



群链球菌感染的 实验诊断

唐由凯 张廉生 主译
张永高 主审

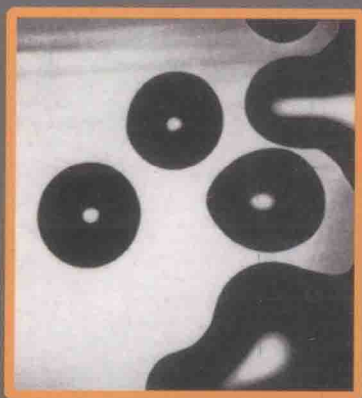
Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections

Dwight R. Johnson
Edward L. Kaplan

Jaroslav Sramek
Ruth Bicova
Jiri Havlicek
Helena Havlickova
Jitka Motlova
Paula Kriz



World Health Organization
Geneva



湖北科学技术出版社

A 群链球菌感染的实验诊断

Dwight R. Johnson Jaroslav Sramek

Edward L. Kaplan Ruth Bicova

Jiri Havlicek

Helena Havlickova

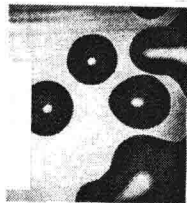
Jitka Motlova

Paula Kriz

唐由凯 张廉生 主译

张永高 主审

Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections



World Health Organization Geneva

湖北科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

A 群链球菌感染的实验诊断/唐由凯主译. —武汉:
湖北科学技术出版社, 2002. 6

ISBN 7 - 5352 - 2947 - 6

I. A… II. 唐… III. 链球菌感染 实验室诊断
IV. R515.904

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 110688 号

Laboratory Diagnosis of Group
A Streptococcal Infections
© World Health Organization 1996

The Director - General of the World Health Organization has granted translation rights for an edition in Chinese to the Hubei Institute for Nationality, which is solely responsible for the Chinese edition.

A 群链球菌感染的实验诊断 © 唐由凯 张廉生 主译

策 划:李慎谦 李海宁
责任编辑:李海宁

封面设计:张 浩

出版发行:湖北科学技术出版社
地 址:武汉市武昌黄鹄路 75 号

电话:86782508
邮编:430077

印 刷:鄂州市第一印刷厂

邮编:436000

850mm × 1168mm 32 开 5.5 印张
2002 年 6 月第 1 版

140 千字
2002 年 6 月第 1 次印刷

印数:0 001—1 000
ISBN 7 - 5352 - 2947 - 6/R · 666

定价:25.00 元

本书如有印刷质量问题 可找承印厂更换

作者介绍

在鉴定和控制 A 群链球菌感染中,实验室的作用是极其重要的,这对于微生物学实验室来说同样如此,它担负着对来自上呼吸道 A 群链球菌的培养,以及测定抗体滴度的任务。尽管新的抗菌药物的发展,但过去 10 年的经验已经显示,A 群链球菌的感染仍然是重要的,并且可以预料未来的情况可能仍然如此。在 20 世纪结束之时,人们对这些感染的了解是不完全的,因此应将注意力放在临床实验室和研究实验室的活动方面。在布拉格和明尼阿波利斯的世界卫生组织链球菌协作中心都已注意到,要求提供咨询,培训实验室人员,提供实验试剂(许多试剂可免费获得)的人数正在增长。

由于 A 群链球菌感染的临床和流行病学问题的再现以及技术问题的容量,从而大大地促进了这本手册的出版,我们确信,在我们两个实验室所获得的经验对于其他的实验室也具有价值,有助于其他地方诊断工作的准确性和标准化。本书所收录的方法,在临床微生物学实验室、免疫学实验室和研究实验室是最常用的方法,并为那些工作在更边远地区的实验室人员提供了广泛的指导。大多数方法是用于我们两所实验室所编辑并发现这些方法是行之有效的,但有许多参考书和已出版的文献中建议值得借鉴。有时,描述了两种不同的方法,一种是来自明尼阿波利斯,另一种来自于布拉格,这些仅仅反映了我们不同的实践并没有专门暗示那一种方法可选用而不选用另一种方法。

