

性传播疾病的 实验室诊断

Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases

E. Van Dyck
A.Z. Meheus 著
P. Piot

陈祥生
尹跃平 等译
王千秋
徐文严 校



人民卫生出版社



世界卫生组织

性传播疾病的实验室诊断

人民卫生出版社
世界卫生组织

性传播疾病的实验室诊断

Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases

E. Van Dyck A.Z. Meheus P. Piot 著

陈祥生 尹跃平 王千秋 赖伟红 侯 伟 译

徐文严 校



人 民 卫 生 出 版 社

世界卫生组织委托中华人民共和国卫生部
由人民卫生出版社出版本书中文版



图书在版编目 (CIP) 数据

性传播疾病的实验室诊断 / 范戴克 (Van Dyck, E.) 等著;
陈祥生等译. - 北京: 人民卫生出版社, 2001

ISBN 7-117-04428-4

I. 性... II. ①范... ②陈... III. 性病—实验室诊断
IV. R759.04

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 039330 号

© 世界卫生组织 1999

根据《世界版权公约》第二条规定, 世界卫生组织出版物享有版权保护。版权所有, 不许翻印。

本书采用的名称和陈述材料, 并不代表世界卫生组织秘书处关于任何国家、领土、城市或地区或其权限的合法地位, 或关于边界或分界线划定的任何意见。

本书提及某些专业公司或某些制造商号的产品, 并不意味着它们与其他未提及的类似公司或产品相比较, 已被世界卫生组织所认可或推荐。为避免差讹和遗漏, 专利产品第一个字母均用大写字母以示区别。

性传播疾病的实验室诊断

译者: 陈祥生等

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

印刷: 北京人卫印刷厂

经销: 新华书店

开本: 889×1194 1/16 印张: 8.75

字数: 161 千字

版次: 2001 年 9 月第 1 版 2001 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-04428-4/R·4429

定价: 77.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

性传播疾病的实验室诊断

原著:

E. Van Dyck

热带医学研究所, 比利时安特卫普

A.Z. Meheus

安特卫普大学, 比利时安特卫普

P. Piot

联合国艾滋病规划署, 瑞士日内瓦

翻译:

陈祥生 尹跃平 王千秋 赖伟红 侯 伟

中国医学科学院/中国协和医科大学 皮肤病研究所

全国性病麻风病控制中心, 南京

审校:

徐文严

中国医学科学院/中国协和医科大学 皮肤病研究所

全国性病麻风病控制中心, 南京

前 言

性传播性疾病(STD)在全球已成为最常见的疾病之一,在发展中国家已被列入成年人寻求医疗服务的前十位。STD是一项重要的公共卫生问题,不仅由于其严重的并发症和后遗症,而且因为这些疾病增加了人类免疫缺陷病毒(HIV)传播的危险性。

控制 STD 的公共卫生策略包括一级预防(安全性行为和促进避孕套的应用),以及对细菌性 STD 感染者进行早期充分的病例管理。

对 STD 患者提供可及的、可接受的和有效的处理将意味着通过遵循基于病征诊断的流程图(步骤图)进行合理的决策,同时开展性伴通知、促进避孕套的应用和安全性行为的实施。

从传统上来看,实验室已经在STD控制规划中发挥了重要的作用。然而,由于在费用、专业技术方面的限制,以及物资供应和其他支持方面存在的不协调,实验室服务的实用性和可提供性在许多(即使不是绝大多数)人群中受到了严重的局限。

实验室的检测只是在对临床诊断和规划决策有必要的情况下应用。重点包括:

- 监测淋球菌耐药(在适当的情况下也用于监测杜克雷嗜血杆菌的耐药)以支持治疗方案的推荐;
- 确定常见 STD 病征的病原体,用于制定病征处理的流程图;
- 在参比中心用于对并发症病人或转诊病人的诊断;
- 在孕妇和患有其他 STD 的病人中用于梅毒和 HIV 感染的病例发现;以及
- 开展献血人员的梅毒和 HIV 感染的筛查。

