刷與潤滑之用，還有一些保護眼睛之蛋白質成分，包括乳鐵蛋白、溶菌酶與免疫球蛋白等具有殺菌作用，葡萄糖與電解質等成分，提供眼表細胞營養與緩衝液功能。位於水層外面之油質層，能夠減少水層裡水分蒸散，而位於眼表與水層之間的黏液層，有助於疏水性眼表細胞與水層之吸附⁽¹⁾。眼角膜的部分，可用鏡頭來比擬，具有濾鏡及屈光效果。虹膜的功用如相機光圈，能控制光線入射至水晶體及其後之光量。水晶體功能如同相機之變焦系統，當看近物時，水晶體會膨脹，才能對焦而看清楚近距離東西，當看遠處時水晶體會變薄，才能對焦而看清楚遠距離東西，將遠與近物件都能以底片或數位感光元件有效地接收。視網膜功能如同相機底片或數位感光元件⁽²⁾，能夠將接收到的光子轉變為電訊號，透過神經網路傳給大腦視覺中樞。

上述幾個構造之間，都有以水為主要成分之緩衝液填充其間，眼瞼與眼角膜之間有淚液，眼角膜與虹膜之間有前房液，虹膜與水晶體之間有後房液，水晶體與視網膜之間則有玻璃體。其他構造方面，眼白是由半透明之結膜與白色不透明之鞏膜所

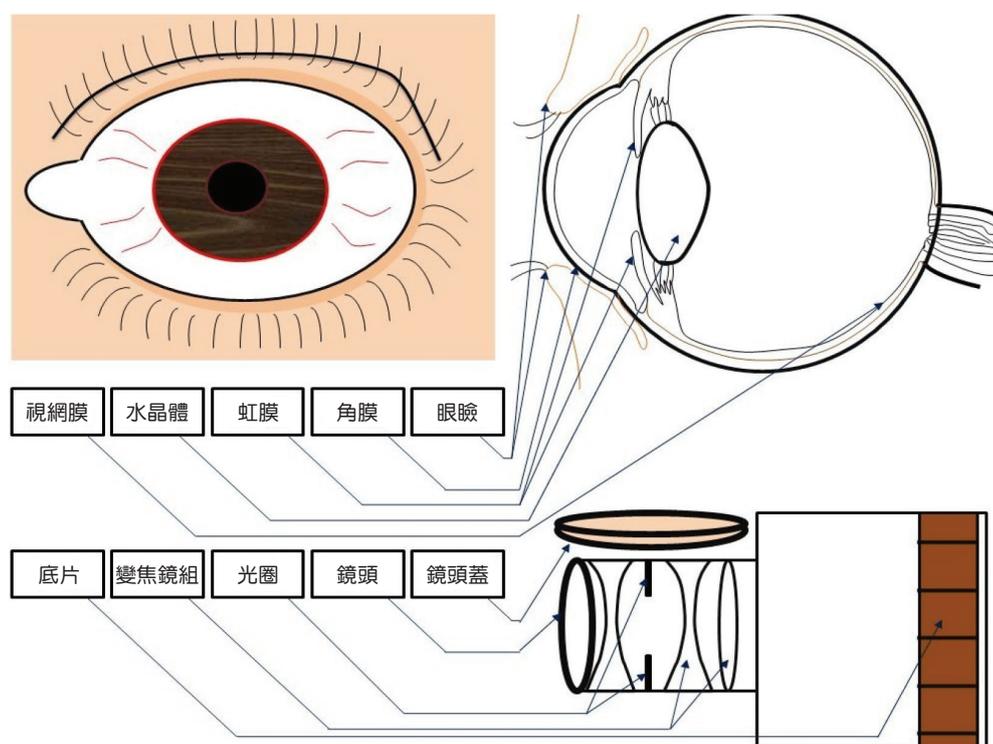


圖 1. 眼球與照相機之類比。

表 1.
眼球疾病之簡易診
斷分類。

	角膜	水晶體	脈絡膜與視網膜
感染性眼疾	細菌性角膜潰瘍	細菌性眼內炎併發之白內障	壞死性視網膜炎
免疫相關眼疾	邊緣潰瘍性角膜炎	葡萄膜炎併發之白內障	白點綜合症
先天性眼疾	巨大角膜症	馬凡氏綜合徵水晶體脫位	錐狀感光細胞失養症
退化性眼疾	鈣化性帶狀角膜病變	老年性白內障	老年性黃斑部病變
外傷性眼疾	角膜撕裂傷	外傷性白內障	外傷性視網膜裂孔

形成，各可類比於相機護套與相機外殼，阻隔其他不要之光線進入眼球。至於結膜上之血管與介於鞏膜與視網膜之間的脈絡膜，主要提供眼球營養與代謝之血管網路系統。小樑可類比於濾網，過濾液體從前房排放至血管。而其他次要之構造則不再贅述。

三、眼球疾病之常用診斷分類

以下將簡單介紹常用的眼球疾病分類與常見眼疾。簡單區分為幾大類，主要包括感染性眼疾、免疫相關眼疾、先天性眼疾、退化性眼疾與外傷性眼疾等五大類。各大類眼疾可以依上述眼球主要解剖部位及造成近因再細分(如表 1 所示)。吾人以大家最耳熟能詳之白內障為例，大多數是因為退化老化而產生，我們稱之為老年性白內障；若其近因是外傷所造成，通稱之為外傷性白內障；如果嬰兒出生之前就罹患白內障，則稱之為先天性白內障。其共通機轉，主要是因為水晶體構成單位—水晶體纖維受到外部刺激與內部異常調控，造成成分上或排列上產生改變，不可溶的蛋白質成分累加堆積無法被代謝排除，水晶體核心部位如樹木年輪般壓縮排列，進而水晶體透明度及硬度產生改變。