这本手册描写详细,在某种程度上压缩了 1980 年由 Richard Facklam 博士撰写的后由 Jiri Rotta 博士撰写的世界卫生组织内部

文件(WHO/BAC/80/1),虽然许多传统的技术仍然相同,但在临床实验室和研究实验室已有很多的变化。因此,这本手册所包含的许多技术在1980年的文件中没有包括进去,除此之外,还为有兴趣的用户提供了另外的信息,即大量的参考文献。对于目前的内容而言,在某种程度上我们尽量做到对于所有水平的读者都能够理解并容易做到。

我们感谢由 Facklam 和 Rotta 博士在1980年撰写的文件所提供的指导,他们最初文章的许多内容被逐字引用,我们手册的每一位作者对扩展它们的内容作出了贡献,当然还有其他的同事们,由于太多就不单个提及。我们十分感谢他们的建议和慷慨地为我们提供资料。

我们特别感激世界卫生组织监督和控制疾病发生和传播部的 Evgueni Tikhomirov 博士,为我们完成这项工作提供的鼓励 and 机会,特别感激世界卫生组织出版办公室的 Sarah Ballance 夫人对于原稿的仔细编辑工作。谢谢二位。

美国,明尼阿波利斯

世界卫生组织

链球菌参考和研究协作中心

Dwight R. Johnson

Edward L. Kaplan

捷克共和国,布拉格

世界卫生组织

链球菌参考和研究协作中心

Jaroslav Sramek

Ruth Bicova

Jiri Havlicek

Helena Havlickova

Jitka Motlova

Paula Kriz

(游洪波 译 / 唐由凯 校)

序

在 20 世纪结束的时候,化脓性链球菌(Lancefield A 群)的感染及其化脓性和非化脓性的疾病在全世界无论什么样的气候、生态和人文条件都可以发生,而且它仍然是重要的医疗和公共卫生问题。

上呼吸道的 A 群链球菌感染,特别是小孩它是最常见的细菌感染。而且,在许多正经历工业化的国家,A 群链球菌感染后的非化脓性疾病,如急性风湿热和链球菌感染后急性肾小球肾炎是构成发病率和死亡率的重要因素。在这些发展中国家,那儿居住着世界上三分之二的人口,对于风湿性心脏病这种复杂病例,心外科手术是无能为力使其恢复正常的,因此,对诊断和治疗这种感染给我们增加了难度。风湿热的活动和严重的全身性 A 群链球菌的感染,如链球菌毒性休克综合征、丹毒、坏死性筋膜炎,在北美、斯堪的纳维亚、英国和其他工业化国家已有报道。这对于初级管理医生,感染性疾病的专家以及公共卫生专家无疑是一种挑战。

临床微生物实验室或免疫学实验室和参考实验室对于保证 A 群链球菌感染的正确实验室诊断有着极其重要的作用,因为,这对于国家控制风湿热、风湿性心脏病、急性链球菌感染后肾小球肾炎和严重侵袭性 A 群链球菌感染是很重要的。

这本手册对于“友好用户”提供了有关 A 群链球菌感染的实验诊断的综合知识。这对于 A 群链球菌感染的实验室评价所通常需要的程序具有良好的参考和指导作用。本书所包括的内容不仅有关于细菌学的方法,而且也有关于血清学评价和链球菌抗体试验,和一些其他重要技术的描述,例如,供链球菌血清学分型使

用的抗血清的制备(许多抗血清购买不到)。本书特别具有价值的方法是作者们所工作的两个参考实验室广博经验的结晶,也包括来源于出版文献的程序和建议。虽然其他的方法已被使用,但这本手册所收集的方法都是一些已被报告有效的方法。

链球菌参考菌株和诊断血清能从美国明尼阿波利斯世界卫生组织血清库获得,或从捷克共和国布拉格世界卫生组织链球菌参考和研究协作中心获得(世界卫生组织血清库是由世界卫生组织在布拉格、明尼阿波利斯、新德里、里昂、罗马、圣彼得堡的国家链球菌研究中心的世界卫生组织协作中心协作实验的结果)。