在实验室能力有剩余的情况下,最好能够在女性中开展淋病和衣原体感染的诊断及病例发现工作,因为这两种感染的病征诊断最不敏感和特异。

HIV感染和获得性免疫缺陷综合征(AIDS)受到了全球各地卫生保健工作者的高度关注。实验室服务在感染者的诊断、输血筛查、监测及研究方面具有重要的作用。

本手册作为检测与诊断 STD 标准方法的综合性指南,是临床微生物学工

作者和医学技术人员的有用工具。作为一本实用的实验室手册, 本书适用于卫生服务系统中不同层次实验室的需求和能力。

每种疾病都以独立的章节进行描述, 详细内容包括合适的标本收集与运送, 以及这些标本后来的实验室检测。附录中列出了不同层次实验室体系中适当的检测方法, 以及开展这些检测所需要的培养基、试剂、染色剂及其他设备和消耗性材料。¹

(陈祥生 译 徐文严 校)

¹ 在某些情况下, 本书在提及诊断检测方法、材料、试剂和培养基时使用了生产厂家的名称或商标。然而, 这并不意味着这些检测方法和产品比其他未提及或本书撰写后才开发或出现的同类产品优先得到 WHO 及作者的认可和推荐。而这些提及的检测方法和产品是那些被作者认为是常用的方法和产品。如果还有其他常用的方法与产品, 请通知 WHO, 以便将其应用的内容写入本书未来的版本中。

致 谢

照片的翻印得到了比利时安特卫普热带医学研究所微生物分部的同意, 谨对下列人员表示由衷的感谢:

C. de Vroey, 比利时安特卫普热带医学研究所微生物分部

G. Ieven, 比利时安特卫普大学医院临床微生物学科

M. Lontie, 比利时卢万全科医生医学中心

E. Stolz 和 J. van der Stek, 荷兰鹿特丹 Dijkzigt 皮肤病学与性病学科

目 录

前言	ix
致谢	xi
第1章 淋病	1
1.1 引言	1
1.2 标本的采集	1
1.3 标本的运送	2
1.4 显微镜检查	3
1.5 培养和推断性鉴定	4
1.6 确证鉴定	6
1.7 非培养检测方法	9
1.8 血清学试验	10
1.9 质粒介导的抗生素耐药检测	10
1.10 抗菌药物敏感性试验	12
1.11 分离菌株的保存	17
1.12 参考文献	17
1.13 选择性读物	19
第2章 沙眼衣原体感染	20
2.1 引言	20
2.2 标本的采集和运送	21
2.3 培养	22
2.4 非培养检测法	25
2.5 血清学试验	28
2.6 沙眼衣原体的免疫分型	30
2.7 抗菌药物敏感性试验	30
2.8 菌种保存	30
2.9 参考文献	30
2.10 选择性读物	32
第3章 梅毒	34
3.1 引言	34
3.2 显微镜检查	35
3.3 血清学试验	37
3.4 血清学试验步骤	39
3.5 参考文献	45

3.6 选择性读物	46
第4章 生殖器疱疹	47
4.1 引言	47
4.2 标本的采集和运送	47
4.3 培养	48
4.4 非培养检测方法	50
4.5 血清学试验	51
4.6 参考文献	52
4.7 选择性读物	53
第5章 软下疳	54
5.1 引言	54
5.2 标本的采集和运送	54
5.3 显微镜检查与非培养检测方法	55
5.4 分离和鉴定	55
5.5 血清学试验	58
5.6 抗菌药物敏感性试验	59
5.7 分离株的保存	61
5.8 参考文献	61
5.9 选择性读物	62
第6章 腹股沟肉芽肿	64
6.1 引言	64
6.2 标本的采集	64
6.3 显微镜检查	64
6.4 组织病理学检查	65
6.5 培养和免疫学检查	65
6.6 参考文献	66
6.7 选择性读物	66
第7章 成人阴道炎	67
A. 念珠菌病	67
7.1 引言	67
7.2 标本的采集	67
7.3 直接显微镜检查	68
7.4 培养	68
B. 毛滴虫病	69
7.5 引言	69
7.6 标本的采集	70
7.7 直接显微镜检查	70
7.8 培养	71

