

16S rDNA 测序技术对细菌性眼内炎房水和玻璃体标本中细菌的鉴别作用

杨宝霞 李虹 孔凡芳 黄钰森

266071 青岛,山东省医学科学院 山东省眼科研究所 青岛眼科医院 山东省眼科学重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地

通信作者:黄钰森,Email:huang_yusen@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.004

【摘要】 **背景** 眼内炎是多种内眼手术的严重并发症,以往感染菌的确定多采用细菌培养和涂片染色法,但存在花费时间长和阳性率低的问题。16S rDNA 是细菌染色体上编码 rRNA 的序列,利用 16S rDNA 分子测序技术检测细菌具有高度的特异性。 **目的** 利用 16S rDNA 测序技术对细菌性眼内炎房水和/或玻璃体标本中的感染菌进行鉴定,探讨该技术在眼部感染性炎症诊断中的作用。 **方法** 收集 2015 年 6—12 月在青岛眼科医院临床诊断为细菌性眼内炎的患者 5 例 5 眼,抽取每例患者的房水 0.1~0.2 ml 或玻璃体标本 0.5~1.0 ml,各取 50 μ l 用于高通量测序,剩余标本行涂片检查和细菌培养。采用 D3096-01 微量 DNA 试剂盒提取标本中细菌 DNA,对收集的标本 DNA 样品进行 16S rRNA 基因 V3-V4 区 PCR 扩增,应用 MiSeq 300 测序仪对扩增的 16S rDNA 高变区序列进行测序,分析标本中病原菌的分类组成、分布特点以及各病原菌在标本中的相对含量,取 50 μ l 无 RNA 酶水于一次性无菌离心管内作为空白对照。 **结果** 共收集到 5 份房水或玻璃体标本,涂片染色结果阳性者 2 例,外伤性细菌性眼内炎为革兰阳性杆菌,滤过泡感染性细菌性眼内炎为革兰阴性杆菌,而细菌培养法结果均为阴性。16S rDNA 测序技术发现,5 例标本检测阳性率为 100%。外伤性细菌性眼内炎标本中高丰度菌属为葡萄球菌属、链球菌属和假单胞菌属,分别占 65.28%、18.90% 和 12.76%;白内障术后 2 d 急性细菌性眼内炎患眼标本中高丰度菌属有假单胞菌属、不动杆菌属和 *Limnobacter* 菌属,分别占 53.68%、8.62% 和 5.96%;滤过泡感染性细菌性眼内炎标本中高丰度菌属有莫拉菌属和假单胞菌属,分别占 88.89% 和 9.52%;白内障术后 22 d 迟发性细菌性眼内炎标本中相对含量较高的菌属有假单胞菌属,占 84.63%;白内障术后 1 d 急性细菌性眼内炎患眼标本中相对含量较高的有假单胞菌属,占 97.89%。 **结论** 16S rDNA 测序可准确鉴别眼内炎患者房水和玻璃体标本中的致病菌,该方法检测的阳性率明显高于传统的涂片染色法和细菌培养法。

【关键词】 眼内炎/微生物学;房水/微生物学;玻璃体/微生物学;细菌 DNA/分析;测序分析, DNA; 16S rDNA

基金项目: 国家自然科学基金项目(81370996);山东省重点研发计划(省攻关)项目(2015GSF118070)

Identification of pathogenic bacteria in aqueous and vitreous of endophthalmitis by 16S rDNA sequencing technique

Yang Baoxia, Li Hong, Kong Fanfang, Huang Yusen

Qingdao Eye Hospital, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Huang Yusen, Email: huang_yusen@126.com

[Abstract] **Background** Endophthalmitis is a serious complication of intraocular surgery. Conventional identification methods for bacteria are bacterial culture and smear method, but these laboratory tests spend a long time and have low positive rates. 16S rDNA is the bacterial chromosome encoding ribosomal RNA sequences, and it is determined that 16S rDNA sequencing has a high specificity for the identification of bacteria. **Objective** This study was to identify the infectious bacteria from aqueous humor or vitreous body in the eyes with endophthalmitis by 16S rDNA sequencing technique, and to investigate the diagnosis efficiency of 16S rDNA sequencing technique on bacterial endophthalmitis. **Methods** Anterior chamber fluid (0.1–0.2 ml) or vitreous humor (0.5–1.0 ml) specimens were collected from 5 eyes of 5 patients with endophthalmitis in Qingdao Eye Hospital from June to December 2015 and used for high throughput sequencing, bacterial culture and smear, respectively. Bacteria DNA was extracted from the specimen with D3096-01 trace DNA kit for the amplification of V3-V4 region of 16S rRNA gene