四、眼部感染症之分類

在眼部感染症的臨床診斷上，大多將之分為病毒感染症與微生物感染症，微生物感染症再細分為細菌感染症、黴菌感染症及寄生蟲感染症。眼部微生物感染症大多數是由細菌與黴菌所造成。吾人將以矩陣方式，依主要感染部位或系統之不同對感染病原之大類建構感染性眼疾，介紹各類別最常見或具代表性之感染症，以利讀者對眼部感染症有具體明確之方向感(表 2)。

五、眼部感染症及其輔助診斷方式之回顧

眼科醫師根據臨床問診資訊、身體與眼部理學檢查，接著需要其他輔助工具做進一步鑑別診斷。利用眼部相關部位採集到之檢體—結膜感染以結膜刮除物、角膜感染以角膜刮除物、眼內感染以前房液及玻璃體液，軟組織感染如果形成膿瘍(abscess)，可將膿瘍引流並將膿瘍送檢，若沒有形成膿瘍，則有賴病理切片檢查(biopsy)。通常一部分檢體固定後，先進行革蘭氏染色(Gram stain)等染色技術處理，並以光學顯微鏡做細胞學鏡檢(cytological examination)，再依據微生物染成的顏色與型態做分類鑑別。以最常用之革蘭氏染色為例，可分為革蘭氏陽性桿菌、革蘭氏陽性球菌、革蘭氏陰性桿菌，以及革蘭氏陰性球菌。此方法由於所需時間短、染色成本不高、光學顯微鏡成本亦不高，分類後又有助於縮小經驗性用藥涵蓋之打擊範圍，故在眼科學標準參考典籍裡被列為最受推薦之眼部感染症輔助診斷方式，亦廣為醫學中心裡眼科部門所採用。另一部分檢體，則以微生物培養後鑑定與隨後之藥物敏感性測試，這是細菌感染性眼疾之黃金標準診斷方式，可提供臨床醫師作為校正經驗性用藥之依據，選擇有效、成本低與保護後線用藥，減少對其產生抗藥性之機會。因黴菌抗藥性不如細菌般容易產生，黴菌用藥選擇亦有限，故臨床上黴菌感染性眼疾之黴菌培養，通常沒有進行藥敏性測試。另外，臨床上若懷疑是較特殊的微生物感染，則需與微生物實驗室聯繫，以特殊培養基進行培養。例如臨床上懷疑是棘狀阿米巴之感染性角膜炎(Acanthamoeba keratitis)，需以不含營養成分之培養基塗覆大腸桿菌後培養。微生物培養鑑定方法之缺點是較為耗時，有些微生物要培養到足供鑑定，可能要高達 2 週以上；另有些較易受到

表 2. 眼部感染症之分類。

	病毒	細菌	黴菌	寄生蟲
眼瞼	水痘帶狀疱疹病毒眼瞼炎 (Varicella zoster blepharitis)	葡萄球菌眼瞼炎 (Staphylococcus blepharitis)	馬拉色菌眼瞼炎 (Malassezia blepharitis) (罕)	蠕形蟎眼瞼炎 (Demodex blepharitis)
淚腺泌泄系統	艾伯斯坦-巴爾病毒淚腺炎 (Epstein-Barr dacryoadenitis)	結核病淚腺炎 (Tuberculosis dacryoadenitis) (罕)；以色列放線菌淚小管炎 (Actinomyces canaliculitis)；革蘭氏陽性菌淚囊炎 (Gram positive bacterial dacryocystitis)	(未)	囊尾幼蟲症 (Cysticercosis) (罕)
結膜	腺病毒結膜炎 (Adenoviral conjunctivitis)	披衣菌結膜炎 (Chlamydia conjunctivitis)	(未)	微孢子蟲角結膜炎 (Microsporidial keratoconjunctivitis)
角膜	單純性疱疹病毒角膜炎 (Herpes simplex keratitis)	綠膿桿菌角膜炎 (Pseudomonas keratitis)	鐮胞菌角膜炎 (Fusarium keratitis)	棘狀阿米巴角膜炎 (Acanthamoeba keratitis)
鞏膜	水痘帶狀疱疹鞏膜炎 (Varicella zoster scleritis) (罕)	綠膿桿菌鞏膜炎 (Pseudomonas scleritis)	麴菌鞏膜炎 (Aspergillus scleritis)	棘狀阿米巴角膜炎 (Acanthamoeba scleritis) (罕)
脈絡膜與視網膜至眼內	巨細胞病毒視網膜炎 (Cytomegalovirus retinitis)	鏈球菌眼內炎 (Streptococcus endophthalmitis)；克雷伯氏眼內炎 (Klebsiella endophthalmitis)；梅毒脈絡膜視網膜炎 (Syphilis chorioretinitis)；脈絡膜結核病菌症 (Choroidal tuberculosis)；	念珠菌眼內炎 (Candida endophthalmitis)；麴菌眼內炎 (Aspergillus endophthalmitis)	岡地弓蟲絡膜視網膜炎 (Toxoplasmic chorioretinitis)；脈絡膜視網膜犬蛔蟲症 (Choroidoretinal toxocariasis)；潘尾絲蟲病 (Onchocerciasis) (罕)
眼窩 (膿瘍或蜂窩性組織炎)	(未)	多重菌種之眼窩蜂窩性組織炎 (成人)；單一菌種之革蘭氏陽性球菌眼窩蜂窩性組織炎 (兒童)；眼窩結核病菌症 (Orbital tuberculosis) (罕)	眼窩白黴菌症 (Orbital Phycomycosis)；眼窩麴菌症 (Orbital Aspergillosis)	旋毛蟲病 (Orbital Trichinosis) (罕)；棘球條蟲症 (Orbital Echinococcosis) (罕)；囊尾幼蟲症 (Orbital Cysticercosis) (罕)