7.9 非培养的诊断方法	71
C. 细菌性阴道病	71
7.10 引言	71
7.11 临床诊断	71
7.12 实验室检查方法	73
7.13 参考文献	76
7.14 选择性读物	76
第8章 人类乳头瘤病毒感染	77
8.1 引言	77
8.2 标本的采集	77
8.3 实验室检查方法	78
8.4 HPV 检测的意义	78
8.5 参考文献	79
8.6 选择性读物	79
第9章 人类免疫缺陷病毒	80
9.1 引言	80
9.2 血清学筛查方法	81
9.3 血清学补充试验	83
9.4 HIV 抗原检测	86
9.5 前病毒 DNA 检测方法	86
9.6 UNAIDS 和 WHO 推荐的抗体检测方法的选择和应用	87
9.7 参考文献	91
9.8 选择性读物	91
附件1 不同层次实验室体系合适的诊断方法	92
附件2 培养基、试剂和染色剂	95
附件3 实验室用品	108

第1章 淋病

1.1 引言

淋病是一种古老的疾病,几乎都是通过性接触传播的。其病原菌、淋病奈瑟菌(淋球菌)只感染人类,是引起女性下泌尿生殖道感染、盆腔炎及相关的后遗症(不孕症和异位妊娠);男性尿道炎、附睾炎以及男女性直肠炎、咽炎、结膜炎和播散性感染的病原菌。淋球菌感染的临床谱概括于表1.1。

表 1.1 淋球菌感染的临床病谱

无症状性感染	宫颈内膜
	咽部
	直肠
	尿道
症状性感染	前庭大腺炎
	宫颈炎
	结膜炎
	咽炎
	直肠炎
	尿道炎
	外阴阴道炎
局部并发症	前庭大腺脓肿
	附睾炎
	淋巴管炎
	阴茎水肿
	尿道周围脓肿
	前列腺炎
	输卵管炎(盆腔炎)
系统性并发症	播散性淋球菌感染:
	- 关节炎
	- 皮炎
	- 腱鞘炎

淋病产生脓性渗出物。然而,可以不出现症状和体征,或症状与体征无法与衣原体感染区别。因此,需要通过实验室检查来进行诊断、发现病例及治愈。

1.2 标本的采集

标本采集的合适部位取决于感染者的性别、年龄和性活动的方式以及感染的临床表现。在女性中采集标本的主要部位是宫颈内管,其次是尿道、直肠、

阴道和口咽。对异性恋男性，应该从尿道采集标本。对同性恋男性，采集标本的主要部位是尿道、直肠和口咽。无菌的棉拭子、藻酸钙或聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）拭子都可用于采集标本。

宫颈内膜 在采集标本时，应避免使用防腐剂、止痛剂和润滑剂，因为这些物质可能对宫颈的淋球菌有抑制作用，使用窥阴器时，可用温水湿润。在窥阴器插入阴道以后，用镊子夹一块纱布或棉球清洗宫颈外以除去粘液。将拭子插入宫颈管2cm处，从一边到另一边轻轻旋转拭子5~10秒钟，以便吸收渗出物。

尿道 取尿道标本至少要在患者排尿后1小时进行。将脓液直接采集到拭子上。如果男性尿道分泌物不明显，可从尿道根部向尿道口挤压渗出物。如果得不到渗出物，可用一根细的棉拭子插入尿道2~3cm，通过旋转拭子5~10秒，轻轻刮取粘液。对女性，朝耻骨联合方向按摩尿道，然后用与男性相同的方法采集标本。

