

引用本文: 感染性眼病细菌学检查操作专家共识(2019). 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2019, 21(2): 81-85. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2019.02.001.

·专家共识·Consensus·

编者按: 感染性眼病细菌学检查操作专家共识(2015版)自2016年1月份出版以来, 共识得到了业内同行的一致认可, 也收到了同行专家的建设性建议。根据2015版共识中的说明, 试用2年后根据实际情况修订后再正式发布, 因此在经过书面征求意见及再次集中讨论后, 形成2019版的内容。本次修订内容主要集中在以下几个方面:

1. 增加了感染性眼病病原菌谱/定植谱相关内容
2. 修订了报告内容和格式要求
3. 修订了标本保存和运送相关要求
4. 修订了标本培养操作相关要求
5. 根据MCM最新版本内容, 明确一些具体操作细节

鉴于以上更新内容对实际工作的指导意义, 尤其是眼部病原谱及定植谱知识对实验室工作人员的重要性以及规范的实验室报告对临床的重要作用, 决定再次出版。



扫一扫下载指南原文

感染性眼病细菌学检查操作专家共识(2019)

眼科检验协作组

通信作者: 郑美琴 (ORCID: 0000-0002-5262-8110), Email: zmqllylh@126.com

关键词: 细菌性眼感染; 微生物技术; 专家共识

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2019.02.001

Expert Consensus for the Operating Procedures for Bacterial Examination of Ocular Infection (2019)

Ophthalmological Examination Assistance Group

Key words: bacterial eye infection; microbiological techniques; expert consensus

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2019.02.001

1 细菌学检查标本采集基本原则及指征

1.1 基本原则

①应在病程早期、急性期, 且尽可能在使用抗菌药物之前采集标本。如有条件, 建议采集双侧眼标本(即使单侧眼发病)进行涂片镜检及培养^[1], 或者健康眼仅采集分泌物行涂片镜检。如果已使用抗菌药物则根据临床需要酌情停药后或下次用药前采集标本。

②应根据不同的标本类型、检查目的使用适当的采集、保存、运送工具。对于各种分泌物推荐使用预先用无菌0.9%氯化钠溶液沾湿的符合眼科临床要求的无菌拭子。采样后应即刻涂片(以防止样本干涸), 建议实行床边接种(尤其厌氧菌培养), 否则应将标本保存在运送培养基中送检。送检时

必须精确标明患者及样本相关信息, 如眼别、具体取材部位、标本类型、用药情况、采样人、采样时间等^[2]。

③应尽可能采集到足量标本并注意无菌操作。采集与外界相通的腔道或体表标本时, 如眼表及泪道样本, 应注意避免眼睑、睫毛及周围皮肤表面正常菌群的污染, 以免造成病原菌与正常菌群相混淆致使临床误诊; 采集房水、玻璃体等标本时, 应注意严格执行无菌操作。

④应由接受过专业培训的人员进行标本采集。眼表标本包括结膜囊分泌物、角/结膜刮取物、泪道分泌物、睑板腺分泌物、睫毛等, 由经专业培训过的医务人员采集; 眼内标本如房水、玻璃体、异物等由培训过的手术医师采集。

⑤标本采集后应立刻送检(15 min内)^[1]。由于大多数眼部标本的取材量少, 建议进行床边接种和制备涂片, 必要时也可以在体积少于检测所需量的液体标本中加入0.5~1.0 ml 0.9%氯化钠溶液或营养肉汤^[1], 并在结果报告中注明样本已经稀释, 如“为完成所有申请的检测项目, 样本已被稀释”。

⑥眼内炎、泪囊炎及常规细菌培养阴性, 高度怀疑厌氧菌感染时, 建议增加厌氧培养。

⑦采集标本前, 充分与患者沟通, 取得患者的理解和配合。

1.2 采样指征

①怀疑急性细菌性结膜炎、角膜炎、眼内炎、眼睑/眶蜂窝组织炎、睑缘炎、睑皮炎、泪腺及泪道感染疾病等。②怀疑眼部慢性细菌性感染,但常规抗菌药物治疗无效时。③眼外伤后怀疑细菌感染时。④内眼手术前结膜囊细菌培养(必要时)。⑤角膜移植组织、角膜保存液、接触镜及其他眼科材料、眼药等需要排除细菌污染时。

