

感染性眼病细菌学检查操作专家共识(2015 年)

眼科检验协助组

临床微生物检验标本的采集正确与否,直接影响到病原菌的检出率。规范的采集、运送、保存与处理临床微生物检验标本,对于保证临床微生物检验工作质量至关重要。可靠的检验结果可以指导临床诊断和治疗,为临床科学用药和控制感染提供依据。

为准确检出病原菌,避免漏检及误诊,临床医护人员及实验室工作人员必须正确掌握临床微生物标本采集、运送、保存与处理的原则和方法,鉴于眼部标本的特殊性,该项工作尤为重要。为此,由温州医科大学附属眼视光医院/浙江省眼科医院及中山大学中山眼科中心牵头先后于 2014 年 12 月在温州,2015 年 4 月在广州组织国内临床微生物学专家、眼科专家、眼科医院检验科及相应实验室专家,讨论并制订了《感染性眼病细菌学检查操作专家共识》,为感染性眼病相关微生物学检查、标本采集和处理提供指导。

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。对于各种分泌物的采集,推荐使用预先用无菌生理盐水等沾湿的符合眼科临床要求的无菌拭子。采集到的标本应置于无菌容器内送检。盛装标本的容器不能使用消毒剂处理,标本中也不得添加防腐剂,以免降低病原菌的分离率。有条件的实验室应实行床边接种,无条件的实验室应将标本保存在运送培养基中送检。③应尽可能采集到足量标本并严格执行无菌操作。采集与外界相通的腔道或体表标本时,如结膜囊分泌物、泪道分泌物等,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涂片、角膜刮片、睫毛等由经过培训的专业医生、护士、实验室人员采集,眼内标本如房水、玻璃体、异物等由经过培训的手术医生采集。⑤标本采集后应立即送检(15 min 内)。由于大多数眼部标本的取材量较少,建议进行床边接种和制备涂片,眼部无菌标本建议先增菌再接种到固体培养基上。⑥采集标本前,需充分与患者沟通并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/眼眶蜂窝组织炎、睑缘炎、睑皮炎、泪腺及泪道感染等疾病。②怀疑眼部慢性细菌性感染,但常规抗菌药物治疗无效。③眼外伤后怀疑细菌感染。④内眼手术前行结膜囊细菌培养。⑤角膜移植组织、角膜保存液、角膜接触镜及其他眼科材料、滴眼液等需要排除细菌污染。

2 常见标本类型采集方法及采集量

2.1 结膜囊分泌物采集

2.1.1 采集器具 推荐使用植绒拭子、无菌生理盐水或其他符合眼科使用要求的培养基,如胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptic soy broth, TSB)等。

2.1.2 采集方法 标本应由经过培训的专业人员采集:采样前使用无菌生理盐水或 rSB 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。用无菌生理盐水/TSB 等湿润过的无菌拭子由内眦部开始从内到外旋转轻拭下方结膜囊和下睑结膜表面(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,采样后立即送检。或将标本放入无菌转运管中做

好标记立即送往微生物学实验室。

2.2 泪道标本采集

标本采集应由经过培训的专业人员操作：采集泪道标本时，将一拭子放置在泪小管区后方，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反流物。

2.3 结膜 / 角膜刮片采集

2.3.1 采集器具 推荐使用 15 号手术圆刀片。

2.3.2 结膜刮片采集 刮取前，使用表面麻醉药滴眼液(尽可能使用无防腐剂的制剂)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；翻转眼睑暴露睑结膜；一手固定睑结膜，另一手持灭菌刀片，使刮刀与组织表面垂直；根据病变情况和检查需要，选择合适部位并刮取标本；刮取完成后，滴用抗菌药物滴眼液。

2.3.3 角膜刮片采集 刮取前，使用表面麻醉药滴眼液(尽可能使用无防腐剂的制剂)；用手指将睑裂撑开，或用开睑器撑开眼睑，若病变处分泌物过多，可先用灭菌湿棉签去除分泌物；嘱咐患者避免眼球转动；选择角膜溃疡的进行缘或基底部刮取标本；刮取标本后，滴用抗菌药物滴眼液。

2.4 房水采集

由经过培训的眼科医生在手术室内完成：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，避开脓性液抽取房水约 0.1 ml。

2.5 玻璃体采集

2.5.1 注射器抽取法 由经过培训的眼科医生在手术室内完成：麻醉并进行常规结膜囊清洁后，用 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穿刺入玻璃体腔 10 mm。抽取尽可能多的玻璃体样本(不少于 0.2 ml)。

2.5.2 玻璃体切割头法 由经过培训的眼科医生在手术室内完成：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；标准三通道切口，在向眼内灌注眼内扰动前，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，手动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 1.0ml)。