世界卫生组织在促进链球菌感染的实验室标准化技术方面一直起着积极的作用。最初的一套实验指南(链球菌感染及其并发症的微生物学诊断方法手册,世界卫生组织未出版的文件 WHO/BAC/80/1)由 R. R. Facklam 博士撰写,后由 J·Rotta 博士撰写。1980 年由世界卫生组织发出并被广泛用于全球的实验室。随着实验技术的众多进展和人们对 A 群链球菌感染的认识,在布拉格和明尼阿波利斯的世界卫生组织链球菌参考和研究协作中心已经赋予这本手册以崭新的内容并扩大了它的范围,包括添加的对临床实验室、参考实验室和研究实验室有用的程序,世界卫生组织对于作者们编写这本新的出版物所作出的贡献表示感激,因为全世界的实验室和研究工作者将分享他们的知识和技术。

瑞士、日内瓦

世界卫生组织

监督和控制疾病发生和传播部

E. Tikhomirov

(唐由凯 译 / 游洪波 校)

目 录

序	(1)
作者介绍	(1)
1 概述	(1)
1.1 A 群链球菌感染的影响	(1)
1.2 A 群链球菌的结构和抗原成分	(2)
2 标本的收集和运送	(5)
2.1 标本的收集	(5)
2.2 运送标本至实验室	(6)
3 培养、认识和贮藏	(14)
3.1 培养基	(14)
3.2 培养方法	(20)
3.3 培养条件	(22)
3.4 通过培养物来认识溶血性链球菌	(23)
3.5 非典型形态学形态	(26)
3.6 培养结果的报告	(27)
3.7 链球菌的保存	(28)
4 Lancefield 血清群的鉴定	(32)
4.1 概述	(32)
4.2 初步鉴定	(33)
4.3 群抗原提取方法	(34)
4.4 群抗原提取方法的比较	(39)
4.5 群抗原检测方法	(40)

4.6	快速分群方法	(43)
5	A 群链球菌的特性	(45)
5.1	检测菌株特性的血清学方法	(45)
5.2	检测菌株特性的非血清学方法	(46)
6	T-蛋白测定的凝集反应方式	(51)
6.1	概述	(51)
6.2	供凝集反应链球菌悬液的制备	(53)
6.3	实施凝集反应试验	(54)
6.4	结果评价	(56)
7	用 M-蛋白沉淀反应进行血清分型	(58)
7.1	Lancefield 热盐酸 M-抗原提取物的制备	(58)
7.2	在琼脂凝胶中(Ouchterlony 双向扩散试验) 进行 M-抗原的检测	(60)
7.3	毛细玻璃管沉淀试验	(62)
8	用血清混浊反应进行血清分型	(64)
8.1	概述	(64)
8.2	混浊因子和混浊因子作用物的来源	(65)
8.3	检测混浊因子的琼脂方法	(65)
8.4	供混浊因子抑制反应血清等分型的琼脂方法	(67)
8.5	供混浊因子检测和抑制反应血清分型的 试管方法	(70)
8.6	供混浊因子检测和抑制反应血清分型 的微量平板法	(70)
9	血清学试验检测 A 群链球菌抗体	(76)
9.1	对链球菌抗原的免疫反应	(76)
9.2	供血清学调查的人血清的处理	(77)

10	抗链球菌溶血素 O 的检测	(79)
10.1	概述	(79)
10.2	分光光度计肉眼测定法	(80)
10.3	不使用分光光度计的肉眼测定法	(89)
10.4	微量平板法	(92)
11	抗 DNA 酶 B 的检测	(98)
11.1	概述	(98)
11.2	微量平板法 1	(98)
11.3	微量平板法 2	(104)
12	链球菌抗 - 透明质酸酶的测定	(112)
12.1	概述	(112)
12.2	透明质酸酶滴定法	(112)
12.3	人血清抗透明质酸酶的测定	(116)
13	间接杀菌试验供抗 M 抗体的测定	(118)
13.1	概述	(118)
13.2	杀菌试验方法 1	(125)
13.3	杀菌试验方法 2	(130)
13.4	用杀菌试验进行 M 血清分型	(136)
13.5	用间接杀菌试验评估 M - 蛋白的含量	(136)
14	供血清学分群和分型的抗血清的制备	(138)
14.1	分群抗血清	(138)
14.2	T - 凝集抗血清	(141)
14.3	M - 分型抗血清	(146)
14.4	混浊因子分型抗血清	(149)
	参考文献	(152)