(罕) = 已開發國家極罕見；(未) = 文獻回顧未能察訪具體報告

外界環境影響之微生物，可能在採集檢體後運送至微生物實驗室過程中凋亡，造成偽陰性診斷。因此針對大型微生物造成之微生物角膜炎，尤其是棘狀阿米巴角膜炎，可運用活體共軛焦顯微鏡來偵測角膜病灶處之棘狀阿米巴囊體 (cyst) 或營養體 (trophozoite)，但營養體與角膜細胞及發炎細胞並不易區分，故以囊體為主要診斷標的⁽³⁾。林口長庚醫院譚欣媛醫師運用雙光子和二倍頻顯微術研究細菌性角膜潰瘍對角膜組織產生之病態機制，觀測細菌角膜潰瘍角膜切片下可能之菌體螢光，以及觀

測棘狀阿米巴角膜炎潰瘍之角膜切片內阿米巴囊體螢光，揭示了另一光學診斷技術於臨床應用之潛能⁽⁴⁾。

一些細胞內寄生之病毒、細菌及寄生蟲，診斷方式則需個別考慮。病毒以宿主細胞為製造工廠，生產其繁衍所需之蛋白質、核酸等物質。以較常見之單純性疱疹病毒感染為例，若以血清學方式偵測病患體內產生之中和抗體或補體固定抗體反應之檢測，主要用於診斷初次感染與排除此病毒感染，對復發性感染則無診斷之助。目前真正被用於輔助診

斷之鑑定方式還是透過含病毒之檢體，藉由培養病毒、免疫螢光或酵素染色方法偵測病毒抗原，或以聚合酶鏈反應增幅技術配合 DNA 核酸雜交技術鑑定病毒⁽⁵⁾。因為水痘帶狀皰疹病毒眼瞼炎具有典型臨床表徵，大多不需實驗室輔助鑑定。但此病毒如果引起眼內虹彩炎或急性視網膜壞死症，而無皮膚之帶狀感染，則應進行病毒培養觀察細胞之病變，偵測檢體內病毒抗原，或利用聚合酶鏈反應增幅技術配合核酸雜交技術鑑定病毒⁽⁶⁾。

Epstein-Barr (EB) 病毒於眼部之感染，主要是造成淚腺炎及眼腺體症候群 (parinaud syndrome; oculoglandular syndrome)。後者表現為疼痛之紅眼症，合併眼部周圍淋巴腺腫大與發燒。其感染輔助鑑定方式，因無法從培養細胞中分離出病毒，主要是以血清學方式偵測患者血清內抗體。如果偵測到抗 EB 病毒核殼抗原 (viral capsid antigens, VCA) 之免疫球蛋白 (anti-EB-VCA IgA、IgM 及 IgG)，但偵測不出或測到上升之抗 EB 病毒核抗原 (EB nuclear antigen, EBNA) 之抗體，可以診斷為最近 EB 病毒感染⁽⁷⁾。利用即時 PCR (real-time PCR) 增幅技術於病灶採集到的檢體偵測出 EB 病毒的 DNA，是更直接之感染證據⁽⁸⁾。腺病毒感染造成急性角結膜炎在臨床上很少使用實驗室輔助診斷，因病毒之培養需 2 至 3 週，引起較輕微感染症狀的腺病毒多半在培養報告前已痊癒，造成較重症感染之腺病毒在 1 至 2 週後也會表現出結膜覆膜 (conjunctival membrane)、角膜上皮浸潤、雙眼感染等典型之地域性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis)。利用多對引子聚合酶鏈反應 (multiplex PCR) 增幅，並區分型別之技術，使腺病毒診斷在符合臨床需求的效率上大為改善⁽⁹⁾。根據現有已知所有腺病毒血清型發展出敏感度接近 90% 及特異性高於 90% 之快速腺病毒免疫分析偵測器 (Rapid Pathogen Screening, Inc., South Williamsport, PA)，這更為符合快速診間診斷之期待⁽¹⁰⁾。

細胞內寄生的細菌如披衣菌，其眼部的感染主要是造成砂眼 (trachoma) 或成人包含體結膜炎 (adult inclusion conjunctivitis)。利用酵素免疫分析法或直接螢光顯微鏡鏡檢，可以觀察到受感染細胞之細胞質內的披衣菌包含體 (inclusion bodies)。過

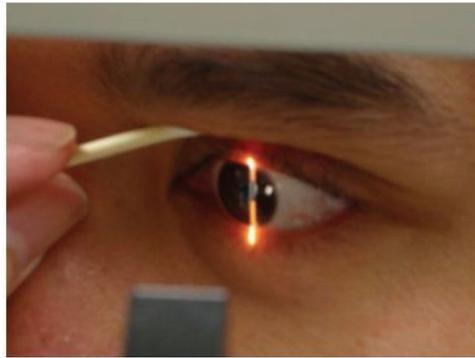
去鑑定的標準方法是以 McCoy 細胞的標準培養程序中加入 cycloheximide 等真核細胞代謝抑制劑，培養約 3–7 天觀察細胞內的披衣菌包含體⁽¹¹⁾，這種方式的敏感度約 75–80%，特異性為 100%。血清學的檢查主要用於區分血清型，對用藥並無影響，故對臨床效益不高⁽¹²⁾。使用核酸增幅技術，因具備高敏感度與特異性，更有利於高盛行率地區進行大量篩檢工作，而成為黃金標準⁽¹³⁾。細胞內寄生的寄生蟲如微孢子蟲，近數十年來因免疫不全患者併發症之研究及分子診斷技術應用的普及，而有愈來愈多病例被診斷出⁽¹⁴⁾。其輔助診斷方法包括革蘭氏染色後鏡檢細胞內的革蘭氏陽性孢子、組織培養後染色鏡檢、免疫螢光抗體技術、穿透式顯微鏡鏡檢⁽¹⁵⁾ 以及聚合酶鏈反應增幅技術⁽¹⁶⁾。另外，還有一些不常見的感染症，通常需要詳細病史及臨床上特殊的表現才會令臨床醫師懷疑而列入鑑別診斷。萊姆病為伯式疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi*) 之感染，蟲體較易由暗視野顯微鏡觀察。不同於梅毒密螺旋體的是可以培養鑑定，但培養不易，且需要 7 週左右的時間，而血清學酵素連接免疫吸附試驗 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA；enzyme immunoassay, EIA) 或免疫墨點法檢驗 (Immunoblots) 與聚合酶鏈反應增幅技術是診斷萊姆病的標準方法⁽¹⁷⁾，但在眼部要證明是伯式疏螺旋體感染，最好還是能於眼部臨床樣本直接偵測到蟲體或其 DNA⁽¹⁸⁾。弓漿蟲的輔助診斷可以測抗弓漿蟲的抗體 (IgM 及 IgG)，亦可利用聚合酶鏈反應增幅技術輔助診斷⁽¹⁹⁾。蠕蟲之感染則因蟲體體積大，故可透過影像學或組織切片，直接找到組織中之蟲體而診斷，但亦有學者透過偵測眼內前房液與血清之抗體比例來診斷犬蛔蟲之幼蟲移行至眼球造成感染性虹彩炎⁽²⁰⁾。

