专家述评

规范病原学诊断路径促进感染性眼病精准医疗

郑美琴，　郑钦象，　楼永良，　陈　蔚

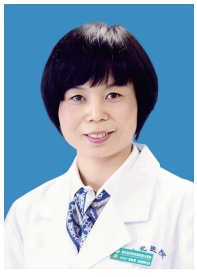
基金项目："艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治"科技重大专项项目(编号:2018ZX10201001)

作者单位：325027　浙江,温州医科大学附属眼视光医院,国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心(郑美琴,郑钦象,陈　蔚)；325035　浙江,温州医科大学检验医学院、生命科学学院,检验医学教育部重点实验室,温州市环境卫生微生物检验重点实验室(楼永良)

作者简介：郑美琴(1971－),女,医学硕士,主任技师,研究方向:眼部感染与免疫、眼部微生态。E-mail:zmq@ eye. ac. cn

通讯作者：陈　蔚(1972－),男,医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:角膜与眼表的基础与临床研究,人工智能在眼表疾病诊断中的应用,生物材料及转化医学研究。E-mail:chenwei@ eye. ac. cn

陈　蔚,教授,主任医师,博士研究生导师。中国医师协会眼科分会眼感染学组副主任委员,中华眼科学会专家会员,亚洲干眼学会创始会员,《中华眼视光学与视觉科学杂志》编委,《亚太眼科学杂志》编委。温州医科大学附属眼视光医院副院长,博鳌国际眼视光眼科医院院长,宁波市眼科医院院长。入选浙江省卫生高层次创新人才和浙江省万人计划科技创新领军人才。主持国家科技部重点研发计划项目课题 1 项和国家自然科学基金面上项目 3 项,以第一或通讯作者发表 SCI 收录论文 40 篇,他引次数超 2 000 次,H－指数 26。从事眼科临床工作 20 余年,擅长复杂和屈光性白内障手术、深板层角膜移植、角膜内皮移植手术、波士顿人工角膜移植等。具有 2 万例以上复杂白内障和 3 000 例以上各类角膜移植手术经验。



郑美琴,主任技师,硕士研究生导师。眼科检验医学联盟理事长,中国医学装备协会眼科专业委员会眼科检验检测学组副组长,长三角罕见病实验诊断协作中心专家委员会委员、浙江省医师协会检验医师分会委员等职。温州医科大学附属眼视光医院检验病理中心主任。主持和参与国家自然科学基金、省自然科学基金等课题 10 余项,以第一或通讯作者发表论文 60 余篇,作为通讯作者推出《感染性眼病细菌学检查操作专家共识》,参与《临床微生物检验诊断报告模式专家共识》、《宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识》等多个专家共识编写。从事医学检验工作近 30 年,擅长眼部感染与免疫、眼部微生态等相关研究。

［摘要］　感染性眼病是临床常见的眼部疾病,尤其是在发展中国家,其发病率较高。在我国,由角膜感染引起的角膜盲发病率仅次于白内障。因感染原因和部位的不同,其临床表现和预后也不一。轻微的眼部感染仅引起眼部不适症状,如眼红、眼痒和异物感等,而严重感染会引起角膜溃疡、化脓、穿孔以及眼内炎等,从而影响患者视力,严重者甚至有失明和眼球摘除的风险。因此,对眼部感染性疾病进行规范化诊治尤为重要。临床上需要临床医师和检验医师运用各种检查方法和检测技术对眼部感染性疾病进行快速的病原学诊断,同时结合特征性的临床体征,才能实现对疾病的精准治疗。然而,由于眼部组织结构的特殊性,综合医院检验科技术人员对眼部标本特点不熟悉,眼科医师缺少实验室基本技能的培训等原因,导致感染性眼病的病原学诊断成为难点,尤其是眼部样本的采集和预处理成为最大的困扰。随着各种眼部特殊检查设备以及实验室新技术的引入,加快了病原学诊断的发展步伐,从而更好地为感染性眼病的诊疗提供客观依据。

［关键词］　眼感染；　病原学；　诊断技术；　样本处理；　眼内液；　基因组测序

［中图分类号］　R 77　［文献标识码］　A　［文章编号］　1674－3806(2021)03－0231－07

doi:10. 3969/j. issn. 1674－3806. 2021. 03. 03

Standardizing etiological diagnostic pathways to promote precision medicine of ocular infections

ZHENG Mei-qin, ZHENG Qin-xiang, LOU Yong-liang, et al. Optometry and Eye Hospital, Wenzhou Medical University, National Clinical Research Center for Ocular Diseases, Zhejiang 325027, *China*