and sequencing of hypervariable region of all microbes in the samples by MiSeq Illumina Sequencing Platform. Then the bioinformatic analysis including analysis of taxonomy, abundance and alpha diversity were performed. Nuclease-free water of 50 μl in the centrifuge tube was used as control. **Results** Five aqueous humor or vitreous body samples were collected, and the positive results were exhibited by smear examination, with the Gram positive bacilli in the traumatic endophthalmitis eye and Gram negative bacilli in the filtering bleb infectious endophthalmitis eye, and all culture results were negative. 16S rDNA sequencing showed the positive outcomes in all the 5 samples. The high abundant bacterial genera were *Staphylococcus* (65.28%), *Streptococcus* (18.90%) and *Pseudomonas* (12.76%) in the traumatic endophthalmitis eye; the major components of sample were *Pseudomonas* (53.68%), *Acinetobacter* (8.62%) and *Limnobacter* (5.96%) in the eye with acute endophthalmitis occurring at 2 days following cataract surgery; the major components in the filtering bleb infectious endophthalmitis eye were *Moraxella* (88.89%) and *Pseudomonas* (9.52%); the *Pseudomonas* was major components in the later-onset endophthalmitis eye (84.63%) and the eye with acute endophthalmitis occurring at 1 day after cataract surgery (97.89%). **Conclusions** A distinct advantage is found in 16S rDNA sequencing technique for the identification of the pathogenic bacteria in endophthalmitis eyes due to its high positive rate in comparison with bacterial culture and smear method.

[Key words] Endophthalmitis/microbiology; Aqueous humor/microbiology; Vitreous body/microbiology; DNA, bacterial/analysis; Sequence analysis, DNA; 16S rDNA

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370996); Key Research & Development Project of Shandong Province (2015GSF118070)

细菌性眼内炎是白内障术后最严重的并发症之一,国内外报道其发生率为 0.04% ~ 0.13%^[1-4]。尽管术前使用抗生素、减小手术切口、缩短手术时间等措施可一定程度地预防眼内炎的发生,但白内障术后眼内炎的发生率并未明显降低,因此早期诊断和治疗对挽救患者视力或者减轻炎症损害尤为关键。目前,眼内炎致病菌的鉴定主要依靠细菌培养法,但其周期长,阳性率低。随着分子生物学技术的快速发展,利用 16S rDNA 检测致病菌的研究逐渐受到关注^[5-6]。我们先前的研究中利用 16S rDNA 测序技术完成了对正常结膜囊菌群组成成分和多样性分析^[7],为研究微生物在眼表疾病中的作用搭建了框架,但尚未用于眼内炎感染菌的快速诊断。本研究中拟采用 Illumina 测序平台的 16S rDNA 新一代高通量测序技术对眼内炎患者的前房水或玻璃体细菌基因组进行分析,探讨该方法鉴定眼内炎致病菌的可行性。

1 材料与方法

1.1 标本采集

纳入 2015 年 6—12 月于青岛眼科医院临床诊断为细菌性眼内炎的患者 5 例 5 眼,其中男 4 例,女 1 例;年龄 24 ~ 77 岁;包括外伤性细菌性眼内炎、白内障术后 2 d 急性细菌性眼内炎、青光眼滤过手术后滤过泡感染性细菌性眼内炎、白内障术后 22 d 迟发性细菌性眼内炎和白内障术后 1 d 急性细菌性眼内炎各 1 例,根据患者病史及患眼视力明显下降、眼部疼痛、眼分泌物增多、眼睑肿胀、角膜水肿、结膜充血和水肿、前房渗出或积脓、玻璃体炎性混浊、视网膜表面脓液附