或皮肤感染之后,风湿热仅发生在咽喉感染之后。在许多发展中国家,风湿性心脏病是一个主要的公共卫生问题^[2]。虽然在经济发达国家的人口中,它已经变得相对地少见,但风湿热的散在发病,局部暴发确有发生,并提醒人们,A 群链球菌的感染将继续威胁着人们的身体健康。

A 群链球菌是急性细菌性咽炎的主要病因^[4],如果可能的话,单独根据临床症状和体征将链球菌咽炎和非链球菌咽炎区别开来是困难的,因此,可靠的细菌学鉴定方法对于准确的诊断和合适的治疗是必不可少的,适量的抗生素治疗基本上可以除去风湿热的危险,或许能减少化脓性并发症的发生率,加速恢复(如果早期开始)并可预防进一步传播或感染的扩散。

必须记住,急性风湿热或链球菌感染后急性肾小球肾炎的准确诊断需要 A 群链球菌在先感染的证据,但采用血清学方法来证明抗链球菌抗体的升高是最好手段;虽然,抗体的测定临床上在疾病的早期对于诊断可能是没有用的。

1.2 A 群链球菌的结构和抗原成分

A 群链球菌的细胞结构包括几种重要的成分,最外层是由透明质酸组成的荚膜,链球菌在荚膜产生的数量上和自身产生的透明质酸酶方面有很大的差别,其透明质酸酶可破坏荚膜。链球菌的细胞壁在荚膜缺乏时是最外层,细胞壁外有毛发样突起或伞状突起,它是由 M、T 和 R 蛋白抗原以及脂磷壁酸组成。R 或 T 蛋白,虽然它们是非常有用的流行病学标志,但它们的生物学功能仍不清楚。研究显示,脂磷壁酸容易使 A 群链球菌粘附在粘膜上,M 蛋白是 A 群链球菌的主要毒性因子,它具有保护 A 群链球菌避免吞噬细胞的吞噬作用。在 Lancefield 分类表中,根据 M 蛋白的抗原性不同,有 80 个血清型已被正式认可。除此之外,已描述了许多暂时的 M 型,并且许多菌株,携带仍没有被赋予特性的 M 蛋白,

其特性仍然不清,抗 M 蛋白的抗体与型特异性免疫有关,链球菌 M 蛋白的模型见图 1。

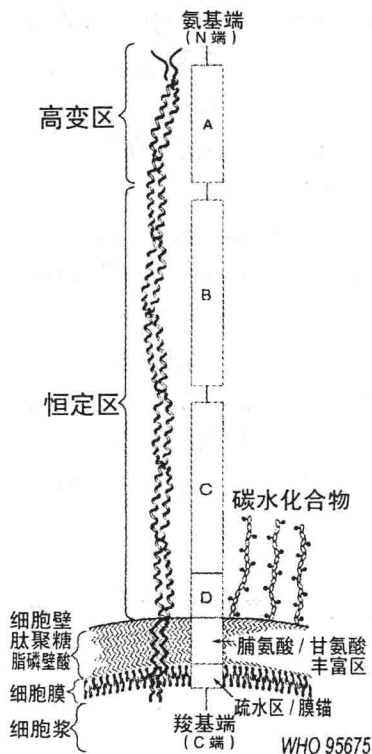


图1 链球菌 M 蛋白的推荐模型(5)

被盘绕的卷曲 M 蛋白的羧基端(C 端)作为膜锚固定在细胞膜上,从膜锚区伸向氨基端(N 端),M 蛋白是由埋置在细胞壁中的丰富的脯氨酸/甘氨酸区所组成,后面有四个区由重复的氨基酸组成(被命名为 A-D),在不同的 M 蛋白中 B-D 区的氨基酸序列显示出高度的恒定性,而 A 区(N 端的一短的氨基酸序列)是高变区,并认为每一种 M 蛋白分子是不同的^[6,7]。混浊因子(OF)是一种与某些 M 蛋白血清型有关的一种具抗原性的型特异性酶。它能使不同的哺乳动物血清产生混浊,并能被用来鉴定某些 M 型。目前,至少有 27 种被正式认可的 M 型被