［**Abstract**］　Ocular infections are common clinical ocular diseases, and especially in developing countries, the

incidence of the diseases is relatively high. In China, the incidence of corneal blindness caused by corneal infections is second only to cataract. The clinical presentations and prognoses of infectious diseases of the eyes vary according to the cause and site of infections. Mild ocular infections only cause symptoms of ocular discomfort such as red eyes, itchy eyes and foreign body sensations, whereas severe infections can lead to symptoms such as corneal ulcers, suppurative keratitis, corneal perforations and endophthalmitis, thereby affecting the patients' visual acuity, and even leading to the risk of blindness and eye enucleation in severe cases. Therefore, it is particularly important to standardize the diagnosis and treatment of ocular infectious diseases. In clinical practice, clinicians and laboratory physicians need to use a variety of inspection methods and detection techniques for rapid etiological diagnosis of ocular infectious diseases, combining with the characteristic clinical signs, in order to achieve precision medical treatment of the diseases. However, due to the particularity of ocular tissue structures, the laboratory technicians in general hospitals are not familiar with the characteristics of ocular specimens, and ophthalmologists lack the training of basic laboratory skills, leading to the etiological diagnosis of ocular infectious diseases become difficult, especially the collection and pretreatment of eye samples become the biggest trouble. With the introduction of various special eye examination equipments and new laboratory technology, the development of etiological diagnosis has been accelerated, so as to better provide objective basis for the diagnosis and treatment of ocular infectious diseases.

[**Key words**] Ocular infections; Etiology; Diagnostic techniques; Sample treatment; Intra-ocular fluid; Metagenomic sequencing

眼部感染可由细菌、真菌、病毒或寄生虫引起。眼球是一个相对独立的器官,存在天然的物理生理屏障,有其独特的防御机制,因此即使同一种病原体感染,其临床表现及预后也有显著的不同。由于眼表与外界相接触,存在如葡萄球菌属、棒状杆菌属和丙酸杆菌属等定植菌,当眼表环境发生改变或外伤时可致菌群失调、眼表防御机制破坏并可伴随异物入眼,最终导致眼部感染。但是由于结膜组织血供丰富,而角膜组织并无血管,因此即使同样是眼表感染,其表现及预后也不尽相同。另外由于角膜和眼内部分组织的相对免疫赦免状态,使得感染发生时难以控制,往往容易造成严重视力损伤甚至致盲的后果。虽然不同类型感染有某些特征性临床体征为临床诊断提供线索,但病原微生物的检查仍然是病因诊断的金标准,是实现感染性眼病精准治疗的关键。

1 感染性眼病精准医疗概述

2015 年,我国学者董家鸿[1]在国内提出了“精准医疗”的理念。强调针对确定的患者和病情精确选择和应用适宜的诊疗方法,避免盲目应用或滥用高新技术手段带来额外的医源性损害和医疗资源浪费,并提出基因组学等技术只是精准医疗众多重要技术元件之一,并不是实现精准医疗的充分必要条件。感染性疾病医疗体系正是这一理念的充分体现,不断发展的传统病原微生物实验诊断技术仍然是病原学诊断的金标准,快速崛起的病原微生物基因扩增技术、蛋白组学及基因组学分析等技术成为不可或缺的补充。眼部感染根据累及的部位不同可引起多种眼病。感染发生后,因组织结构不同,表现及预后也各不相同。感染性眼病的治疗原则是根据感染类型结合感染部位给予对应的抗微生物药物治疗。如细菌感染所致外眼感染(如结膜炎、角膜炎),可以通过频繁的抗菌药物滴眼治疗,在细菌培养、鉴定和药敏结果报告前,选择广谱抗菌药物来控制感染;病毒感染,大多数需要全身联合局部抗病毒用药。眼内的感染,由于会导致严重的视力损伤,一般需要静脉和玻璃体注射使药物突破血-眼屏障,如感染控制不佳需行玻璃体切除术。尽早明确病原体对真菌性感染所致眼病(如角膜炎和眼内炎)尤为重要,可在有效给予抗真菌药物治疗的同时,避免激素的误用。规范的病原学检测是感染性疾病精准医疗最基本的体现。病原学检测传统方法主要是形态学、免疫学以及病原体分离培养和药敏试验等。由于传统病原学检测需要技术人员具有丰富的实验操作经验,同时眼部标本又具有量少且类型复杂等特点,容易导致漏诊甚至误诊。有文献[2]报道眼内液直接镜检细菌、真菌的阳性率一般为 22% ~36%,培养的阳性率也仅为 34% ~60%,且培养时间为数天至数周,导致错过最佳治疗时机。因此灵敏度高、特异性强、快速准确的方法学对眼部感染性疾病的病原学检测尤为重要。分子生物学技术的快速发展,使得感染性疾病通过分子生物学技术鉴定病原成为可能,如新冠肺炎疫情期间,分子生物学检测已成为不可或缺的关键技术[3]。分子检测主要包括普通聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、多重 PCR、实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR detecting system, RT-qPCR)和宏基因组测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)等技术[4]。分子检测和基因组测序能更及时、准确地鉴定病原体,并分析

