论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0974-04

重庆市不同年龄健康人结膜囊需氧菌定性及定量研究

刘 静[1],谢汉平[1],吴力克[2],王 欣[1],张 娟[2] (第三军医大学西南医院:[1]全军眼科中心,[2]全军感染病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 调查重庆市不同年龄健康人结膜囊需氧菌种类及数量。**方法** 湿棉拭于33例儿童、31例青年人、30例老年人双眼结膜囊取标本(取材前后称量棉拭运送管,差值即为标本质量)行细菌培养,阳性者进行细菌鉴定及定量计算:菌落数(colony forming units, CFUs)/标本质量。**结果** 老年组结膜囊细菌检出率(93.33%)显著高于儿童组(45.45%)及青年组(50.00%),差异有统计学意义($P<0.01$),且表皮葡萄球菌、类白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌在老年组检出率均较高;老年组单眼共生细菌种类显著多于另外2组($P<0.01$);儿童组结膜囊菌群数量明显少于青年组及老年组($P<0.01$);类白喉棒状杆菌数量随年龄增长而增加,表皮葡萄球菌数量在老年组显著多于儿童组($P<0.01$)。**结论** 老年人结膜囊需氧菌种类、数量均高于青年及儿童,应该引起眼科医师重视。

关键词: 结膜囊;需氧菌;年龄;定量;微生态

中图法分类号: R195;R372;R777.3 **文献标识码:** A

Identification and quantitation of conjunctival aerobic bacterial flora from healthy Chongqing residents at different ages

LIU Jing[1], XIE Han-ping[1], WU Li-ke[2], WANG Xin[1], ZHANG Juan[2] ([1]Department of Ophthalmology, [2]Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify and quantitate the conjunctival aerobic bacterial flora from healthy people of 3 age groups in Chongqing city. **Methods** Samples taken with moist swabs from the lower fornix of both eyes of 33 children (9.85±0.57 years old), 31 youths (21.23±0.88 years old) and 30 elders (72.97±4.94 years old) were given bacterial cultures. Positive ones were identified and colony forming units (CFUs) were counted. Bacterial quantity was expressed as the number of CFUs divided by the weight of each sample measured before and after collection. **Results** The elders showed a higher isolation frequency (93.33%) than children (45.45%) and youths (50.00%) which had statistically difference ($P<0.01$). *Corynebacterium diphtheroides*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from the elders all had a greater percentage. The elders also had a larger number of species per eye than did children and youths ($P<0.01$). Children showed a lower quantity of conjunctival aerobic bacterial flora than the other 2 groups ($P<0.01$). The quantity of *Corynebacterium diphtheroides* became larger when people grew older, and the elders group had a grater number of *Staphylococcus epidermidis* than children group ($P<0.01$). **Conclusion** The number of species and quantity of conjunctival aerobic bacterial flora from the elders were both larger than those from children and youths, which should be concerned by ophthalmologist.

Key words: conjunctiva; aerobic bacteria; age; quantitation; microecology

结膜囊作为半开放的腔隙,从出生开始贯穿一生都寄生有微生物群,微生态学上称这一并未引起不正常或致病的微生物层为结膜囊正常微生物群。正常菌群在维持宿主眼表健康方面发挥着重要作用,当其失去相互制约或与宿主失去平衡时,就会转变为生态失调,即正常微生物群生态紊乱,从而引起疾患。因此,对结膜囊菌群全面而深入的认识将会对诸多眼表感染性疾病,尤其是慢性感染的发生及防治方面有重要意义[1]。目前,关于结膜囊正常菌群的探讨主要集中在内眼术前局部应用抗菌素对术后眼内炎的预防方面[2-9],且对结膜囊细菌数量的研究多在半定量水平[2-4]。本研究从微生态学角度出发,对3个年龄组健康人群(儿童、青年、老年人)结膜囊需氧菌进行定