认为能产生混浊因子,但是确实有许多特性还没搞清楚。

细胞壁本身(细胞骨架)由肽聚糖(由短肽交叉连接的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸的重复单位构成)和 C 多糖(由 N-乙酰葡萄糖胺和鼠李糖多聚体构成)组成,血清学分群由具抗原性的这种 C 多糖结构来决定。在目前的 A 群链球菌的常规分类上,胞浆膜(细胞壁下)和胞浆本身的抗原未被利用。

A 群链球菌产生许多毒素和酶,其中有具有抗原性的链球菌致热外毒素(即红疹毒素,有 A、B、C 三个血清型),引起猩红热皮疹。链球菌溶血素 S,是一种氧(O_2)稳定性,非抗原性的毒素,它是在需氧培养的血琼脂平板表面生长的链球菌菌落周围产生溶血环的重要原因。链球菌溶血素 O 是一种可逆转的对氧不稳定的具有心肌毒性作用的细胞毒溶血素,因为这种溶血素在氧存在时不具有溶血活性,因此表现为在需氧培养的平板上菌落生长在刺入琼脂的亚表面,它可刺激机体产生抗链球菌溶血素 O 的抗体,这种抗体被用来作为诊断感染的依据。其他的细胞外抗原如脱氧核糖核酸酶 B(DNA 酶 B)、透明质酸酶、链激酶、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸酶(NAD 酶)刺激机体所产生的抗体,和细胞壁碳水化合物的抗体及抗多糖类的抗体也被用于实验室试验的诊断之中。用于证实 A 群链球菌感染最常用的抗体试验是抗链球菌溶血素 O 和抗 DNA 酶 B,这两种试验的试剂有商品供应。另一种是抗透明质酸酶试验。

(黄慧 译 / 唐由凯 游洪波 校)

2. 标本的收集和运送

2.1 标本的收集

用药棉或合成纤维制成的拭子从咽喉、鼻、皮肤损伤处、伤口或其他受感染的人体部位收集标本,如果受感染部位或损伤处自身不湿润,拭子在使用前应该用无菌水或盐水弄湿。

咽喉部采样,用拭子准确地地在两侧扁桃腺上(或扁桃腺凹窝)和咽后壁上轻微施加压力,很快地擦拭,拭子应避免太多的唾液污染,因为已经观察到唾液中口腔微生物的存在能竞争抑制 A 群链球菌的生长,拭子取材最好在直视下完成,并借助压舌板来完成,如果有渗出物存在,应采取渗出物。

鼻部采样,应将拭子插入每一侧的前鼻孔,在其内面周围擦拭。采取咽喉标本和鼻拭子无论什么时候都是很方便的,这对于检测上呼吸道少量的 A 群链球菌是重要的。在特殊的流行病学环境(例如在医院中流行),A 群链球菌可以从携带者的直肠、肛门周围或阴道排出^[8,9],因此,当怀疑这些部位有感染时,对这些部位取样可能是必要的。

从皮肤损伤和伤口处能收集到浆液性材料,对皮肤上的囊泡在用 70% 乙醇消毒之后并采用无菌穿刺术取样。对脓疱病结痂的病例,用 70% 的乙醇擦拭皮损处,再用无菌针头,无菌操作移去脓痂,并用一弄湿的拭子在皮损部取样。据报告另一种方法是成功的,其方法是在原位置保留结痂,在结痂的两侧边缘用手指拉长皮肤,以便从结痂下面取一小滴脓性材料,这一小滴脓材料应被收集在干拭子的尖端上,拭子不应接触皮肤,在这个程序之前清洁皮损处认为是不必要的。不管使用什么方法,其目的是从新鲜的皮损处更好地获取材料,以便进行链球菌的纯培养。较久的皮损处常常含有链球菌和葡萄球菌。

因为丹毒有一完整无损的表面,所以可以尝试从主要皮损的

边缘进行针头吸引术,方法为皮内注射小量(0.1ml)无菌生理盐水进入皮损部位的区域并立即抽取该液体反回到注射器中,然而,使用这种技术获取 A 群链球菌的成功率是相当低的,因为被回收的液体量少,所以,将标本接种于血琼脂培养平板上或注入营养丰富的液体培养基中,如血清肉汤或血液肉汤,能够获得满意效果,对于大泡的丹毒,在清洁后,应将水泡液吸入注射器中。