病原体的来源,甚至进行抗菌药敏感性的分析,从而提高感染性疾病的诊断速率及准确性,促进了感染性眼病精准医疗的发展。近年兴起的眼内液检测在促进眼部精准医疗的发展中发挥了积极的作用[5]。由于眼球是封闭的球体,存在血-眼屏障(包括血-房水屏障和血-视网膜屏障)。正常情况下,眼内液中的蛋白成分与血浆中的蛋白成分不同,出于免疫赦免的需要,免疫球蛋白的含量更低,且能采集到的样本量也极少(如房水,通常只能采集到 100 μl 以内),因此临床上需要有更高灵敏度和高通量的检测方法、试剂用于眼内液的检测,同时对避免假阳性的出现提出了更高的要求。然而,当血-眼屏障破坏时,血清中的蛋白成分(包括各种抗体)可以渗漏至眼内,如果此时检测眼内液的抗体成分出现阳性,则会导致临床误诊。因此,引入更完善的评价体系,如通过计算 Goldmann-Witmer(GM)系数,有助于判断该特异抗体是眼内感染产生还是因为渗漏而导致的假阳性。眼内液检测的意义还体现在当涂片和培养阴性时,利用分子生物学检测其中病原体的数量和种类等,作为传统方法学的有效补充,使其成为眼内炎病原学诊断不可或缺的组成部分。此外,激光共聚焦检查在诊断角膜疾病中得到广泛应用。该技术具有非侵入性、高分辨率的优点,理论上其分辨率可达 1 μm[6],放大倍率达 200 ~ 500 倍,具有增强的图像对比度和穿透性,即使混浊的角膜也可观察其显微结构。共聚焦显微镜在棘阿米巴、真菌、诺卡菌和微孢子虫感染的角膜炎中具有较高的敏感性和特异性,尤其是对典型的真菌菌丝和棘阿米巴包囊的诊断。当病变仅累及角膜深基质感染的病灶,常规的刮片技术不容易获取标本时,共聚焦显微镜检查更显示出优势,并且能即刻出具报告,有助于尽早得到辅助诊断的依据。但是,当病变进展以及使用抗真菌药物后可使菌丝变得“不典型”或发生混合感染时,可影响诊断的准确性。

2 感染性眼病病原学检测质量控制要点

尽早进行微生物鉴定对眼部感染性疾病的治疗、减少并发症及疾病预后非常重要,而标本采集的规范与否,直接影响病原菌的检出率。但由于眼部结构的特殊性,导致能采集的标本量特别少,且大多数眼科医师缺乏实验室的基本技术,导致标本处理不规范,同时多数检验科医技人员对眼部标本特点不熟悉,难以规范合理地处置眼部来源的标本。因此,感染性眼病病原学检测标本的采集和预处理成为整个质量控制的关键。我们知道,来自眼睑、结膜、角膜、泪道等与外界相通的部位,有正常菌群定居,而眼球内、眶内软组织等传统认为属于无菌的部位。因此,为了获取准确的病原学依据,需要根据病变部位的特点采集合适的标本并采用合理的处置方式。

2.1 眼部感染病原学检测标本采集基本原则 标本采集应在病程早期、急性期,且尽可能在使用抗菌药物之前,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等检测[7],或者健康眼仅采集分泌物行涂片镜检。各种分泌物的采集推荐使用预先用无菌生理盐水或其他符合眼科使用要求的培养基沾湿的无菌拭子,由培训过的专业人员进行操作,并注意避免眼睑、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。眼内标本如房水、玻璃体、异物等由培训过的手术医师进行。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并立刻送检(15 min 内),必要时也可以在被检测的液体标本中加入 0.5 ~ 1.0 ml 无菌生理盐水或营养肉汤,并在结果报告单中注明样本已经稀释。标本送检时须精确标明眼别、具体取材部位、标本类型、用药情况、采样人、采样时间等信息[8]。

2.2 常见眼部标本采集及预处理规范 眼部感染可由细菌、真菌、病毒、寄生虫等引起,但已有数据表明细菌仍然是眼部感染的主要病原体[9],因此标本的采集及预处理措施通常仍以细菌学检查为主,同时尽可能兼顾其他病原体检测的需求。