作者简介:刘 静,女,天津市人,硕士研究生,医师,主要从事角膜疾病方面的研究。E-mail:liujing_200604@sohu.com

通信作者:谢汉平,E-mail:xiehanping@mail.tmmu.com.cn

吴力克,E-mail:xnyy_wulk@163.com

收稿日期:2008-12-15;修回日期:2009-02-13

性及定量检测,以期为结膜囊正常菌群研究提供实验依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料

研究对象纳入标准:选取 3 个不同年龄组健康志愿者共 94 例(188 眼),其中儿童志愿者选自某小学四年级学生共 33 例(66 眼),男性 17 例,女性 16 例,年龄(9.85 ± 0.57)岁;青年志愿者选自某高校学生共 31 例(62 眼),男性 15 例,女性 16 例,年龄(21.23 ± 0.88)岁;老年志愿者选自某干休所老干部 30 例(60 眼),男性 16 例,女性 14 例,年龄(72.97 ± 4.94)岁。

排除标准:全身或局部感染性疾病者;采样前 4 周全身或局部使用过抗生素者;长期接受类固醇激素或免疫抑制剂治疗者;近 1 个月内的眼外伤患者;近 1 个月接受内眼手术者;近 1 个月配戴角膜接触镜者;常规裂隙灯检查排除眼睑、眼表、泪囊炎症、眼睑和眼球畸形;有干眼症者。

成年志愿者均征得其本人同意,儿童征得其监护人同意。

1.2　方法

1.2.1　准备工作　　自制硅胶塞上连接有无菌棉拭的标本运送管,无菌生理盐水浸湿棉拭(以不滴水为标准)后插入运送管消毒备用;取标本前于电子天平(精度:10^{-4} g)称取棉拭运送管的精确质量并做记录。运送管均由专人于同一电子天平称量,且室内温度、湿度大致相同,确保实验条件的一致性。

1.2.2　标本采集　　由专人在无菌操作下对志愿者行双眼结膜囊标本采集,所有采集过程在 20 ℃左右室温下进行,室内空气经过紫外线消毒 30 min。用蘸有生理盐水的无菌棉签清洁眼睑周围皮肤,嘱志愿者头稍后仰,双眼向上注视,用无菌棉签向后下方轻压下睑,充分暴露下眼睑穹隆部,无菌纱布包裹运送管硅胶塞暴露部位,取下连接有无菌湿棉拭的硅胶塞,将湿棉拭置于下穹隆中内 1/3 交界处,轻轻扭转擦拭取材,自一端向另一端水平方向涂拭穹隆结膜,旋转棉签往返 1 次,注意不要遗留内眦部。运送管口在酒精灯火焰上旋转消毒,将棉拭轻而准确的插入运送管中,塞紧橡皮塞。取材过程中,避免接触睫毛或睑缘皮肤。

1.2.3　细菌培养、鉴定及定量检测　　采集标本后的棉拭运送管尽快于同一电子天平(精度:10^{-4} g)再次称量,计算采集标本前后棉拭运送管称量差值(标本质量);将棉拭旋转划线接种于哥伦比亚血平板(庞通医疗器械有限公司),然后置于 37 ℃、5% CO_2 恒温孵箱中培养,18 ~ 24 h 开始观察菌落生长情况,每日观察 1 次,并记录培养基上不同形态的菌落数(colony forming units, CFUs)[某菌数量 = 菌落数(CFU)/标本质量(g)]对各菌种进行定量检测;若 72 h 后仍无细菌生长则视为阴性。阳性标本送至我院检验科细菌室行细菌分离培养及鉴定,细菌鉴定使用 VITEK 全自动微生物鉴定仪(法国梅里埃公司)。

1.3　统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件,通过 Pearson χ^2 检验对各种阳性率进行比较;用非参数统计方法中的 Kruskal-Wallis H 检验及 Mann-Whitney U 检验对单眼共生细菌种类进行比较;用单因素方差分析对各菌种数量进行比较。

2　结果

2.1　各年龄组结膜囊需氧菌培养阳性率比较

188 眼结膜囊需氧菌培养阳性率为 62.23%(117/188),老年组 93.33%(56/60)显著高于儿童 45.45%(30/66)及青年组 50.00%(31/62),差异有统计学意义($P < 0.01$),后两者比较未见统计学差异($P > 0.05$)。