着等症状进行确诊。按照眼科检验协助组制定的《感染性眼病细菌学检查操作专家共识(2105)》取样原则及操作规范^[8],在患眼进行前房灌洗、玻璃体注药或者玻璃体切割前采集房水 0.1 ~ 0.2 ml 或玻璃体标本 0.5 ~ 1.0 ml,每眼各取 50 μl 标本以提取标本组细菌 DNA 并行高通量测序,剩余标本用于涂片、细菌培养等常规病原学检测。取 50 μl 无 RNA 酶水于一次性无 RNA 酶离心管内作为空白对照。

1.2 高通量测序

1.2.1 病原体 DNA 的提取 按照 D3096-01 微量 DNA 试剂盒(美国 OMEGA 公司)说明书的操作步骤提取标本细菌总 DNA,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。DNA 标本在冷藏条件下送至杭州联川生物技术有限公司进行测序及生物信息分析。

1.2.2 16S rDNA 的测序 用细菌引物 319F 和 860R (上游引物:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3',下游引物:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (杭州联川生物技术有限公司)对收集的标本 DNA 进行 16S rRNA 基因 V3-V4 区 PCR 扩增,然后琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 片段,构建文库,制备成簇;应用 MiSeq 300 测序仪(美国 Illumina 公司)对扩增的 16S rDNA 高变区序列进行测序,测序区域为 V3-V4 区,长度为 469 bp,测序类型为 300PE。

1.2.3 物种分类和丰度分析 原始测序数据归一化处理获取过滤后的有效数据,拼接成类别的标签后将重叠区域约 90 bp 的片段组装成高质量的 300 Pes,组装的序列通过应用聚类软件 CD-hit-est (<http://cd-hit.org>)进行去冗余序列分析^[9]。利用软件 PyNAST

(<http://qiime.org/pynast/>) 分析计算每个样本的序列数量及可操作的分类单元 (operational taxonomic units, OTU), 其中相似性大于 97% 的序列定义为一个 OTU。利用核糖体数据库项目分类器 [Ribosomal Database Project (RDP) Classifier] 对所有 OTU 代表序列进行物种分类分析^[10], 基于 OTU 的结果绘制稀疏曲线^[11], 计算单个样本 Alpha 多样性值, 包括 Shannon 指数、Simpson 指数和 Chao1 指数。Shannon 指数和 Chao1 指数值越大表示该环境的物种越丰富, Simpson 指数越接近于 0 表示物种越丰富。

2 结果

2.1 患眼标本的常规病原学检测

2 例标本的涂片检测结果呈阳性, 其中外伤性细菌性眼内炎标本中感染菌为革兰阴性杆菌, 青光眼滤过术后滤过泡感染眼标本感染菌为革兰阳性杆菌。5 例患眼标本的细菌培养结果均为阴性。

2.2 16S rDNA 高通量测序技术检测

2.2.1 测序结果及取样深度验证 标本收集过程中用于监测污染的无 RNA 酶水标本未检测到细菌 DNA, 证实标本收集及 DNA 提取过程无污染。各标本高通量测序的数据统计结果显示, 5 例眼内炎标本共获得 149 858 条优化序列, 平均长度为 469 bp; 5 例标本共产生 4 403 个 OTU (表 1)。

表 1 5 例样本测序数据分析结果

标本序号	序列数	去冗余序列数	OTU	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数
1	33 919	33 919	502	8.971 544	0.001 992	126 253
2	28 002	28 002	824	9.686 501	0.001 214	339 900
3	33 262	33 262	311	8.280 771	0.003 215	48 516
4	29 459	29 459	2 281	11.155 450	0.000 438	2 602 621
5	25 216	25 216	485	8.921 841	0.002 062	117 855
合计	149 858	149 858	4 403	47.016 110	0.008 921	3 235 145

注: OTU: 可操作的分类单元

2.2.2 稀疏曲线 稀疏曲线可见 5 个标本稀疏曲线均基本趋于平缓 (图 1), 说明测序深度较好, 基本覆盖了标本的所有菌落, 较真实地反映出眼内炎致病菌的细菌群落。

2.2.3 检出细菌的在门水平 5 例眼内炎标本共检出 13 个菌门。组成致病菌群落的 149 536 条序列中主要包括变形菌门 116 289 条, 占 77.77%; 厚壁菌门 30 076 条, 占 20.11%; 拟杆菌门 1 281 条, 占 0.86%。这 3 种菌门在各标本中均相对含量较高, 但 5 例标本个体差异显著。对相对含量 $\geq 1\%$ 的门类进行统计, 外