2.2.1 结膜囊分泌物等眼表标本采集质量控制[8] 对于结膜囊分泌物的采集,一方面需要考虑采样舒适度,提高患者的配合度,同时又需要考虑采集到尽可能多的分泌物,因此推荐使用接触面积大、释放率高的植绒拭子,并用预湿润的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。为提高培养阳性率,要求采样时尽可能不用麻醉剂。标本采集完成后,直接用无菌拭子在玻片上涂抹制成涂片。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)。特殊情况下需将拭子接种于增菌培养基,则需报告时注明。其他眼表标本参照执行。

2.2.2 结膜/角膜刮取物采集规范[8] 采集刮取物时,既考虑到采样时需要一定的深度又要尽可能避免因采样导致角膜穿孔,因此推荐使用无菌 15 号手术圆刀片或者适用的刮匙等。在刮取前,先滴表面麻醉滴眼液(尽可能使用无防腐剂的制剂),对角结

膜进行表面麻醉。接着用手指或开睑器撑开眼睑，若病变处分泌物过多，可先用灭菌湿棉签去除分泌物，然后选择角膜溃疡进行缘或基底部刮取标本。刮取完成后，滴用抗菌滴眼液。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[10]。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/哥伦比亚血琼脂平板、厌氧血琼脂平板（必要时）以及制作涂片做形态学检查（推荐标本直接接种及涂片）。

2.2.3　房水及玻璃体采集规范[8]　房水采集用 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。玻璃体采集包括以注射器抽取法和玻璃体切割法。要求注射器抽吸法需抽取不少于 0.2 ml 的标本；玻璃体切割法采集量不少于 0.5 ml（如果是含灌注液的大体积标本，需采集最初的灌注液不少于 1.0 ml，并在申请单上注明用药情况）。采集完成后立即行床旁接种及涂片制作，房水/玻璃体液分别用注射器加至液体增菌培养基（专用培养基或儿童血培养瓶）及真菌培养基内（标本量足够时建议增加厌氧培养），同时制作涂片送检，或加入转运培养基中尽快（2 h 内）送至实验室处理，特殊情况下不得超过 24 h[6]。以上标本如果需要进行分子生物学实验，则要求将采集的拭子尽快转运。当环境温度≥25 ℃时，用于 DNA 检测的标本，应 2 ~ 8 ℃转运，该条件下可以保存≤10 d，如不能完成核酸提取，需尽快转移到≤ −70 ℃储存；用于 RNA 检测的标本，需立即冰上转运，且应在 1 ~ 4 h 内提取核酸；需冻存的标本则用干冰转运[3]。

3　感染性眼病相关实验室检测应用

3.1　传统微生物诊断方法　目前传统的微生物学方法如眼科标本的显微镜涂片检查、病原菌培养仍然是多数医院的首要选择方式。显微镜检查可以通过革兰染色、吉姆萨染色、氢氧化钾湿片、六氨银染色、荧光染色或其他特殊染色等对细菌类型、真菌菌丝、阿米巴包囊进行快速的初步诊断，为疾病的初步诊断提供有效的病原学依据，并指导临床医师制定初步的治疗方案。对于细菌学检查，革兰染色毫无疑问是首选，但如果怀疑是真菌感染，可以根据实际标本类型及实验室条件选用氢氧化钾湿片、荧光染色、吉姆萨染色以及六氨银染色等特殊染色，各有其优势。近年随着荧光显微镜的普及，荧光染色被应用到真菌的检测和诊断中。已有资料表明，荧光染色后真菌的形态特征十分清晰，不易漏诊[11]。最近的文献报道，真菌荧光染色在角膜刮取物及切取的角膜组织中阳性率明显高于病理常用的过碘酸希夫染色，分别为 79.6% 和 60.5%[12]（特异度均为 100%），认为真菌荧光染色法可以快速准确地诊断真菌性角膜炎。对于阿米巴、沙眼衣原体以及病毒包涵体检测，考虑到吉姆萨染色对细胞核和寄生虫着色较好，结构显示清晰，而瑞氏染色对胞质和中性颗粒的着色较好，建议首选瑞氏-吉姆萨复合染液进行染色后镜检。实际工作中考虑到眼部感染仍以细菌最常见，因此对来源于临床症状不典型患者的标本，建议首选为革兰染色。培养鉴定结果及药物敏感试验，有助于临床医师更精细化认识不同微生物感染特点，对早期治疗效果欠佳及混合感染者尤为重要[13]。微生物药物敏感性的变迁也对临床抗菌药物使用提供指导，减少细菌耐药的产生，以最大可能减少感染性眼病的并发症。然而微生物的培养和药物敏感试验需要 3 ~ 7 d，如何在更短时间内进行微生物的鉴定对临床提供更早的诊断依据，是未来的研究方向。近年快速发展的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF-MS）技术，虽然缩短了菌种鉴定时间，但目前主要用于临床培养阳性菌株的菌种鉴定，难以直接检测原始样本中的病原微生物，并未缩短培养时间[4]。但该技术在微生物药敏和流行学分型中的发展和应用值得更多关注[14]。