2 常见标本类型采集方法及采集量

2.1 结膜囊分泌物的采集

2.1.1 采集器具 推荐使用植绒拭子^[3]、无菌0.9%氯化钠溶液或其他符合眼科使用要求的培养基,如大豆-酪蛋白肉汤(TSB)等。

2.1.2 采集方法 标本应由经过培训的专业人员采集;采样前使用无菌0.9%氯化钠溶液/TSB等预先湿润拭子(注意尽量在试管壁上挤压去掉多余液体);采样时(尽量不用麻醉剂)嘱患者向上注视,翻转下眼睑,暴露下方球结膜和下穹隆结膜,用无菌0.9%氯化钠溶液/TSB等湿润过的无菌拭子由内眦部开始从内到外旋转轻拭结膜囊和睑结膜表面(注意不遗漏内眦部),避免接触睫毛和睑缘,必要时使用开睑器等器具物品,采样后立即处理(涂片和接种),或将标本放入无菌转运管中做好标记立即送往微生物实验室^[4,5]。

2.2 泪道标本的采集

标本采集应由经过培训的专业人员操作;采集泪道标本时,取一拭子压迫泪囊或泪小管皮肤面,用另一预先湿润过的拭子擦取泪小点处返流物。

2.3 结膜/角膜刮片的采集

2.3.1 采集器具 推荐使用无菌15号手术圆刀片^[6],也可以使用刮匙等。

2.3.2 结膜刮片采集 刮取前,先滴表面麻醉滴眼液(尽可能使用无防腐剂的制剂)^[6],对结膜进行表面麻醉。若结膜病变处分泌物过多,可先用灭菌湿棉签去除分泌物。然后一手翻转并固定眼睑,以暴露睑结膜,另一手持灭菌刀片,根据病变情况和检查需要,选择刮取部位,使刮刀与组织表面垂直平行移动,刮取标本。刮取标本后回复眼睑,然后滴用抗菌滴眼液。

2.3.3 角膜刮片采集 刮取前,先滴表面麻醉滴眼

液(尽可能使用不含防腐剂的制剂)^[6],对角结膜进行表面麻醉。接着用手指或用开睑器撑开眼睑,检查病灶情况。若病变处分泌物过多,可先用灭菌湿棉签去除分泌物。然后引导患者固定于适当眼位,避免眼球转动,选角膜溃疡的进行缘或基底部刮取标本。刮取标本后,滴用抗菌滴眼液。

2.4 房水采集

由培训过的眼科医师在手术室内完成。麻醉并进行常规结膜囊清洁后,用1 ml无菌注射器,于角巩膜缘平行虹膜平面穿刺入前房,抽取房水约0.1 ml。

2.5 玻璃体采集

2.5.1 注射器抽取法 由培训过的眼科医师在手术室内完成。麻醉并进行常规结膜囊清洁后,以22号一次性针头连接1 ml无菌注射器,角巩膜缘后平坦部垂直巩膜向眼球中心方向穿刺入玻璃体腔10 mm,抽取尽可能多的玻璃体样品(不少于0.2 ml)。

2.5.2 玻璃体切割头法^[7] 由培训过的眼科医师在手术室内完成。麻醉并进行常规结膜囊清洁后,玻璃体切割头吸引管接口外接1 ml无菌注射器,并手动抽吸;标准三通道切口,在向眼内灌注和眼内扰动前,将已在吸引管接口外接无菌注射器的玻璃体切割头置于玻璃体腔中心区,抽取玻璃体样本不少于0.5 ml(含灌注液的大体积标本需特殊处理,申请单需注明用药情况,采集最初的灌注液,不少于1.0 ml)。

2.6 异物采集

由培训过的眼科医师在手术室内完成,注意无菌操作。

3 常见标本类型的预处理措施

3.1 结膜囊分泌物

标本采集完成后,取洁净的玻片,直接用无菌拭子(已用无菌0.9%氯化钠溶液或TSB湿润过)在玻片上划定区域内(约1 cm×2 cm)涂抹制成涂片,取另一拭子以滚动的方式涂布接种于普通巧克力琼脂平板、哥伦比亚血琼脂平板、厌氧血琼脂平板(必要时)^[8];若由于实际需要需将拭子接种于增菌培养基,则报告时需注明。