六、眼部主要感染症之一：微生物角膜炎

本實驗室於眼部感染症之研究聚焦於微生物角膜炎的輔助診斷技術。微生物角膜炎是一種威脅視力的嚴重疾病。病患視力之預後有賴於早期正確之診斷與治療。微生物角膜炎包括細菌性角膜炎、黴



(a)



(b)

圖 2.

(a) 診間運用細隙燈生物顯微鏡對病患眼睛進行眼部理學檢查。(b) 細隙燈照明系統打在角膜上形光切片，並使用顯微放大系統觀察病灶。

菌性角膜炎與寄生蟲性角膜炎。最常見之微生物角膜炎為細菌性角膜炎與黴菌性角膜炎，而寄生蟲性角膜炎最常見的是棘狀阿米巴角膜炎。若角膜炎之發炎細胞浸潤合併角膜上皮缺損、伴隨角膜肉質層損傷，則定義為角膜潰瘍。

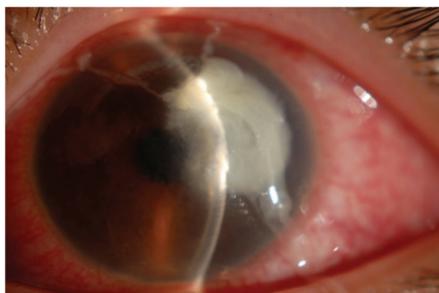
微生物角膜炎之臨床診斷上，眼科醫師詢問患者其症狀持續時間，並追問病患有關微生物角膜炎之危險因子，如是否適當配戴隱形眼鏡或消毒、最近被樹木或其他異物所傷、未罹患角膜潰瘍前症狀、糖尿病或類風濕性關節炎等全身性疾病等，以及探問居家及工作相關作業環境等。同時利用談話過程中觀察患者眼睛周圍表現，如眼皮水腫、眼皮痙攣、眨眼頻率、流淚程度，以及健側眼與患側眼表現之差異。接著運用細隙燈生物顯微鏡 (slit-lamp biomicroscopy) 對病患眼睛進行眼部理學檢查 (圖 2)。

透過細隙燈照明系統打在角膜上形成整體之照明或光切片，再利用其放大系統觀察病灶，包括大小、深度及一些具有暗示性的特徵型態，並注意眼睛內是否有發炎細胞或是蓄膿之表現 (圖 3)。

綜合以上資訊，若高度懷疑是微生物角膜炎時，會直接對患者眼角膜病灶處或間接對其周邊結膜進行刮除採樣，並將所取得細胞組織破片進行處理，一部分進行抹片染色，在顯微鏡下進行細胞學鏡檢，另一部分接種於微生物培養皿，於微生物實驗室內進行培養，若有微生物被分離出，實驗室人員會對其種類進行鑑定。如果是細菌，會對該細菌進行藥物敏感性試驗，以提供眼科醫師修正原來使用之經驗性抗生素，選擇更有效及適當之抗生素治療病患。然而從上述診斷程序，包括病患本身之描述、醫師之檢查及研判、細胞學之鏡檢，以及微生物之培養與鑑定，仍存在延誤診斷或錯誤診斷之機會⁽²¹⁾。因此才會有許多研究希望透過不同之新科學方法與技術來提供診斷資訊，例如回顧部分提及使用角膜共軛焦顯微鏡直接對角膜進行觀察⁽²²⁾、以聚合鏈反應為基礎的診斷方法等⁽²³⁾。然而角膜共軛焦顯微鏡若直接觀察角膜上細菌，解析度尚不足。以聚合酶鏈反應為基礎之診斷方法，廣泛適用於各種微生物感染之鑑定，故本研究團隊進一步就微生物角膜炎之臨床診斷需求，整合並開發為微生物角膜



(a)



(b)

圖 3.

以細隙燈生物顯微鏡觀察。(a) 黴菌性角膜潰瘍個案，(b) 細菌性角膜潰瘍個案。

炎 DNA 陣列晶片。惟此高鑑別率之輔助診斷法，在過去其他領域上，個別種類之微生物鑑定相關研究已證實可行，但目前仍需投入較高度之實驗室資源，方能在時效上媲美或優於傳統細胞學鏡檢及微生物培養鑑定方法。本實驗室有鑑於此，特以拉曼光譜光學技術和以下的 DNA 微陣列晶片為基礎，發展快速診斷角膜潰瘍之輔助鑑別技術。