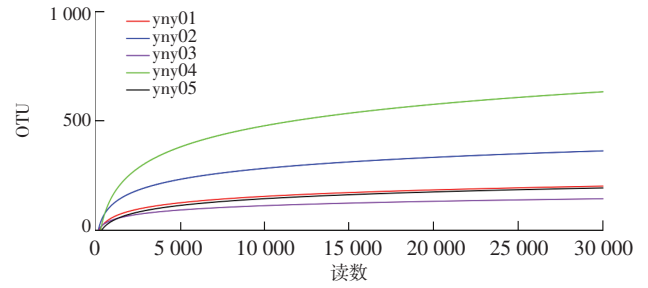


图 1 5 例眼内炎标本中微生物群落的稀疏曲线 OTU: 可操作的分类单元; yny: 眼内炎

伤性细菌性眼内炎患眼标本中相对含量较高的门类有厚壁菌门和变形菌门, 分别为 83.86% 和 15.76%, 二者在该例标本中的总相对含量达 99.62%; 白内障术后 2 d 急性细菌性眼内炎患眼标本中有变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、蓝藻细菌/叶绿体和异常球菌-栖热菌门, 相对含量分别为 92.32%、2.34%、1.64%、1.68% 和 1.08%; 滤过泡感染性细菌性眼内炎患眼标本中主要为变形菌门, 占 99.59%; 白内障术后 22 d 迟发性细菌性眼内炎标本中有变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门, 相对含量分别为 92.39%、3.04% 和 2.37%; 白内障术后 1 d 急性细菌性眼内炎患眼标本中主要为变形菌门, 占 99.30% (图 2)。

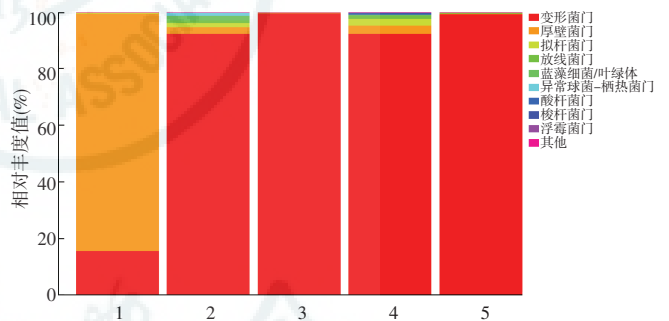


图 2 门水平各个样本丰度位于前十位的细菌群类比较 1: 外伤性细菌性眼内炎患眼标本 2: 白内障术后 2 d 急性细菌性眼内炎患眼标本 3: 滤过泡感染性细菌性眼内炎患眼标本 4: 白内障术后 22 d 迟发性细菌性眼内炎患眼标本 5: 白内障术后 1 d 急性细菌性眼内炎患眼标本

2.2.4 检出细菌的在属水平 5 例眼内炎标本共检测出 120 个属, 每个标本检测到 36 ~ 69 个属, 其中 18 个属由 5 个标本共有。对相对含量 $\geq 1\%$ 的属进行统计, 5 例标本中相对含量较高的属共检测到 19 个。外伤性细菌性眼内炎患眼标本中相对含量较高的属有葡萄球菌属、链球菌属和假单胞菌属, 分别占 65.28%、18.90% 和 12.76%; 白内障术后 2 d 急性细菌性眼内炎患眼标本中相对含量较高的属有假单胞菌属 (占 53.68%)、不动杆菌属 (占 8.62%)、Limnobacter 菌属 (占 5.96%)、无色杆菌属 (占 3.69%)、涅瓦菌属 (占