2.2　各年龄组结膜囊检出需氧菌种属及各菌种阳性率比较

188 眼结膜囊共检出 18 个菌种,阳性率居前 3 位的是:表皮葡萄球菌、类白喉棒状杆菌、芽胞杆菌属;儿童组、青年组、老年组检出细菌种类分别为 11、9、12 种,有 5 种细菌在 3 组人群结膜囊中均被检出,其中表皮葡萄球菌阳性率老年组、青年组明显高于儿童组($P < 0.05$);类白喉棒状杆菌阳性率老年组明显高于青年组、儿童组($P < 0.05$);金黄色葡萄球菌阳性率在老年组、儿童组明显高于青年组($P < 0.05$);藤黄微球菌、芽胞杆菌属 3 组阳性率比较未见统计学差异($P > 0.05$);1 例儿童结膜囊中检出真菌(白色念珠菌)阳性,余未见真菌生长,见表 1。

表 1　各年龄组结膜囊检出各种需氧菌阳性率比较(%)

细菌种类	儿童组	青年组	老年组	平均阳性率
需氧菌				
表皮葡萄球菌	33.33(10/30)	83.87(26/31)[a]	94.64(53/56)[a]	76.07(89/117)
类白喉棒状杆菌	30.00(9/30)	45.16(14/31)	67.86(38/56)[ab]	52.14(61/117)
芽胞杆菌属	30.00(9/30)	19.35(6/31)	37.50(21/56)	30.77(36/117)
金黄色葡萄球菌	26.67(8/30)[b]	3.23(1/31)	26.79(15/56)[b]	20.51(24/117)
藤黄微球菌	6.67(2/30)	9.68(3/31)	16.07(9/56)	11.97(14/117)
奈瑟氏菌属	6.67(2/30)	3.23(1/31)	0	2.56(3/117)
大肠埃希菌	0	3.23(1/31)	1.79(1/56)	1.71(2/117)
泡囊短波单胞菌	10.00(3/30)	0	3.57(2/56)	4.27(5/117)
人型葡萄球菌	10.00(3/30)	0	0	2.56(3/117)
腐生葡萄球菌	3.33(1/30)	0	0	0.85(1/117)
肺炎链球菌	3.33(1/30)	0	0	0.85(1/117)
不动杆菌属	0	3.23(1/31)	0	0.85(1/117)
变异库克菌	0	3.23(1/31)	0	0.85(1/117)
粪肠球菌	0	0	7.14(4/56)	3.42(4/117)
铜绿假单胞菌	0	0	1.79(1/56)	0.85(1/117)
卡他布兰汉菌	0	0	1.79(1/56)	0.85(1/117)
放射根瘤菌	0	0	1.79(1/56)	0.85(1/117)
玫瑰色库克菌	0	0	1.79(1/56)	0.85(1/117)
真菌				
白色念珠菌	3.33(1/30)	0	0	0.85(1/117)

a:$P < 0.05$,与儿童组比较;b:$P < 0.05$,与青年组比较

2.3　各年龄组结膜囊需氧菌合并生长情况比较

儿童组、青年组结膜囊以 1 种或 2 种细菌合并生长为主,最多检出 4 种细菌共生;老年组结膜囊常有多种细菌生长,最多有 6 种细菌共生于健康结膜囊之中。通过非参数统计分析发现:老年组结膜囊合并生长细菌种类明显多于儿童组、青年组($P < 0.01$);后两者比较未见统计学差异($P > 0.05$,表 2)。

2.4　双眼结膜囊带菌情况比较

老年组至少单眼结膜囊细菌培养阳性,且双眼培养阳性者明显多于儿童组、青年组($P < 0.01$);后 2 组以单眼培养阳性者

居多,两者比较未见统计学差异($P>0.05$,表3)。

表2 各年龄组结膜囊需氧菌合并生长情况比较(眼)

组别	单眼共生细菌种类						合计
	1种	2种	3种	4种	5种	6种	
儿童组[a]	17	8	4	1	0	0	30
青年组[a]	15	11	3	2	0	0	31
老年组	11	16	16	10	2	1	56

a: $P<0.01$, 与老年组比较

表3 各年龄组双眼结膜囊带菌情况比较(%)