3.2　普通 PCR 及相关技术在感染性眼病中的应用　尽管微生物培养和鉴定是眼部感染性疾病诊断的金标准，但仍受到微生物生长缓慢和生存能力较低的限制，且采样前的抗微生物药物使用会产生假阴性结果，特别是混合感染的鉴定，传统培养鉴定受到更多限制。普通 PCR、DNA 序列分析、基因芯片、变性高效液相色谱（denaturing high performance liquid chromatography，DHPLC）、RT-qPCR、环介导等温扩增法（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）等技术都可以用于病原体核酸定性或定量检测。虽然不同的检测方法和不同的检测试剂在检测限、可报告范围及特异性等方面都有差别，但是鉴于多重 PCR、基因芯片等技术可在同一反应体系中检测数种微生物[3]，这对于只有微量眼部标本来说更有其实际意义。利用细菌普遍存在 16S 核糖体 DNA，真菌普遍存在 18S 和 28S 核糖体 DNA，设计广谱 PCR，并对其进行 DNA 扩增，增强了检测的敏感性，可快速鉴定细菌性或真菌性眼内炎，且当采用特殊设计的巢式 PCR 时，还可用于鉴别革兰染色阳性菌和阴性菌[2]。利用

18S rDNA、内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)及 18S rDNA-ITS 序列分析技术,通过早期的鉴定来引入抗真菌治疗,使感染性眼病得到更早的针对性治疗。对眼部感染常见的巨细胞病毒、EB 病毒、单纯疱疹病毒和带状疱疹病毒等的检测同样具有明确诊断的重要意义。多重 PCR 和 DNA 微阵列(DNA 芯片)技术的应用,不仅提高了感染性眼病病原学鉴定的特异度、灵敏度、时效率,而且相对低成本、高通量,更适合大量样本的分析与鉴定。当然也应该注意到由于分子生物学技术灵敏度高,检测容易受到眼表或环境中微生物序列的干扰而引起误报,同时由于一个反应体系只对某一种或一组特定可疑微生物进行反应,对于新的菌株或突变的鉴定可能无法进行,仍存在不足之处。