3.03%)、*Methyloversatilis* (占 2.60%)、水栖菌属 (占 2.57%)、甲基杆菌属 (占 1.75%)、柄杆菌属 (占 1.57%)、*Aquabacterium* (占 1.27%)、寡养单胞菌属 (占 1.3%)、从毛单胞菌属 (占 1.24%)、溶杆菌属 (占 1.23%)、*Solimonas* (占 1.17%) 和栖热菌属 (占 1.13%); 滤过泡感染性细菌性眼内炎患眼标本相对含量较高的属有莫拉菌属和假单胞菌属, 分别占 88.89% 和 9.52%; 白内障术后 22 d 迟发性细菌性眼内炎标本中相对含量较高的菌属有假单胞菌属 (占 84.63%)、不动杆菌属 (占 1.92%)、无色杆菌属 (占 1.91%)、鞘氨醇单胞菌属 (占 1.66%)、柄杆菌属 (占 1.36%) 和从毛单胞菌属 (占 1.07%); 白内障术后 1 d 急性细菌性眼内炎患眼标本中相对含量较高的有假单胞菌属, 占 97.89%。每个样本中假单胞菌的相对比例均较高, 其中白内障术后 1 d 急性细菌性眼内炎患眼标本中的假单胞菌为绝对优势菌群, 占 97.89% (图 3)。

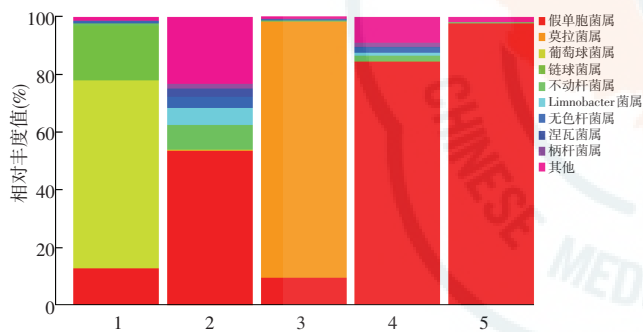


图 3 属水平各个样本丰度位于前十位的细菌群类比较 1: 外伤性细菌性眼内炎患眼标本 2: 白内障术后 2 d 急性细菌性眼内炎患眼标本 3: 滤过泡感染性细菌性眼内炎患眼标本 4: 白内障术后 22 d 迟发性细菌性眼内炎患眼标本 5: 白内障术后 1 d 急性细菌性眼内炎患眼标本

3 讨论

眼内炎的早期诊断至关重要, 根据病原学检测结果选择敏感抗生素进行对因治疗是相关领域的研究热点, 对前房水和/或玻璃体样本行病原微生物培养是眼内炎诊断的金标准, 是目前临床上的常规检测方法, 但该方法有如下不足: (1) 细菌培养结果的阳性率为 34% ~ 65%, 患者围手术期抗生素的应用、采集的标本量不足、标本中含菌量少及微生物自身对生长环境的挑剔等因素均可导致阳性率降低^[12-14]。(2) 细菌培养结果阳性时得到的阳性致病菌有时也并非主要致病菌, 培养过程中有些非主要致病的细菌容易生长, 有时会导致结果的偏倚。(3) 细胞培养耗时较长, 一般需要 3 ~ 5 d, 易延误早期治疗时机。标本涂片也是临床常用的病原学诊断方法, 这种方法的优点在于不需要特

殊设备, 快速简便, 但结果的判断主观性强, 依赖于技术人员的经验。本研究 5 例眼内炎标本中仅有 2 例涂片检测结果阳性, 5 例标本细菌培养结果均为阴性。我们以往对 21 例患者的眼内炎标本涂片结果显示, 18 例标本中仅有 1 例见大量阳性球菌, 6 例房水细菌培养结果阳性, 1 例玻璃体液标本细菌培养结果阳性^[2]。一项多中心研究发现, 66 例术后眼内炎患者中细菌培养结果阳性者仅占 39%, 其中假单胞菌属占 40%, 凝固酶阴性葡萄球菌占 32%^[4]。本研究中应用 16S rDNA 高通量测序结果显示, 5 例细菌性眼内炎房水或玻璃体标本中 4 例由多种致病菌引起, 其中外伤性眼内炎创口较大且伴有眼内异物, 病原菌丰富, 丰度较高的菌属各自所占比例均在 10% 以上, 葡萄球菌属相对含量最高; 青光眼术后滤过泡感染性眼内炎患者上方结膜坏死并渗漏是外来细菌进入眼内的主要途径, 标本中相对含量较高的菌属为莫拉菌属和假单胞菌属; 3 例白内障术后眼内炎由于围手术期应用的抗生素清除了结膜囊的菌群^[15], 病原菌较为单一, 主要为假单胞菌属。稀疏曲线反映了标本的测序深度, 高通量测序技术足以覆盖标本中所有菌群。16S rDNA 检测结果与临床判断结果较为一致, 此外本研究中发现致病菌丰度与发病时间及感染程度有关, 发病时间越长, 炎症反应越重, 致病菌丰度越高, 故 16S rDNA 高通量测序技术的病原菌检测阳性率高于传统方法。