直肠 用一根棉拭子插入肛管内3cm，旋转10秒采集肛门内隐窝处的渗出物。如果有粪便污染，弃去拭子，换一根重取标本。

阴道 对子宫切除的女性和青春期前的女童，推荐取阴道标本。使用窥阴器，然后用棉拭子在后穹隆处吸取标本数秒钟。淋球菌性外阴阴道炎可发生在青春期前的女孩，可用棉拭子采集分泌物，不用窥阴器。

口咽 用拭子采集扁桃体隐窝和咽后壁处的标本。

1.3 标本的运送

在将标本直接接种到培养基以前，或放进运送培养基以前，应作涂片显微镜检查。为了获得薄而均匀的涂片，可在干净的玻片上滚动拭子，使涂片空气干燥（图1.1）。淋球菌对环境条件是高度敏感的。标本的运输（从门诊到实验室）常使淋球菌的活力下降。在诊疗室将标本直接接种到培养基，可获得最高的淋球菌产量。如果做不到的话，应将拭子插入非营养性运送培养基中，如Stuart或Amies或接种到营养性（生长）运输系统，如Transgrow⁽¹⁾或Jembec⁽²⁾。非营养性运送培养基运输的标本[室温下（20~25℃）]，6小时

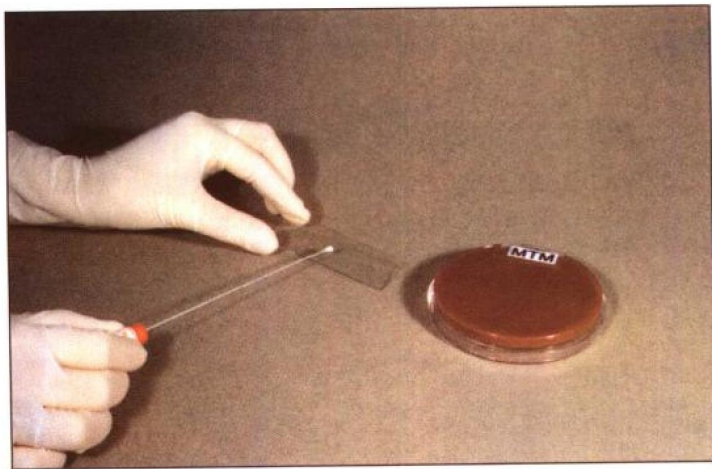


图 1.1
在接种到培养基上以前，
制备显微镜镜检涂片

以内的分离率大约为100%，12小时以内的分离率大约在90%以上。然而，超过24小时，淋球菌的数量减少，不能再分离到，特别是来自无症状患者的标本（仅有少量的淋球菌）。当运输时间估计要12小时以上时，营养性运输系统（有培养基和提供含二氧化碳的环境）是需要的。在运输到实验室以前，标本在运送培养基中，36℃过夜预培养，可使淋球菌的存活和分离率最大。如果运输时间不超过2天，可获得可接受的结果⁽³⁾。

1.4 显微镜检查

染色涂片的制备

涂片面朝上，快速通过火焰3次，固定涂片。避免过热（使细胞扭曲），当玻片触到手腕背时，只感到温热。

对男性化脓性尿道炎患者，用美蓝（图1.2）或番红染色，除了简单快速以外，也是诊断淋病的一种可靠的方法。然而，革兰氏染色仍然是显微镜下诊断淋病奈瑟菌的选择方法。因为，对含有混合菌丛的标本，要获得可靠、特异的结果，鉴别革兰氏阳性和阴性菌是重要的（图1.3）。