3.3 高通量测序技术在感染性眼病中的应用

mNGS 基于宏基因组学和高通量测序技术,可检测并分析各种样本中细菌、真菌、病毒、寄生虫、支原体/衣原体等所有已知及未知的病原体,特别是未知新发病原体。该技术规避了绝大多数病原体不能培养或难培养的缺点,可直接检测临床样本中的病原体核酸,解决了新发或突变、复杂或混合感染、罕见病原体鉴定难的问题。基因测序通过临床样品分析中获得的序列与数据库中包含的序列进行比较,只需几小时即可获得精确的结果。有研究[15]表明基因组学诊断真菌性角膜炎是高度敏感的,比培养更省时,并且对于样本量较少的眼表样本是理想的。通过全基因组测序,可以获知待测微生物的基因及相关调控信息,为研究该微生物特有的生物学特征(致病机制、共生机制、独有的代谢机制)提供分子生物学基础,并可通过比较基因组分析,为研究微生物种内及种间的功能差异、进化关系提供理论指导。同时,全基因组测序能够分析眼表的整个菌群,为某些疑难病例提供更多、更全面的分析,从而明确诊断,进行有效治疗。Suzuki 等[16]通过 16S rRNA 基因测序,对人类睑板、结膜囊和眼睑皮肤的微生物群进行首次全面的分析,确定了不同人群、不同部位的微生物群落特点。Kang 等[17]首次使用宏基因组鸟枪法(shotgun)测序及生物信息学分析对角膜外伤后患者及健康对照的眼表菌群进行比较发现,外伤性角膜溃疡患者眼表菌群的均匀度、丰富度和群落结构均发生了显著改变,在种水平,包括荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌、西拉亚栖热菌显著增加,不规则根瘤菌、肺炎链球菌、脓肿分枝杆菌等 9 种菌显著减少,且物种间的相互作用强度明显降低,同时检测到 17 种与抗生素相关的耐药基因。最新研究[18]表明眼表微生物生态系统中,表皮葡萄球菌与化脓性链球菌之间存在着竞争性作用。更多的研究表明,眼表微生态的变化与多种疾病之间存在潜在关联,不仅与结膜炎[19]、细菌性角膜炎[20]、真菌性角膜炎[21]、睑缘炎[22]、沙眼[23]等感染性眼病有关,与隐形眼镜佩戴[24]、干眼[25]、睑板腺功能障碍[26]等具有潜在感染可能性的眼病也有一定的关系。最近 Deng 等[27]通过 mNGS 方法提出环境的改变可能导致眼表微生物群的改变,特别是优势菌种的改变,为今后识别可能重塑眼表免疫的病理微生物群提供了丰富的资源。可见眼表微生物组的组成分析对于理解各种眼科疾病的病理生理至关重要。mNGS 对感染性疾病病原学诊断相比于其他检测技术有不可比拟的优势,但仍具有核酸检测的局限性,检测结果的解释需密切结合临床信息。测序技术在病原学诊断中的价值,还体现在通过特定病原体致病机制研究带来的意义。Liu 等[28]研究表明,葡萄球菌毒素基因 SE1634 在眼内炎表皮葡萄球菌中显著上调,提示与眼内炎的发病直接相关。Eguchi 等[29]通过分析分离自眼部的棒状杆菌 16S rRNA 序列发现,只要 gyrA 基因 83 号位置上单个氨基酸的替代足以产生对诺氟沙星耐药。Yuan 等[30]通过对眼源性芽孢杆菌全基因组序列分析,确定了与眼内感染显著相关的 plcA-2、InhA-3、InhA-4、hblA-5 以及 fliD 等 5 个关键毒力基因。类似的研究结果提示,进行某些特定基因的检测对于判断分离菌是否为致病菌、是否需要采取某些特定治疗措施以及预后判断方面,有潜在的应用价值,尤其是当分离到眼表的定植菌以及环境菌时,将更有意义。转录组测序,是近年发展起来的利用新一代测序技术进行转录组分析的技术。通过转录组学分析技术,可以对病原体入侵宿主以及宿主的防御抵抗进行转录组学研究。Coburn 等[31]通过 RNA-Seq(RNA sequencing)比较了离体玻璃体中和 LB(Luria-Bertani)培养基及脑心浸液培养基(brain heart infusion medium,BHI)肉汤中培养的蜡样芽孢杆菌相关基因的表达,发现超氧化物歧化酶在玻璃体中表达最高,提示该酶是感染期间中性粒细胞活性的潜在抑制剂。Rajamani 等[32]通过系统生物学分析揭示了与视网膜炎症有关的基因,包括白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、核因子-κB(nuclear factor-κ-gene binding,NF-κB)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、JUN 基因(v-jun avian sarcona virus 17 oncogene homolog, JUN)和趋化因子 CXC(chemokine CXC)等。更多关

于病原体与宿主关系的研究,不仅有利于阐明感染性疾病发生、发展和转归的分子机制,更为将来采取有针对性的治疗手段及靶向药物的研发提供了理论依据。但由于某些病原体核酸提取困难等原因一定程度上限制了此类技术的发展和应用。