3.2 泪道标本

泪道分泌物基础培养基接种及制作涂片方法同结膜囊分泌物。

泪道结石,一份用压片的方式进行形态学检查,另一份(推荐使用研磨器研磨)以折线路径涂布接种于普通巧克力琼脂平板,有条件的实验室增加厌氧血平板或巯基乙酸盐肉汤进行厌氧培养^[9]。

3.3 结膜及角膜刮取物

用刀片采集尽可能多的标本后即时接种,或将刮取物置于转运试管(带转运拭子和运送培养基),并确保标本浸入液体转运介质中^[6]。

置于转运介质中的标本推荐经研磨或充分震荡后,再接种于普通巧克力琼脂平板、血琼脂平板以及制作涂片做形态学检查(推荐标本直接接种及涂片),必要时增加厌氧培养。

3.4 房水及玻璃体液

常规方法:手术采集房水(0.1~0.2 ml)/玻璃体液(0.5 ml)分别用注射器加0.05/0.2 ml标本至液体增菌培养基(专用培养基或儿童血培养瓶)^[7, 10],0.05/0.2 ml标本至真菌培养基内(标本量足够时建议增加厌氧培养),剩余标本直接滴于洁净玻片上,制成涂片送检,或尽快送样本至实验室处理。

3.5 异物

异物取出后,放入1 ml液体增菌培养液充分振荡1 min,培养液分别接种于普通巧克力琼脂平板、血琼脂平板以及制作涂片做形态学检查,异物交还临床保存。

3.6 刮片及分泌物涂片制作要求

标本采集完成后,建议制成2张涂片,做好标记,待涂片自然干燥后推荐用95%乙醇固定5 min或滴加10%甲醇直接固定^[7, 11]。

3.7 拒收标本标准

采集量过少;送检时间过长;厌氧培养未及时接种的样本;样本已干涸;标本明显污染;送检样本、玻片、培养皿或增菌管标识不清楚;申请单填写不全等。如有特殊情况不能重复采样而临床要求出结果时,则报告中需添加备注“已通知临床,结果仅供参考”。

4 标本运送

采集的样本及接种于各种平板的标本,要求在室温下15 min内送达实验室;专用拭子采集的标本要求在室温下2 h内送达,特殊情况下标本无法按时送达实验室时,应使用运送培养基保存标本,运送培养基应置于室温保存,不可冷藏或冷冻,且不应超过24 h。涂片与培养标本一起运送。标本运送过程注意符合生物安全要求。实验室收到标本应即刻签收并及时处理。

5 标本形态学检查及报告方式

5.1 染色方法的选择

实验室接到标本后,根据不同需要选择不同的染色方法,常规推荐革兰染色和瑞氏吉姆萨染色,必要时增加抗酸染色等(可在前2种染色基础上直接进行抗酸染色),也可根据临床医师的建议选择其他特殊染色方法。

5.2 涂片及刮片镜检报告格式

5.2.1 病原学报告 细菌:找到革兰阳/阴性球/杆菌,菌量描述(平均个数/油镜视野),要描述排列方式、细菌与白细胞及吞噬细胞的关系(如吞噬等)。真菌:要描述菌丝及孢子形态,菌量描述(平均个数/油镜视野),详见真菌检验规范。观察全部涂片区未找到细菌,则报告未找到。

5.2.2 细胞学报告 根据瑞氏吉姆萨染色结果,报告视野中分叶核细胞/上皮细胞/单核细胞/巨噬细胞等种类,数量可按照“某一类细胞数/HP”,特殊情况下白细胞可以按照中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞等分别报告。

5.2.3 报告形式 常规使用文字描述报告。注意,标本量过少或者涂片太厚以及高度怀疑污染而难以判断时,须在报告单中备注说明,比如“上皮细胞偶见,建议复查”、“镜下可见2种以上细菌”、“请结合培养结果及临床表现综合判断”等。在眼内液标本中需注意色素颗粒与革兰阳性球菌的区别,革兰染色后,色素颗粒多呈淡褐色,大小不一。有条件的单位,建议发图文报告。具体要求可参照《细菌与真菌涂片镜检和培养结果报告规范专家共识》^[2]。眼内液中找到细菌或真菌时应按照危急值程序进行报告。