七、以聚合酶鏈反應為基礎之 DNA 陣列晶片原理與研究發展背景

以分子生物學為基礎的技術來診斷微生物角膜炎的研究被陸續提出，包括細菌的感染⁽²⁴⁾、黴菌的感染⁽²³⁾，以及棘狀阿米巴的感染⁽²⁴⁾。利用聚合酶鏈反應為基礎之感染性角膜炎微生物鑑定法，研究報告指出能偵測到許多使用培養方法無法診斷之個案⁽²⁶⁾。但這些研究之辨識層級裡，不是聚焦於大略區分屬於細菌類感染或是屬於黴菌類感染，就是鎖定某一種類特定微生物之再確認。感染性角膜炎具備宿主眼表暴露於對外開放環境之特殊性，著實不易透過特定某些菌種對組織之特異性 (tissue-specific pathogens) 來判斷，故對大多數臨床眼科醫師而言，並不易透過診間之臨床診斷而鎖定是那一類微生物感染，更遑論判定是何種菌種之感染症。因此，若要能落實將實驗室發展之技術應用於感染性角膜炎臨床診斷之理想，適當地兼顧鑑別層面之廣度與鑑別層次之深度，始能對臨床研判與後續治療

有實質助益。

利用具備高重複、高變異特性之核糖體基因 (rRNA genes) 內轉錄區 (inter-transcribed spacer region, ITS) 片段序列所設計之寡核苷酸探針，建構成 DNA 陣列晶片，具備符合臨床需求之潛力 (圖 4)。此晶片可依據我們對於微生物角膜炎致病微生物診斷之需求加以設計，使其具備鑑別層級到達菌屬 (genus) 或菌種 (species) 之層次。另外，對於實驗室所培養出特定種類之臨床菌株，此晶片亦能更快速有效地鑑識其菌種⁽²⁷⁻²⁹⁾。

八、應用 DNA 陣列晶片於角膜潰瘍之輔助診斷技術

本實驗室著眼於微生物角膜炎常見、預後較差或具有代表性的感染菌種設計整合型微生物角膜炎 DNA 陣列晶片 (圖 5)，整合過去不同應用之已開發探針與現今微生物角膜炎導向之新設計探針；整合型微生物角膜炎 DNA 陣列晶片之廣度涵蓋不同大類微生物之鑑別，深度汲於造成微生物角膜炎之常見代表性細菌、常見非結核分枝桿菌、常見代表性之黴菌與棘狀阿米巴之菌種鑑定。搭配多對引子聚合酶鏈反應增幅技術與相關視覺工程整合策略，將有助於眼表開放空間下不同大類之多重菌株感染鑑定、減少探針開發修正之成本與導入臨床應用之時程、提高晶片整體之敏感性與特異度，以符合临床上微生物角膜炎之輔助診斷需求。

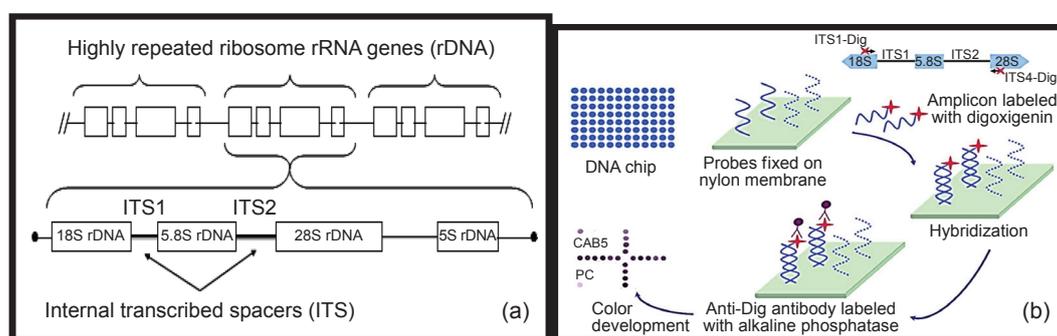


圖 4. (a) 以真核生物之黴菌為例，核糖體 RNA 基因 (rDNA) 於 DNA 內具備高度的重複性。高重複之核糖體基因內轉錄區 (ITS) 置於 rDNA 之圖示。(b) 透過待測黴菌檢體 rDNA 片段經預先接上 digoxigenin (Dig) 之 primers 以 PCR 放大後，足量之帶 Dig rDNA 產物與 DNA chip 上之探針雜合反應與呈色反應後，可以有效鑑定黴菌菌株。

微菌探針區	Asboy3	Scpro4	CN4b	CAB5	M	棘狀阿米巴探針區		
	Fumop	Asfla4	Asfum2	CP6	M			
	Ascla3	Aster2	Asver4	CT3c	M			
M	M	M	M	M	M	M	NC	M
細菌探針區	Smp1	Smgp1	Smgor1	Smgp2	M	非結核分枝桿菌探針區		
	Pacn4-2	Pacn8-2	Abau2	Mcat5	M			
	EC5	EC7	Efs1	Efs2	M			
	Paer1	Paer2R	Smar2-1	Smar2	M			

圖 5. 以微生物角膜炎重要菌種為導向設計之微生物角膜炎寡核苷酸陣列晶片。

九、拉曼光譜原理與拉曼光譜顯微鏡於眼科學之研究發展背景

過去文獻裡有許多關於拉曼光譜原理之詳細介紹⁽³⁰⁻³²⁾，吾人僅在此簡短地回顧。拉曼散射光譜在 1928 年由拉曼所發現，在光線散射粒子模型上，拉曼散射是一種非彈性散射光，而相對應之雷利 (Rayleigh scattering) 散射則是一種彈性散射光。當物質受到入射光照射後產生散射時，散射光子與入射光子波長相同並未改變，就是雷利散射。如果散射光子波長改變，有兩種可能的拉曼散射。其一是分子吸收入射光能量後，從振動基態能階躍遷至位能較高之虛擬激發態 (virtual state)，再由高能階回到第一振動激發態，這個過程裡產生波長較入射光長之散射光，稱為斯托克斯散射 (Stokes scattering)。其二是分子由第一振動激發態遷至虛擬激發態後再回到振動基態能階，則因能量轉移到散射光子，而產生波長較入射光短的散射光，稱為反斯托克斯散射 (anti-Stokes scattering)。由於大多數的散射光為雷利散射光，故拉曼光譜檢測是在 1970 年代之後因雷射與高感度數位感光元件發展後才漸受重視。共振與表面增顯拉曼光譜亦有助於改善此訊號較弱的缺點。另外，由於拉曼光譜鑑識區不受水分子影響以及具非破壞性之特性，比起紅