2.6 异物采集

由经过培训的眼科医生在手术室内完成，严格执行无菌操作。

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，直接用无菌拭子(已用无菌生理盐水或 TSB 湿润过)在血琼脂平板、普通巧克力琼脂平板(需 5%~10% 的 CO₂ 环境)、厌氧血琼脂平板(必要时)表面以拭子滚动的方式涂布接种后，取洁净的玻片，用同一个拭子未接触平板的部分或另取一个拭子制成涂片送形态学检查。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，使用研磨器研磨后。一份用压片的方式进行形态学检查，一份以折线路径涂布接种于普通巧克力琼脂平板(需 5%—10% 的 CO₂ 环境)。有条件的实验室增加接种于巯基乙酸盐肉汤进行厌氧菌培养同。

3.3 结膜及角膜刮片

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。

置于转运培养基中的标本经研磨或充分震荡后，实验室人员将标本接种于血琼脂平板、普

通巧克力琼脂平板以及制作涂片做形态学检查(推荐用标本直接涂片),必要时进行厌氧菌培养。

3.4 房水及玻璃体

常规方法:手术采集房水(0.1~0.2 ml)或玻璃体液(0.5 ml),量尽可能多,分别用注射器加 0.05 ml(房水)或 0.2 ml(玻璃体)至液体增菌培养基(专用培养基或儿童血培养瓶)[5] 和真菌培养基内(标本量足够时建议增加厌氧菌培养),剩余标本直接滴于洁净玻片上,制成涂片,尽快送至实验室。

3.5 异物

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

3.6 涂片制作要求

标本采集完成后,用无菌拭子或拔除针头后的注射器在洁净带磨砂玻片中间位置,自内而外涂成直径 1.0~1.5cm 的近圆形(刀片刮取物直接涂片,要求尽量涂开),制成 2 张涂片,做好标记,待涂片自然干燥后用 95%乙醇固定 5 min 或滴加 10%甲醇直接固定。

4 标本运送

标本采集后尽快送至实验室。特殊情况下,标本无法送达实验室时,应使用运送培养基,置于室温保存,不可冷藏或冷冻,且不应超过 12 h。运送过程需符合生物安全要求。

5 标本常规检查项目及报告方式

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,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,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,报告视野中白细胞/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:有条件的单位,建议发图文报告,图片采用油镜(x1000)下形态。1 h 内报告。

5.3 细菌培养实验室内的操作及要求

5.3.1 常规标本培养 标本采集后应尽快接种于血琼脂平板和普通巧克力琼脂平板并及时送到微生物实验室。实验室收到标本后,血琼脂平板置普通孵箱 35~37℃培养,普通巧克力琼脂平板置 5%~10%CO₂孵箱培养 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,最长不超过 5 d),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分析后,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。

5.3.2 增菌液标本培养 接种于增菌液(手工法建议用双相瓶,仪器法用儿童瓶)的标本,置于 35~37℃恒温培养箱培养,每天观察(至少 3 次)或直接作为血培养标本行全自动血培养系统分析。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,血

琼脂平板置普通孵箱 35~37℃培养，普通巧克力琼脂平板置 5%~10%CO₂ 环境孵箱中培养，同时做涂片，结合标本涂片结果进行分析后，第一时间将涂片结果作为一级报告发送。后续根据细菌生长情况、生化鉴定反应及药敏试验结果等给予完整报告。如果手工法培养 7 d、仪器法培养 5 d 后未见生长，则报告阴性结果，建议阴性报告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，如盲传阳性则补发报告单，并和临床做好沟通。

5.3.3 厌氧菌培养 厌氧菌培养标本接种于厌氧平板置厌氧环境中 35~37℃培养至少 48 h，无菌生长 5 d，必要时可延长至 7 d 报告，具体根据厌氧菌操作规程进行。

6 病原诊断报告

6.1 分泌物、结石、角膜刮片等标本

6.1.1 阳性结果 有#种菌生长，##细菌(注明鉴定方法，如手工、仪器及鉴定结果的分值，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，同时报告药敏试验结果。

6.1.2 阴性结果 培养 48 h(自接种到固体培养基开始计时)，未见致病菌生长。

6.2 房水、玻璃体、异物等标本

6.2.1 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。同时报告药敏试验结果。

6.2.2 阴性结果 直接培养 48 h(自接种到固体培养基开始计时)，增菌培养手工法 7 d、仪器法 5 d，报告无细菌生长。如果涂片找到细菌，培养未见细菌生长，应备注提示。

6.3 分枝杆菌

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。

6.4 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。

6.5 拒收标本标准

样本采集量过少；标本明显污染；申请单填写不全等。如有特殊情况，临床要求出结果的，则需添加备注“已通知临床。结果仅供参考”。

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。

说明：1. 本规范暂以试用版发布，在临床试用 1 年后集中反馈意见。并根据实际情况修改后再正式发布。2. 本规范仅供医务人员在临床工作中参考，不具备法律功效，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。