6 细菌培养的操作及报告

6.1 培养操作及要求

6.1.1 分泌物等未增菌的标本 采集后应即刻接种于普通巧克力琼脂平板和血琼脂平板并及时送到微生物实验室。实验室收到标本后,血琼脂平板和普通巧克力琼脂平板置5%~10% CO₂ 孵箱35℃培养48 h(结果阴性但临床高度怀疑感染的标本需要再继续培养24 h至5 d^[5],如怀疑诺卡菌或分枝杆菌等特殊细菌则需要继续延长观察时间)。至少24 h观察1次,必要时12 h观察1次。如果有菌落生长则结合标本涂片结果进行初步分析后报告临床,并进一步完成细菌鉴定和药敏试验。厌氧菌培养按厌氧菌培养规范处理。

6.1.2 接种于增菌液(建议手工法用双相瓶,仪器法用儿童血培养瓶或专用培养瓶)的标本 置于(35±1)℃恒温培养箱培养,手工法每天观察至少3次,一旦发现阳性,立即无菌抽取瓶中培养液转种血琼脂平板和普通巧克力琼脂平板^[5, 8]。置5%~10% CO₂ 环境(35±1)℃培养孵箱中培养。同时做涂片,结合标本涂片结果进行综合分析后,尽快将涂片结果作为一级报告发送。然后结合后续的生长情况、生化鉴定反应及药敏结果等给予完整报告。如果手工法培养7 d后或仪器法培养5 d后未见生长,可发阴性报告。建议到期当天取培养物直接涂片行革兰染色并盲传血平板和巧克力平板,如为阳性结果可补发阳性报告,报告中应注明增菌时间。特殊情况(遵医嘱)可延长孵育时间至2周或以上。

6.1.3 厌氧培养标本接种厌氧平板,置厌氧环境中(35±1)℃培养,至少48 h观察1次^[12],无菌生长5 d^[13](必要时可延长至7 d^[14])报告,具体根据厌氧菌操作规程进行。

6.1.4 怀疑分枝杆菌感染的标本建议按照分枝杆菌的常规方法处理。

6.2 病原学诊断报告

6.2.1 病原谱和定植谱/污染谱 通常情况下,房水和玻璃体是无菌的;正常人结膜囊可无细菌,也可见少数表皮葡萄球菌、甲型链球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等;眼睑、睑缘等处可见表皮葡萄球菌、类白喉杆菌等寄生^[13]。眼部常见致病菌因感染的部位不同而不同,主要病原微生物包括^[1, 13]:

细菌性结/角膜炎:肺炎链球菌、金黄色葡萄

球菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、白喉棒状杆菌、结核分枝杆菌、快速生长分枝杆菌、土拉弗朗西斯菌、梅毒螺旋体、巴尔通体、多杀巴斯德菌、结膜炎莫拉菌、铜绿假单胞菌、肠球菌、化脓性链球菌(A群)、埃希菌属、沙门菌、不动杆菌、类杆菌属(脆弱类杆菌)、凝固酶阴性葡萄球菌(术后)、痤疮丙酸杆菌(尤其是术后)等。

细菌性眼内炎:金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、痤疮丙酸杆菌、肺炎链球菌、表皮葡萄球菌、脑膜炎奈瑟菌、沙门菌属、蜡样芽孢杆菌、诺卡菌属、梭状芽孢杆菌属、产气荚膜杆菌等。

急性泪囊炎:肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、β溶血性链球菌、流感病毒、类杆菌属(脆弱类杆菌)、放线菌等。

6.2.2 分泌物、结石、角膜刮片等标本

6.2.2.1 阴性结果 培养48 h(自接种到固体培养基开始计时),未见细菌生长。

6.2.2.2 阳性结果 有×种菌生长,××细菌(注明鉴定方法,如手工、仪器,并保存原始记录),结合标本涂片结果进行分析后,报告可疑的致病菌并给出建议,同时报告药敏结果。

6.2.3 房水、玻璃体、异物等标本

6.2.3.1 阴性结果 根据6.1培养要求,如达到规定时间后未见生长,则报“经××天培养,无菌生长”,如在正常报告阴性当日再盲传后发现阳性,则补发报告单,并和临床做好沟通。如果涂片找到细菌,培养未见细菌生长,应备注提示。