组别	单眼阳性率	双眼阳性率	双眼阴性率
儿童组	66.67(22/33)	12.12(4/33)	21.21(7/33)
青年组	67.74(21/31)	16.13(5/31)	16.13(5/31)
老年组	13.33(4/30)[ab]	86.67(26/30)[ab]	0

a: $P<0.01$,与儿童组比较; b: $P<0.01$,与青年组比较

2.5 结膜囊各种需氧菌定量结果

由公式计算所得儿童组结膜囊菌群数量为 1.85×10^2 ~ 8.52×10^4CFU/g,青年组 1.61×10^2 ~2.40×10^5CFU/g,老年组 1.14×10^2 ~3.63×10^5CFU/g。将各组数值取对数后进行单因素方差分析,结果显示老年组、青年组结膜囊菌群总数量明显多于儿童组($P<0.01$);类白喉棒状杆菌数量在3组中均居首位,且老年组明显多于青年组($P<0.05$),青年组明显多于儿童组($P<0.01$);表皮葡萄球菌数量在老年组、儿童组居第2位,且老年组明显多于儿童组($P<0.01$);芽胞杆菌属、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌数量3组之间比较未见统计学差异($P>0.05$,表4)。

表4 各年龄组结膜囊5种需氧菌数量比较[lg(菌数量),$\bar{x}\pm s$]

组别	表皮葡萄球菌	类白喉棒状杆菌	芽胞杆菌属	金黄色葡萄球菌	藤黄微球菌
儿童组	2.89±0.53	3.20±0.62	2.57±0.29	2.74±0.50	2.43±0.21
青年组	3.34±0.67	3.89±0.73[a]	2.44±0.14	3.52±0.00	3.74±1.34
老年组	3.51±0.68[a]	4.36±0.53[b]	2.68±0.39	2.89±0.51	2.63±0.47

a: $P<0.01$,与儿童组比较;b: $P<0.05$,与青年组比较

3 讨论

微生态学是近年来发展迅速的一门边缘学科,通过研究机体微生态系结构、微生态系平衡与失调和微生态防治的理论与实践,为相关疾病诊治及研究提供新的途径。对生理状态下结膜囊正常菌群组成及其动态变化的全面认识,是应用微生态规律来探讨眼表慢性感染性疾患的发病机制、变化规律以及提供新的防治措施的基础。

本研究188眼结膜囊需氧菌培养阳性率为62.23%,居前3位者为表皮葡萄球菌76.07%、类白喉棒状杆菌52.14%及芽胞杆菌属30.77%,与文献[2-4]报道基本一致,但我们发现了更多的芽胞杆菌属。芽胞杆菌是广泛存在于土壤、污水、灰尘中的腐生菌,可见于正常结膜囊[10],其检出率的提高可能提示芽胞杆菌作为结膜囊正常菌群的一部分,在维系结膜囊微生态系平衡中发挥了更大作用,其作用机制有待进一步研究。

年龄对结膜囊正常菌群的影响已被证实[5,11]。张小平等[6]通过对近13年中国人结膜囊细菌培养结果文献回顾与相关调查因素的Meta分析,认为年龄与结膜囊细菌培养阳性率有显著性关联。Rubio[5]将4 432例白内障患者根据年龄分成7组进行回顾性病例分析,探讨年龄对结膜囊菌群的影响,发现年龄在75~96岁患者阳性率为41.4%,比3~74岁患者在棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌(除外肺炎链球菌)、革兰阴性球菌、革兰阴性杆菌(除外嗜血杆菌)等菌种检出率高。Singer等[11]发现细菌培养阳性率在儿童(≤17岁)与成人(>18岁)基本相同,链球菌在儿童检出率(14.9%)高于成人(2.2%),其余细菌检出率无明显差异。我们的研究结果与Rubio[5]及Singer[11]有相似之处,发现老年人无论在双眼结膜囊带菌率、部分菌种阳性率还是单眼共生细菌种类方面均高于儿童及青年,后两者比较大多未见统计学差异。这可能与老年人抵抗力下降、免疫功能减低、泪液分泌减少、泪液中各种抗体、补体、酶等的缺乏及功能降低有关[7]。因此对老年人,特别是患有眼表慢性感染性疾患、糖尿病或围手术期的老年患者应给予重视。