外線光譜必須使用低濕樣本之限制，在生物樣本與活體檢測上更具競爭力⁽³³⁾。但拉曼光譜檢測有可能受到螢光訊號干擾，因此必須考慮遮蔽螢光策略，例如降低樣本溫度、純化目標樣本、延長雷射光曝光時間與選用適當波長雷射等。

筆者從回顧過去眼科醫學相關的文獻上，探索拉曼光譜之應用範疇。正常人眼角膜的含水量約為 78%，如果眼角膜的排水功能出現障礙，就會造成角膜水腫。當近視的患者其角膜接受屈光雷射治療時，如果角膜內含水的資訊無法準確掌握時，可能造成雷射能量設定匹配不當而有過度治療或治療不足之可能性。因此有學者利用共軛焦拉曼顯微鏡對已喪失視力的眼睛進行評估，藉由拉曼波峰 (3400 cm^{-1} 及 2940 cm^{-1}) 的強度比值 (I_{3400}/I_{2940}) 獲得不同位置角膜的含水量估計⁽³⁴⁾。有較多學者使用拉曼光譜顯微鏡來研究水晶體產生白內障的機轉，有白內障變化的水晶體，會伴隨水晶體內蛋白質的成分以及脂質成分的改變^(35, 36)。由拉曼波峰 (830 cm^{-1} 、 857 cm^{-1} 等) 的強度變化，可知酪氨酸減少，苯丙胺酸 (1003 cm^{-1} 、 1033 cm^{-1} 等) 減少，色胺酸 (758 cm^{-1} 、 880 cm^{-1} 等) 減少，磷脂質 (2850 cm^{-1} 、 2885 cm^{-1} 等) 及膽固醇 (1586 cm^{-1} 等) 成分則增加。蛋白質內之 2 級結構與脂質分子鍵結情形也有變化。其他研究則摘要如表 3 所示。

表 3.
運用拉曼光譜進行
臨床眼科學研究之
實例。

	研究目的	拉曼系統	雷射波長	參考文獻
淚液	分析正常人之淚液成分	Normal Raman	830 nm	34
角膜	眼角膜的含水量的估計	Confocal Raman	632.8 nm	37
前房液	偵測前房液之葡萄糖濃度	Normal Raman	785 nm	38
水晶體	水晶體老化與其蛋白質變化	Normal Raman	660 nm	35
	水晶體的脂質與蛋白質交互關係	FT Raman	1064 nm	39
	白內障之脂質與蛋白質變化	Normal Raman	676 nm	36
玻璃體	增殖性糖尿病視網膜病變之玻璃體變化	FT Raman	1064 nm	40
視網膜	黃斑部類胡蘿蔔素之偵測	Normal Raman	514.5 nm	41
	黃斑部色素之活體評估	Resonance Raman	488 nm	42

十、應用淚液拉曼光譜於角膜潰瘍之輔助鑑別技術發展

將來直接對眼球感染部位獲得拉曼鑑識光譜，一方面以雷射清創，另一方面獲取光譜資訊來分析得知感染源，吾人認為這將是未來可以預期之發展。但現階段吾人基於病患安全性之優先考量，故利用淚液作為介質樣本，透過分析角膜潰瘍於淚液成分上之改變所導致拉曼光譜訊號的變化，間接推論該病患之感染與否及發炎的嚴重程度。淚水的品質將直接影響眼表的防禦與代謝。淚水分泌太少或蒸散太快都可能造成乾眼症。當眼表有疾病時，眼表細胞或免疫細胞的代謝物質以及通透性改變的眼表微血管會釋出一些反應物質至淚水裡，因此淚水的成分亦可能反映出眼表發炎與疾病的狀態。當微生物造成角膜潰瘍時，除了上述宿主本身之反應機制，微生物本身在宿主環境之下，亦可能被增量淚液之物理性沖刷，而菌體沉浮於其中，加上淚液內之抗菌成分與免疫系統之攻擊作用，而使菌體內特殊成分、菌體細胞膜或細胞壁碎片溶於淚液內。

淚水裡微量但重要之眼表蛋白質，亦可透過

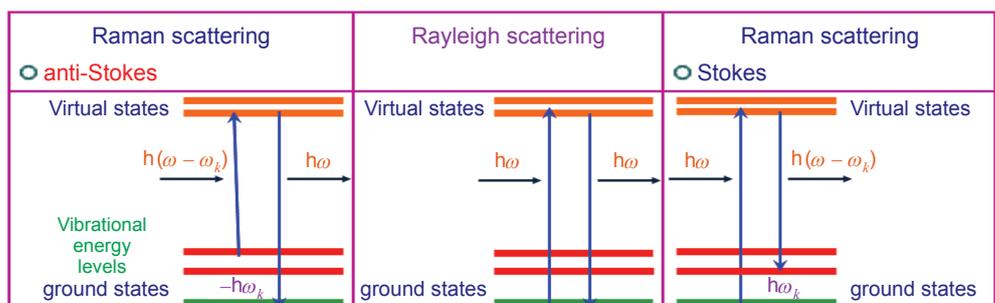
拉曼顯微鏡偵測特定物質之拉曼光譜及利用光譜強度定量⁽³⁴⁾。回顧拉曼顯微鏡用在微生物鑑定的研究上，包括具有甲氧西林抗藥性 (methicillin-resistance) 的金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)⁽⁴³⁾、鏈球菌 (streptococci)⁽⁴⁴⁾、大腸桿菌 (*E. coli*)⁽⁴⁵⁾ 等，如能配合主成分分析或集群分析等鑑別分析法，皆能透過特徵拉曼波峰測定而加以區分。