6.2.3.2 阳性结果 有×种菌生长,××细菌,结合标本涂片结果进行分析后报告可疑的致病菌,同时报告药敏结果。详细报告要求可参照《细菌与真菌涂片镜检和培养结果报告规范专家共识》^[2]。

6.3 危急值报告,包括房水、玻璃体、异物及其他眼内容物等培养阳性结果,按危急值报告程序处理。

7 生物安全

所有标本均应视为具有潜在生物危害的标本,必须按照标准防护措施处理标本。

声明:本规范仅供医务人员在临床工作中参考,不具备法律效力,其中观点及操作要点也需要随着各种技术的进步不断完善。

形成共识意见的专家组成员(按姓氏汉语拼音为序, 排名不分先后):

曹文俊 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院
 陈东科 卫生部北京医院检验科
 陈蔚 温州医科大学附属眼视光医院
 康玉国 山西省眼科医院
 李向阳 温州医科大学附属第二医院检验科
 李雅军 天津市眼科医院
 梁庆丰 首都医科大学附属北京同仁医院
 梁远波 温州医科大学附属眼视光医院
 刘李英 福州眼科医院
 鲁辛辛 首都医科大学附属北京同仁医院眼科
 鹿秀海 山东省眼科医院
 瞿佳 温州医科大学附属眼视光医院
 马文江 天津医科大学眼科中心
 宋宗明 温州医科大学附属眼视光医院
 孙声桃 河南省立眼科医院
 吴开力 中山眼科中心
 许芬芳 厦门大学附属厦门眼科中心
 俞阿勇 温州医科大学附属眼视光医院
 张建英 宁波市眼科医院
 张阳 首都医科大学附属北京同仁医院
 赵振全 温州医科大学附属眼视光医院
 郑美琴 温州医科大学附属眼视光医院

参考文献:

- [1] A Jorgensen JH, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Premstaetten: ASM Press, 2015.

- [2] 王辉, 马筱玲, 宁永忠, 等. 细菌与真菌涂片镜检和培养结果报告规范专家共识. 中华检验医学杂志, 2017, 40(1): 17-30. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2017.01.006.
- [3] Nogueira DC, Ueda SM, Murça MA, et al. Comparison of two transportation media for study of normal individual conjunctival microbiota. Arq Bras Oftalmol, 2007, 70(6): 929-934.
- [4] 牛梅民, 张小娟, 黄怀洁, 等. 白内障术前结膜囊菌群分布和药敏试验研究. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2012, 34(12): 891-895. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-1477.2012.12.004.
- [5] 林琳, 褚云卓, 佟玲, 等. 764例儿童眼分泌物细菌培养菌种分布及药敏结果分析. 沈阳医学院学报, 2008, 10(4): 224-225.
- [6] Pakzad-Vaezi K, Levasseur SD, Schendel S, et al. The Corneal Ulcer One-Touch Study: A simplified microbiological specimen collection method. Am J Ophthalmol, 2015, 159(1): 37-43.e1.
- [7] 张凤梅. 眼内炎199例患者病原学检测及药敏分析. 中国全科医师杂志, 2014, 17(25): 3017-3020.
- [8] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜, 等. 全国临床检验操作规程. 3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 738-743, 749-752.
- [9] 赵慧英, 孙旭光. 厌氧菌性角膜炎. 眼科研究, 2006, 24(2): 216-218.
- [10] 任玉玲, 薛黎萍, 刘春林, 等. 全自动血培养系统在外伤性眼内炎的临床应用. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2012, 34(10): 752-754. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-1477.2012.10.010.
- [11] 倪语星, 王金良, 徐春英, 等. 眼部感染实验室诊断规范. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 14.
- [12] 陆永绥, 张伟明, 酆卫星, 等. 临床检验管理与技术规程. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2014: 1028.
- [13] 刘祖国. 眼科学基础. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 84-89.
- [14] Nicolas YB, Noah SS, Salah DS. Microbiology of Chronic Ethmoid Sinusitis: Is This a Bacterial Disease? Am J Otolaryngo, 2004, 25(6): 379-384.

(收稿日期: 2018-11-11)

(本文编辑: 毛文明)