3.4 眼内液检测在眼内炎症诊疗中的意义　眼内液是眼球内液体的总称,包括房水、玻璃体液、视网膜下液、脉络膜上腔积液等[5]。由于眼球结构的特殊性,无论生理还是病理情况下,血液指标均不能反映眼内真实情况,而只能通过眼内液检测来反映眼内微环境的变化。因此眼内液检测对于鉴定感染性眼病的病因和判断免疫指标的变化,某种程度上具有不可替代性。临床上采集并送实验室进行相关指标检测的主要标本类型为房水和玻璃体液。检测内容主要包括病原学鉴定以及部分免疫、炎症相关指标,主要方法包括传统细胞形态学、微生物分离鉴定、分子生物学、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、流式细胞术以及用于眼部真菌感染辅助诊断的 G 试验(1,3-β-D 葡聚糖检测)/GM 试验(半乳糖甘露醇聚糖抗原检测)等。传统微生物培养鉴定时,眼内炎临床诊断假阴性率较高,且房水的阳性率更低于玻璃体液,但利用 PCR 技术可以显著提高阳性率。有研究[33]结果显示 PCR 可将阳性率提高 60% 以上,这意味着有明确病原学诊断依据并能按照指南进行诊疗的比例得到明显提高。眼内液中各种蛋白的检测在眼部疾病诊断和鉴别诊断中发挥了积极的作用。早期利用 ELISA 技术对眼内液进行病原体抗原、抗体的检测已经让眼科医师获益。随着流式细胞术的发展,细胞因子微球检测技术(cytometric bead array, CBA)得到广泛应用,使一份标本(25 ~ 50 μl)检测多种因子(30 种)成为可能,吸引了更多眼科医师对眼内液细胞因子研究的关注。在眼内炎领域中,目前应用较多的是利用细胞因子的变化区分感染性质:如结果发现 IL-6、IL-8 升高,而 IL-10 不升高或升高幅度 < 10 倍,提示革兰阳性细菌感染;当 IL-6、IL-8 和(或) IL-10 均升高 10 倍以上,且 IL-6 > IL-10,提示革兰阴性细菌感染;当 IL-10、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、γ-干扰素(interferon-γ, IFN-γ)不同程度升高时提示感染为结核性的可能性较大。当遇到单纯的 IFN-γ 升高,提示真菌感染,如果增加 G 试验/GM 试验,则有助于区分是否为曲霉菌感染。病毒感染时,根据病毒种类不同,IL-10、IL-1β、IL-6、IFN-γ、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)等不同程度升高。当出现嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、IL-12p70、IL-6、MCP-1、IFN-γ 不同程度升高时,提示寄生虫感染,如能检测到特异性抗体,对眼部寄生虫感染诊断的意义更大。如眼弓形虫病的诊断,除了临床表现以外,弓形虫抗体滴度或 PCR 检测成为重要指标[34],而且需要同时检测眼内液及血清中弓形虫抗体,通过计算 GW 系数判断是否为眼内原位感染。当以 GW > 2 时判断为阳性,其特异度为 97.8%;当以 GW > 3 时判断为阳性,其特异度可达到 100%。这里需要特别指出,结果判断必须以眼内液中该抗体阳性为前提条件。随着眼内液采集设备、技术的不断进步,临床医师收集眼内液用于检测分析的适应证会逐渐扩大,眼内液的检测与应用将成为眼科精准医学的代表领域之一。

4　小结和展望

眼部感染是眼科最常见的疾病之一,虽可预防、可治疗,但如果治疗不当会造成失明等严重后果,对个人及家庭带来巨大的精神、经济损失。因此感染性眼病的诊断必须快速、精准、有效。病原学检测不仅依赖于取材、处理、培养和鉴定等规范的操作,而且需要将传统培养鉴定技术结合质谱技术、现代分子生物学技术、流式细胞术等,并利用激光共聚焦显微镜等活体检查技术,联系临床信息综合分析,才能获得高质量的结果,从而为感染性眼病精准医疗提供依据。鉴于眼部标本的特殊性,选用标本用量少、灵敏度高、特异性好、高通量的实验室检测技术更有实际意义。mNGS 等技术的应用有助于进一步加深对眼部微生态的了解,不仅在疑难病例诊断、未知病原体的检测等方面有不可替代的优势,并为将来开发基于益生菌的眼部感染治疗药物提供可靠的数据与理论支撑。转录组测序等技术为进一步阐明感染发生机制及靶向药物研究奠定了基础。

参考文献

[1] 董家鸿. 构建精准医学体系,实现最佳健康效益[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(31): 2497 - 2499.

[2] 陶　勇. 眼内液病原学检测的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2018, 54(7): 551 - 556.

[3] 尚　红, 李金明, 郭晓临, 等. 感染性疾病相关个体化医学分子检测技术指南[S]. 中国医科大学附属第一医院, 国家卫生计生委临床检验中心. 国卫办医函〔2017〕1190 号.

[4] 胡晏宁, 鲁炳怀. 呼吸道感染性疾病病原学诊断的挑战与解决策略[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(1): 8 - 12.

[5] 陶　勇. 眼内液检测的临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 258.