活菌定量是正常菌群研究中的重要内容。目前对结膜囊需氧菌的数量检测多集中在半定量水平[2-4],即直接用培养基上菌落数(CFUs)来表示细菌数量。Cagle等[8]将取到结膜囊标本的藻酸盐拭子用先后2个步骤在TC Eagle's培养基和2.5%磷酸钠溶液中溶解,所得细菌混悬液等分接种到血琼脂培养基上,计数培养基上的菌落数。Abhay等[9]将结膜囊标本接种于巧克力血平板及营养琼脂后,用栅格技术计数平板上的菌落数(CFU)来比较用药前后结膜囊细菌数量变化。我们根据"人体各部位标本的正常菌群数为每克或每毫升标本中平均活菌计数(单位:CFU/g)"[12],通过公式:某菌数量=菌落数(CFU)/标本质量(g)对结膜囊各种细菌进行定量检测。标本质量即棉拭运送管在标本采集前后的质量差值,为保证此质量的精准,我们尽量减少棉拭在空气中的暴露时间,所有运送管均由专人于同一电子天平称量(精度:10^{-4}g),且室内温度、湿度大致相同,尽量保证实验条件的一致性。通过计算发现结膜囊菌群数量波动在10^2~10^5 CFU/g,与皮肤表面正常菌群数(10^3~10^4 CFU/g)相当,而远远少于结肠(10^{11}~10^{12} CFU/g)及牙齿表面(10^9~10^{10} CFU/g)正常菌群数[12],表明结膜囊正常菌群数量比人体其他部位相对较少。将各数值取对数后比较发现

老年人、青年人结膜囊菌群总数量显著多于儿童,类白喉棒状杆菌数量在 3 个人群均居首位,多于阳性检出率最高的表皮葡萄球菌数量,提示结膜囊细菌阳性检出率与数量并非平行关系。

结膜囊菌群无论种类还是数量的过度变化都可能破坏微生态系平衡而诱发疾患,故临床医师在应用微生态规律对慢性眼表疾病进行防治时应同时关注结膜囊菌群种类及数量 2 个方面的变化。

参考文献:

[1] 刘祖国. 眼表疾病学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2003: 53 – 65.

[2] Mino-de-Kaspar H, Kreutzer T C, Aguirre-Romo I, *et al*. A prospective randomized study to determine the efficacy of preoperative topical levofloxacin in reducing conjunctival bacterial flora[J]. Am J Ophthalmol, 2008, 145(1): 136 – 142.

[3] Cordova J E, Tenorio G, Garcia M M, *et al*. Conjunctival bacterial flora determination in the preoperative of cataract surgery[J]. Rev Med Hosp Gen Mex, 2008, 71 (2): 77 – 82.

[4] Moss J M, Nguyen D, Liu Y I, *et al*. Comparison of one-day versus one-hour application of topical gatifloxacin in eliminating conjunctival bacterial flora[J]. Ophthalmology, 2008, 115(11): 2013 – 2016.

[5] Rubio E F. Influence of age on conjunctival bacteria of patients undergoing cataract surgery[J]. Eye, 2006, 20(4): 447 – 454.

[6] 张小平, 叶　剑. 近 13 年中国人结膜囊细菌培养结果文献回顾与相关调查因素的 Meta 分析[J]. 中国实用眼科杂志, 2005, 23 (4): 428 – 431.

[7] 朱　力, 沈念慈, 陈华洁, 等. 老年人内眼手术前结膜囊细菌培养的分析[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2004, 26(3): 156 – 158.

[8] Cagle G D, Abshire R L. Quantitative ocular bacteriology: a method for the enumeration and identification of bacteria from the skin-lash margin and conjunctiva[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1981, 20 (6): 751 – 757.

[9] Vasavada A R, Gajjar D, Raj S M, *et al*. Comparison of 2 moxifloxacin regimens for preoperative prophylaxis: prospective randomized triple-masked trial. Part 2: residual conjunctival flora[J]. J Cataract Refract Surg, 2008, 34(8): 1383 – 1388.