以 PCR 为代表的分子生物学检测技术开创了感染性疾病病原微生物检测的新时代, 曾有研究者通过 PCR 扩增细菌核糖体 16S rRNA 基因序列鉴定泪囊炎病原菌种属, 证实该方法准确性高且特异性强^[16], 充分说明分子生物学检测技术克服了以往培养检测的缺陷, 避免了抗菌药物对病原微生物检测的影响, 即便有的病原微生物已被灭活, 残留的核酸分子仍可用于致病菌的检测, 提高了病原微生物检测的敏感性和特异性。近年来, 分子生物学检测技术用于细菌性眼内炎的诊断亦广泛开展, 然而传统检测方法通量低, 引物设计只针对某一种或某一株致病菌, 即便设计细菌通用引物也只能研究高丰度的致病菌^[12-14]。细菌性眼内炎致病菌复杂多样, 其中低丰度细菌同样扮演着重要角色。本研究结果表明, 第二代测序技术的推广克服了传统测序方法通量低、操作复杂等缺陷, 实现了对混合致病菌的种属定性, 以获得所有致病菌信息。16S rDNA 是细菌染色体上编码 rRNA 的序列, 由多个保守区与与之相间的高变区组成, 进化较慢的保守区可用于设计同类微生物的通用鉴定引物, 进化较快的可变区则可用于设计特异性鉴定引物以此将细菌鉴定到属、种

乃至株的水平,已成为细菌鉴定与分类研究中较为理想的靶序列。16S rDNA 测序技术作为高通量测序技术依赖的组学技术之一,着眼于对微环境中微生物群落菌种组成进行鉴定分析,提高了细菌性眼内炎病原菌检测的阳性率和准确率。

尽管如此,16S rDNA 高通量测序技术仍存在一定的局限性。(1)高通量测序前需进行标本模板 DNA 的提取,房水或玻璃体液标本中带菌量过少会导致 DNA 提取率低,无法完成测序。(2)患者经抗感染治疗后灭活的致病菌经 PCR 扩增仍可能出现阳性结果,影响临床医师的判断。(3)目前的测序方法只能提供致病微生物信息,尚不能对致病菌的耐药基因和敏感性药物进行检测。(4)高通量测序限于较大的测序成本及数据分析平台等因素尚不能得到广泛推广。

目前,高通量测序在临床医学中用途广泛,但在眼科的应用仍很少^[17-21]。本研究中将该技术用于细菌性眼内炎的诊断,效率高且准确性好,减少了检验者经验不足、细菌自身生长慢、营养条件苛刻、样本带菌量少等因素的影响,与传统方法互为补充,为细菌性眼内炎的诊断提供了新的选择。