本團隊研究乳膠粒子溶液不同乾燥成形條件、淚滴乾燥速度控制，以及菌體固定於不同基材，以期建構高效率之淚滴拉曼光譜偵測平台，並以模擬淚液建構標準化之分析平台，應用於實際臨床淚液檢體之檢測分析 (圖 7)。我們更將分階段逐步改善淚液拉曼光譜偵測平台及分析平台，期能將最佳化的淚液拉曼光譜角膜潰瘍鑑別技術實現於可攜式拉曼顯微鏡平台，並持續研究，以調整分析模式，俾能應用在其他常見眼疾之定性與定量的評估工具。

十一、結論

本研究群聚焦於微生物角膜炎輔助診斷技術，期使現今實驗室頗具潛力的診斷方法與工具能迅速

圖 6.
拉曼散射光原理示意圖。拉曼散射光有別於雷利散射光，可以力學上非彈性碰撞與彈性碰撞與之比擬。非彈性之拉曼散射光譜具指紋般可供鑑別之特性。



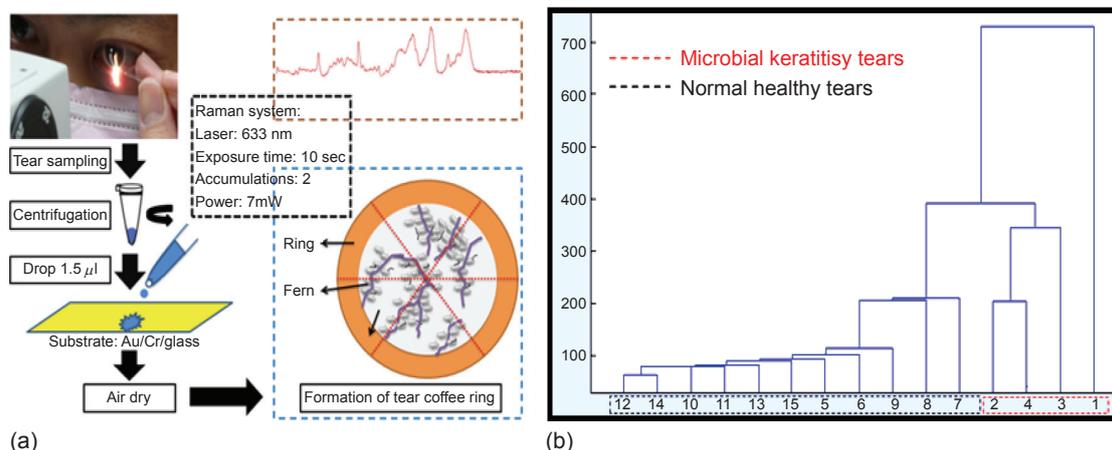


圖 7. (a) 淚液拉曼光譜鑑別平台。(b) 淚液拉曼光譜反應眼表疾病之光譜指紋，應用於本研究之角膜潰瘍。透過階層群集分析可鑑別健康眼睛與感染性角膜潰瘍眼睛之淚液拉曼光譜。

有效地導入臨床應用，俾挽救更多微生物角膜炎患者之視力、減少眼球損傷與手術需求。運用微生物角膜炎 DNA 陣列晶片與拉曼光譜顯微鏡淚液檢測技術，能兼顧精確與時效性，並輔助現有標準診斷程序，提升比過去微生物角膜炎更精確有效之診斷品質。

誌謝

本研究承蒙國立成功大學大標竿計畫 (D98-2720)、行政院衛生署卓越臨床試驗與研究中心 (DOH99-TD-B-111-102)、國科會計畫 (NSC99-2314-B-182A-030-MY3)，以及長庚醫學研究計畫 (CMRPG880701) 等研究經費支持，特此誌謝。

參考文獻

1. Y. Ohashi, M. Dogru, and K. Tsubota, *Clin. Chim. Acta.*, **369**, 17 (2006).
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Charge-coupled_device, in *Wikipedia*.
3. Y. Matsumoto, *Mol. Vis.*, **13**, 1319 (2007).
4. H. Y. Tan, Y. Sun, W. Lo, S. W. Teng, R. J. Wu, S. H. Jee, W. C. Lin, C. H. Hsiao, H. C. Lin, Y. F. Chen, D. H. K. Ma, S. C. M. Huang, S. J. Lin, and C. Y. Dong, *J. Biomed. Opt.*, **12**, 024013 (2007).
5. J. Shi, Y. Wu, M. Cai, and S. Shang, *Eur. J. Pediatr.*, **169**, 421 (2009).
6. A. J. Jaaskelainen, K. Moilanen, S. Buhler, M. Lappalainen, O. Vapalahti, A. Vaheri, and H. Piiparinen, *J. Virol. Methods*, **160**, 167 (2009).
7. N. R. Marcus, R. W. Kirk, and B. J. Dan, *Am. J. Ophthalmol.*, **129**, 372 (2000).
8. K. Brengel-Pesce, P. Morand, A. Schmuck, M. J. Bourgeat, M. Buisson, G. Bargu, M. Bouzid, and J. M. Seigneurin, *J. Med. Virol.*, **66**, 360 (2002).
9. W. Xu, M. C. McDonough, and D. D. Erdman, *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4114 (2000).
10. R. Sambursky, S. Tauber, F. Schirra, K. Kozich, R. Davidson, and E. J. Cohen, *Ophthalmology*, **113**, 1758 (2006).
11. K. T. Ripa and P. A. Mardh, *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 328 (1977).
12. C. Black, *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 160 (1997).
13. D. H. Martin, M. Nsuami, J. Schachter, E. W. Hook, III, D. Ferrero, T. C. Quinn, and C. Gaydos, *J. Clin. Microbiol.*, **142**, 4749 (2004).
14. J. Joseph, G. Vemuganti, and S. Sharma, *Indian J. Med. Microbiol.*, **23**, 80 (2005).
15. S. Rauz, S. Tuft, J. K. G. Dart, R. Bonshek, P. Luthert, and A. Curry, *J. Med. Microbiol.*, **53**, 775 (2004).
16. C. Franzen and A. Muller, *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 243 (1999).
17. B. Wilske, V. Fingerle, and U. Schulte-Spechtel, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **49**, 13 (2007).
18. H. Mikkilä, A. Karma, M. Viljanen, and I. Seppälä, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **237**, 225 (1999).
19. A. Fekkar, B. Bodaghi, F. Touafek, P. Le Hoang, D. Mazier, and L. Paris, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 1965 (2008).
20. L. de Visser, A. Rothova, J. H. de Boer, A. M. van Loon, F. T. Kerkhoff, M. R. Canninga-van Dijk, A. Y. L. Weersink, and J. D. F. de Groot-Mijnes, *Am. J. Ophthalmol.*, **145**, 369 (2008).
21. M. J. Bharathi, R. Ramakrishnan, R. Meenakshi, S. Mittal, C. Shivakumar, and M. Srinivasan, *Br. J. Ophthalmol.*, **90**, 1271 (2006).