对于扁桃体周围脓肿,化脓性淋巴腺炎、鼻窦炎、中耳炎、骨髓炎或其他局部 A 群链球菌感染的病例,采取标本的标准方法是用注射器抽取标本吸入注射器中。

2.2 运送标本至实验室

在标本收集和实验室检查标本之间的任何延迟都将可能增加假阴性结果,最好是将标本立即接种到血琼脂平板上。如果要耽搁几小时的话(时间限定取决于所用拭子材料的特性,环境因素和营养基质)应该使用一种运送培养基(例如 Stuart · s 培养基)、滤纸条法或硅土凝胶运输系统。

2.2.1 运输培养基

不能立即接种的标本,推荐使用一种运输培养基以防止链球菌丧失活力,如果接种延迟 48 小时以上可使用分别在 2.2.2 部分和 2.2.3 部分所描述的滤纸条法或硅土凝胶法。所使用的 Stuart · s 运输培养基培养运输系统有商品供应,已经成功地使用了许多年,按照下述方法在实验室也能制备出 Stuart · s 培养基^[10]。

设备和用品

- 带螺旋帽的试管。
- pH 计或 pH 试纸。
- 高压灭菌锅。

试剂

——厌氧盐溶液

无氯(除离子)蒸馏水	900ml
10% 氯化钙水溶液	20ml
20% 甘油磷酸钠水溶液	100ml
1mol/L 氢氧化钠(调至 pH 至 7.2)	12 ~ 15ml
巯基乙酸	2ml

——琼脂溶液

无氯(除离子)蒸馏水	1000ml
琼脂	6g

——0.1% 美蓝水溶液

4ml

方法

1. 混合厌氧盐溶液各成分,加入足够的氢氧化钠,调 pH 大约至 7.2。

2. 融化琼脂将其加入到厌氧盐液中。

3. 检验 pH,如果必要,调 pH 至 7.3 ~ 7.4。

4. 加入 4ml 美蓝溶液并充分混合。

5. 分装至带螺旋帽的试管中(几乎装满试管)并高压灭菌 121℃, 15min, 高压灭菌后冷却,培养基应该呈无色。

6. 使用时,应将咽喉拭子插入此种培养基中,折断或切断拭子杆并用螺旋帽封紧试管口,迅速送往实验室。

2.2.2 滤纸条法

在一滤纸条上使标本干燥并维持标本在干燥状态之中,能延长 A 群链球菌的生命力^[11-13]。在标本中维持这些细菌相对优势率和剩余的菌群也是必要的,在随后的滤纸条培养在血琼脂平板

表面的过程中,应将滤纸条用营养液完全浸透。细菌生长在滤纸条和含有薄层肉汤的琼脂表面之间,在这些条件下,即使微弱的 A 群链球菌菌株也常常产生明显的溶血。

滤纸条的制备

设备和用品

——将滤纸(例如 Whatman 1 号)切成 $2 \times 6\text{cm}$ 大小的滤纸条。

——将玻璃纸(非吸水纸,耐蒸汽消毒)切成 $3 \times 13\text{cm}$ 大小的玻璃纸条。

——铝箔, 0.015mm 厚,大小 $10 \times 20\text{cm}$,并在二分之一处折叠使其成双层。

方法

1. 用铅笔在滤纸条的一面作上记号。
2. 在将近一半处折叠玻璃纸,留出稍微长一点的上边,以便用手指打开没有被污染的滤纸条。
3. 将滤纸条插入被折叠的玻璃纸中,使铅笔标记面对着较短面。
4. 将在铝箔中装有滤纸的玻璃纸包起来,以便铝箔的封闭处在滤纸的平坦面。
5. 高压灭菌被包起来的铝箔小包 121°C , 30min 。
6. 高压灭菌后,在使用前,要让滤纸条用品完全干燥。
7. 假若被消毒灭菌的滤纸用品保持完全干燥,那么,它们可以使用许多年,不需要再消毒灭菌。

运送标本到滤纸上

设备和用品