参考文献

- [1] 姚克. 我国白内障研究发展方向及面临的问题[J]. 中华眼科杂志, 2015, 51(4): 241-244. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.04.001.
Yao K. Cataract in China: research and development direction and problems encountered[J]. Chin J Ophthalmol, 2015, 51(4): 241-244. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.04.001.
- [2] 黄钰森,詹蓉,谢立信. 透明角膜切口超声乳化白内障除术后急性细菌性眼内炎的临床观察[J]. 中华眼科杂志, 2015, 51(12): 918-923. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.12.010.
Huang YS, Zhan Y, Xie LX. Clinical observations of acute-onset endophthalmitis after clear corneal phacoemulsification [J]. Chin J Ophthalmol, 2015, 51(12): 918-923. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.12.010.
- [3] Friling E, Lundström M, Stenevi U, et al. Six-year incidence of endophthalmitis after cataract surgery: Swedish national study [J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 39(1): 15-21. DOI:10.1016/j.jcrs.2012.10.037.
- [4] Yao K, Zhu Y, Zhu Z, et al. The incidence of postoperative endophthalmitis after cataract surgery in China: a multicenter investigation of 2006-2011 [J]. Br J Ophthalmol, 2013, 97(10): 1312-1317. DOI:10.1136/bjophthalmol-2013-303282.
- [5] Jayasudha R, Narendran V, Manikandan P, et al. Identification of polybacterial communities in patients with postoperative, posttraumatic, and endogenous endophthalmitis through 16S rRNA gene libraries[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(5): 1459-1466. DOI:10.1128/JCM.02093-13.
- [6] Amisshah-Arthur KN, Farooq TA, Dhillon N, et al. Rare case of post-cataract-surgery Prevotella endophthalmitis diagnosed by polymerase chain reaction DNA sequencing [J]. J Cataract Refract Surg, 2013, 39(3): 463-466. DOI:10.1016/j.jcrs.2012.12.021.
- [7] Huang Y, Yang B, Li W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities [J/OL]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(7): 643. e7-643. e12 [2016-05-20]. http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/articles/S1198-743X(16)30065-9/fulltext. DOI:10.1016/j.cmi.2016.04.008.
- [8] 眼科检验协助组. 感染性眼病细菌学检查操作专家共识(2015年)[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2016, 18(1): 1-4. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2016.01.001.
Eye Examine Assistance Group. Expert consensus for the operating procedures for bacterial examination of ocular infection (2015) [J]. Chin J Optom Ophthalmol Vis Sci, 2016, 18(1): 1-4. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2016.01.001.
- [9] Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. Bioinformatics, 2006, 22(13): 1658-1659. DOI:10.1093/bioinformatics/btl158.
- [10] Ghodsi M, Liu B, Pop M. DNACLUST: accurate and efficient clustering of phylogenetic marker genes [J/OL]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 271 [2016-01-13]. http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-12-271. DOI:10.1186/1471-2105-12-271.
- [11] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(23): 7537-7541. DOI:10.1128/AEM.01541-09.
- [12] Joseph CR, Lalitha P, Sivaraman KR, et al. Real-time polymerase chain reaction in the diagnosis of acute postoperative endophthalmitis [J]. Am J Ophthalmol, 2012, 153(6): 1031-1037. DOI:10.1016/j.ajo.2011.12.007.
- [13] Goldschmidt P, Degorge S, Benallaoua D, et al. New test for the diagnosis of bacterial endophthalmitis [J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93(8): 1089-1095. DOI:10.1136/bjo.2008.152181.
- [14] Anand AR, Madhavan HN, Therese KL. Use of polymerase chain reaction (PCR) and DNA probe hybridization to determine the Gram reaction of the infecting bacterium in the intraocular fluids of patients with endophthalmitis [J]. J Infect, 2000, 41(3): 221-226. DOI:10.1053/jinf.2000.0731.
- [15] 黄钰森,代云海,孙士营,等. 白内障患者术前结膜囊细菌的清除方法 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(35): 2458-2461. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2009.35.004.
Huang YS, Dai YH, Sun SY, et al. Study of different methods in reducing conjunctival bacteria before cataract surgery [J]. Natl Med J China, 2009, 89(35): 2458-2461. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2009.35.004.
- [16] 安娜,刘先宁,兰雅娴,等. 16S rRNA 基因序列法对 30 例泪囊炎致病细菌的鉴定 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(9): 867-869. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.015.
An N, Liu XN, Lan YX, et al. Identification of the genus and species of the dacryocystitis-causing bacteria by 16S rRNA gene [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(9): 867-869. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.015.
- [17] Yan Z, Poroyko V, Gu S, et al. Characterization of the intestinal microbiome of Hirschsprung's disease with and without enterocolitis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 445(2): 269-274. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.01.104.
- [18] Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH, et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne [J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(9): 2152-2160. DOI:10.1038/jid.2013.21.
- [19] 王娟,唐志娟,李谨,等. 根管治疗后伴或不伴根尖周炎患牙根管内微生物群落的比较分析 [J]. 中华口腔医学杂志, 2014, 49(10): 607-613. DOI:10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2014.10.009.
Wang J, Tang ZJ, Li J, et al. Comparison of the intraradicular bacterial community structures of teeth with or without post-treatment periapical periodontitis [J]. Chin J Stomatol, 2014, 49(10): 607-613. DOI:10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2014.10.009.
- [20] 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. DOI:10.1167/iovs.12-9922.
- [21] Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5408-5413. DOI:10.1167/iovs.10-6939.

(收稿日期:2016-09-06)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)