22. W. D. Mathers, S. E. Nelson, J. L. Lane, M. E. Wilson, R. C. Allen, and R. Folberg, *Arch. Ophthalmol.*, **118**, 178 (2000).
23. E. Zunaina, H. Wan, H. Wan, Y. Y. Chan, N. H. A. Rashid, B. Kamarudin, S. K. Z. Abidin, S. Osman, Z. F. Zainuddin, and M. Ravichandran, *BMC Ophthalmol.*, **8** (2008).
24. J. E. Graham, J. E. Moore, X. Jiru, J. E. Moore, E. A. Goodall, J. S. G. Dooley, V. E. A. Hayes, D. A. Dartt, C. S. Downes, and T. C. B. Moore, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 5616 (2007).
25. H. Yera, O. Zamfir, T. Bourcier, E. Viscogliosi, C. Noel, J. Dupouy-Camet, and C. Chaumeil, *Br. J. Ophthalmol.*, **92**, 1139 (2008).
26. E. Kim, J. D. Chidambaram, M. Srinivasan, P. Lalitha, D. Wee, T. M. Lietman, J. P. Whitcher, and R. N. Van Gelder, *Am. J. Ophthalmol.*, **146**, 714 (2008).
27. S. K. Tung, L. J. Teng, M. Vanechoutte, H. M. Chen, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4414 (2006).
28. C. C. Chen, L. J. Teng, S. Kaiung, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 1515 (2005).
29. S. N. Leaw, H. C. Chang, H. F. Sun, R. Barton, J. P. Bouchara, and T. C. Chang, *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 693 (2006).
30. 張華, 科儀新知 **4**, (4) 83 (1983).
31. 李明知, 科儀新知 **14**, (5) 22 (1993).
32. 王俊凱, 科儀新知 **23**, (4) 46 (2002).
33. 王孟亮, 科學月刊 **14**, 830 (1983).
34. J. Filik and N. Stone, *Anal. Chim. Acta*, **616**, 177 (2008).
35. I. Siebinga, G. Vrensen, K. Otto, G. Puppels, F. De Mul, and J. Greve, *Exp. Eye Res.*, **54**, 759 (1992).
36. J. Duindam, G. Vrensen, C. Otto, and J. Greve, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 94 (1998).
37. N. J. C. Bauer, F. Hendrikse, and W. F. March, *Cornea*, **18**, 483 (1999).
38. J. L. Lambert, C. C. Pelletier, and M. Borchert, *J. Biomed. Opt.*, **10**, 031110 (2005).
39. H. Sato, D. Borchman, Y. Ozaki, O. P. Lamba, C. W. Byrdwell, M. C. Yappert, and C. A. Paterson, *Exp. Eye Res.*, **62**, 47 (1996).
40. J. Sebag, S. Nie, K. Reiser, M. Charles, and N. Yu, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**, 2976 (1994).
41. P. Bernstein, M. Yoshida, N. Katz, R. McClane, and W. Gellermann, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 2003 (1998).
42. W. Gellermann and P. S. Bernstein, *J. Biomed. Opt.*, **9**, 75 (2004).
43. H. F. M. Willemse-Erix, J. Jachtenberg, H. Barutci, G. J. Puppels, A. van Belkum, M. C. Vos, and K. Maquelin, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 736 (2010).
44. A. J. Berger and A. J. Qinqyuan Zhu, *J. Mod. Opt.*, **50**, 2375 (2003).
45. A. Sengupta, M. Mujacic, and E. Davis, *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1379 (2006).



郭明澤先生為國立成功大學醫學士，現為長庚醫療財團法人高雄長庚紀念醫院眼科主治醫師，並就讀於國立成功大學醫學工程研究所博士班。

Ming-Tse Kuo received his medical doctor degree at National Cheng Kung University. He is currently an attending physician in the Department of Ophthalmology at Chang Gung Memorial Hospital, Kaohsiung Medical Center, and a Ph.D. student in the Institute of Biomedical Engineering at National Cheng Kung University.



林其昌先生為國立台灣科技大學高分子工程博士，現任東海大學化學工程與材料工程學系助理教授。

Chi-Chang Lin received his Ph.D. in polymer engineering from National Taiwan University of Science and Technology. He is currently an assistant professor in the Department of Chemical and Materials Engineering at Tunghai University.



張長泉先生為台灣大學農化系博士，現任國立成功大學成大醫學檢驗生物技術學系教授。

Tung-Chain Chang received his Ph.D. in agriculture chemistry from Taiwan University. He is currently a professor in the Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology at National Cheng Kung University.



張憲彰先生為日本東北大學應用化學博士，現任國立成功大學醫學工程研究所教授以及奈米科技暨微系統工程研究所教授。

Hsien-Chang Chang received his Ph.D. in applied chemistry engineering from Tohoku University, Japan. He is currently a professor in the Institute of Biomedical Engineering and an adjunction professor in the Institute of Nanotechnology and Microsystems Engineering at National Cheng Kung University.