[10] 李凤鸣. 眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 470.

[11] Singer T R, Isenberg S J, Apt L. Conjunctival anaerobic and aerobic bacterial flora in paediatric versus adult subjects[J]. Br J Ophthalmol, 1988, 72(6): 448 – 451.

[12] 赵　虎. 厌氧菌和微需氧菌感染与实验诊断[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005: 7 – 10.

(编辑　张　维)

(上接 969 页)

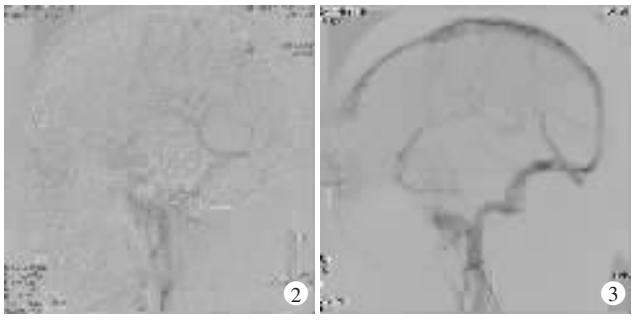


图 2　颈内动脉造影时静脉回流受阻,皮层大量迂曲的毛细血管,上矢状窦、下矢状窦、直窦、横窦、乙状窦均未显影

图 3　抗凝治疗 1 个月颈内动脉造影见各静脉窦显影清楚,静脉期迂曲的毛细血管消失

2　讨论

CVST 多发生于见于上矢状窦、横窦、乙状窦,其次为直窦和海绵窦[1],本病例中颅内多处静脉窦血栓形成尚属少见。引起颅内静脉窦血栓形成的病因可分为非感染性和感染性,前者居多,如严重脱水、营养不良、妊娠、口服避孕药、凝血功能障碍、创伤、肿瘤、内分泌疾病如甲状腺毒症等,女性患者多见[2,3]。本患者入院时血象高,考虑其发病与感染有关,但患者无耳面部疖肿及中耳炎,故感染灶不能确定。

颅内静脉窦血栓形成的临床表现因部位而异,其共同特征为颅内高压症状、意识障碍、痫性发作和局灶神经功能缺损[4]。上述症状缺乏特异性,故常易误诊为其他疾病。结合本病例,患者以头痛和左侧肢体无力就诊,故初诊为"脑梗死"。但入院后患者出现癫痫发作,CT 检查发现上矢状窦"三角征"(图 1),行腰穿检查发现颅内压增高,DSA 发现颅内静脉窦未显影,小静脉回流受阻扩张,故诊断明确。分析该患者早期误诊的原因如下:①患者为男性;②出现有偏侧神经系统体征;③无明确头面部感染灶。因此我们认为对青中年患者,如无脑血管病危险因素且突然发生类似卒中症状时应考虑到脑静脉窦血栓形成的可能。目前本病治疗多为使用抗凝剂或溶栓药治疗血栓形成,予以脱水降颅压、控制癫痫发作等对症处理。本病例患者通过上述治疗后症状明显好转,复查 DSA 提示颅内静脉窦通常无阻塞(图 3)。

综上所述,我们报道了 1 例较为少见的颅内多发静脉窦血栓形成,其病因有其独特和复杂之处,经早期诊断、早期治疗,患者预后良好。但有文献显示该病复发率约为 12%[5],故本患者出院后疾病的转归尚需我们进一步随访观察。

关键词: 颅内静脉窦;血栓

中图法分类号: R743.32　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] Renowden S. Cerebral venous sinus thrombosis[J]. Eur Radiol, 2004, 14(2): 215 – 226.

[2] Masuhr F, Mehraein S, Einhaupl K. Cerebral venous and sinus thrombosis[J]. J Neurol, 2004, 251(1): 11 – 23.

[3] 申红菊, 谢宜春, 陈延翠. 颅内静脉窦血栓形成 19 例临床分析[J]. 郑州大学学报:医学版, 2008, 42(2): 393 – 394.

[4] 王维治. 神经病学[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 161 – 162.

[5] 石俊华. 脑静脉窦血栓形成研究现状[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(1): 73 – 74.

(编辑　王小寒)