[6] Erie JC, McLaren JW, Patel SV. Confocal microscopy in ophthal-

mology[J]. Am J Ophathalmol, 2009,148(5):639 – 646.
[7] A Jorgensen JH, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology[M]. 11th ed. ASM press, 2015.
[8] 眼科检验协作组. 感染性眼病细菌学检查操作专家共识(2019)[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2019, 21(2): 81 – 85.
[9] Teweldemedhin M, Gebreyesus H, Atsbaha AH, et al. Bacterial profile of ocular infections: a systematic review[J]. BMC Ophthalmol, 2017,17(1):212.
[10] Pakzad-Vaezi K, Levasseur SD, Schendel S, et al. The corneal ulcer one-touch study: a simplified microbiological specimen collection method[J]. Am J Ophthalmol, 2015, 159(1):37 – 43. e1.
[11] Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, et al. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls[J]. Mycologia, 2005,97(3):580 – 588.
[12] 杜　满,张　莉,李鹏荧,等. 光染色与过碘酸希夫染色对真菌性角膜炎诊断效果的比较[J]. 中华实验眼科杂志,2021,39(2):119 – 125.
[13] Al-Omran AM, Abboud EB, Abu El-Asrar AM. Microbiologic spectrum and visual outcome of posttraumatic endophthalmitis[J]. Retina, 2007,27(2):236 – 242.
[14] Marc van Nuenen, Kirk Doing, 顾　兵,等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在临床微生物鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(1):64 – 66.
[15] Kuo MT, Chen JL, Hsu SL, et al. An omics approach to diagnosing or investigating fungal keratitis[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(15):3631.
[16] Suzuki T, Sutani T, Nakai H, et al. The microbiome of the meibum and ocular surface in healthy subjects[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(2): 18.
[17] Kang Y, Zhang H, Hu M, et al. Alterations in the ocular surface microbiome in traumatic corneal ulcer patients[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020,61(6):35.
[18] Kang Y, Lin S, Ma X,et al. Strain heterogeneity, cooccurrence network, taxonomic composition and functional profile of the healthy ocular surface microbiome[J]. Eye Vis(Lond), 2021,8(1):6.
[19] Mohamed YH, Uematsu M, Morinaga Y, et al. Conjunctival Sac Microbiome in Infectious Conjunctivitis[R/OL]. 2020. https://www.researchgate.net/publication/346882327_Conjunctival_Sac_Microbiome_in_Infectious_Conjunctivitis.
[20] Shivaji S, Jayasudha R, Chakravarthy SK, et al. Alterations in the conjunctival surface bacterial microbiome in bacterial keratitis patients[J]. Exp Eye Res, 2021,203:108418.
[21] Ge C, Wei C, Yang BX, et al. Conjunctival microbiome changes associated with fungal keratitis: metagenomic analysis[J]. Int J Ophthalmol, 2019,12(2):194 – 200.
[22] Lee SH, Oh DH, Jung JY, et al. Comparative ocular microbial communities in humans with and without blepharitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012,53(9):5585 – 5593.
[23] Pickering H,Palmer CD,Houghton J,et al. Conjunctival microbiome-host responses are associated with impaired epithelial cell health in both early and late stages of trachoma[J]. Front Cell Infect Microbiol,2019,9:297.
[24] Zhang H, Zhao F, Hutchinson DS, et al. Conjunctival microbiome changes associated with soft contact lens and orthokeratology lens wearing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017,58(1):128 – 136.
[25] Graham JE, Moore JE, Jiru X, et al. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007,48(12):5616 – 5623.
[26] Dong X, Wang Y, Wang W, et al. Composition and diversity of bacterial community on the ocular surface of patients with meibomian gland dysfunction[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019,60(14): 4774 – 4783.
[27] Deng Y,Wen X,Hu X,et al. Geographic difference shaped human ocular surface metagenome of young Han Chinese from Beijing, Wenzhou, and Guangzhou cities[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(2):47.
[28] Liu Q, Chen N, Chen H, et al. RNA-Seq analysis of differentially expressed genes of Staphylococcus epidermidis isolated from postoperative endophthalmitis and the healthy conjunctiva[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 14234.
[29] Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, et al. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species Corynebacterium macginleyi[J]. J Clin Microbiol, 2008,46(2):527 – 532.
[30] Yuan J, Li YY, Xu Y, et al. Molecular signatures related to the virulence of Bacillus cereus sensu lato, a leading cause of devastating endophthalmitis[J]. mSystems, 2019, 4(6):e00745 – 19.
[31] Coburn PS, Miller FC, Enty MA, et al. Expression of Bacillus cereus virulence-related genes in an ocular infection-related environment[J]. Microorganisms, 2020, 8(4):607.
[32] Rajamani D, Singh PK, Rottmann BG, et al. Temporal retinal transcriptome and systems biology analysis identifies key pathways and hub genes in Staphylococcus aureus endophthalmitis[J]. Sci Rep, 2016, 6:21502.
[33] Sowmya P, Madhavan HN. Diagnostic utility of polymerase chain reaction on intraocular specimens to establish the etiology of infectious endophthalmitis[J]. Eur J Ophthalmol, 2009,19(5):812 – 817.
[34] Rothova A, de Boer JH, Ten Dam-van Loon NH, et al. Usefulness of aqueous humor analysis for the diagnosis of posterior uveitis[J]. Ophthalmology, 2008,115(2): 306 – 311.

[收稿日期　2021 – 03 – 04][本文编辑　吕文娟　余　军]

本文引用格式

郑美琴,郑钦象,楼永良,等. 规范病原学诊断路径促进感染性眼病精准医疗[J]. 中国临床新医学,2021,14(3):231 – 237.