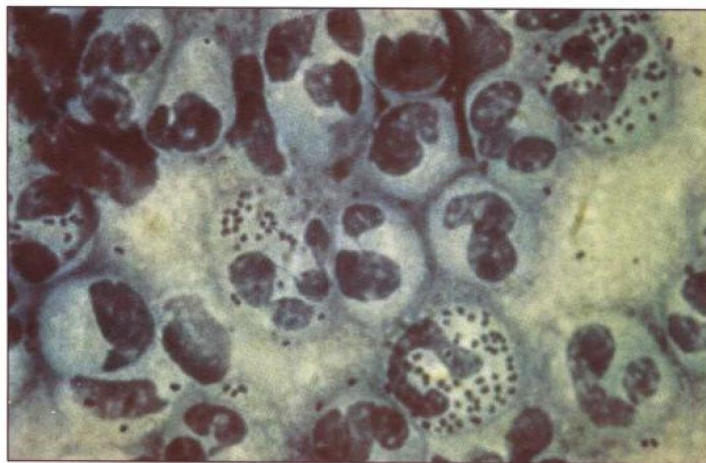


图 1.2
男性尿道渗出物美蓝染色显示细胞内双球菌
(1000x)

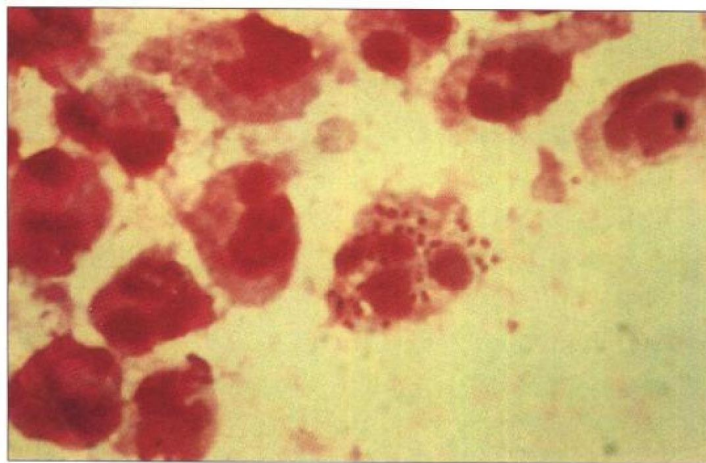


图 1.3
男性尿道渗出物革兰氏染色显示细胞内革兰氏阴性双球菌 (1000x)

革兰氏染色步骤

- (1) 用结晶紫染液覆盖固定好的涂片1分钟，自来水漂洗。
- (2) 用碘染液覆盖玻片1分钟，用流水轻轻漂洗。
- (3) 用丙酮-乙醇脱色，直至玻片上滴下的水珠不再是蓝色。这常常需时10~20秒。取决于涂片的厚度。必须避免过度脱色，以免革兰氏阳性菌看上去像革兰氏阴性菌。可忽略不均匀涂片厚的部分，后者可能染成蓝色。
- (4) 用流水快速漂洗，终止脱色。吸干过多的水。
- (5) 用番红或复红染液复染1分钟。
- (6) 用流水漂洗，用吸水纸轻轻地吸干玻片。

读片与结果解释

用亮光源的显微镜、优质的油镜和100倍的物镜观察。淋球菌表现为多型核白细胞内的革兰氏阴性双球菌。要精确描述涂片中所见：上皮细胞、多型核白细胞、细菌的类型、位于细胞内或细胞外。一张涂片，在作出不含任何细胞内革兰氏阴性双球菌的结论以前，至少应该观察2分钟。

假设涂片的制备、染色、观察都是正确的话，对来自有症状男性患者的尿道渗出物培养阳性的标本，革兰氏染色的特异性和敏感性分别为95%和97%，因此，对革兰氏染色涂片阳性的标本，并不是一定要作培养。然而，对女性宫颈分泌物涂片只能检出培养阳性标本的40%~60%。对无症状的男、女性患者，革兰氏染色的敏感性是极低的，因此在这种情况下，不考虑它作为一个诊断试验。在女性，已报道有一定比率的假阳性结果。特异性在80%~95%之间，主要取决于镜检者的经验。直接镜检不推荐用于诊断直肠和口咽感染。它对淋球菌性尿道炎治疗判愈的敏感性也太低。

1.5 培养和推断性鉴定

淋球菌的分离

培养对淋病诊断的可靠性取决于一系列的因素：

- 取材部位的数目；
- 采集标本的技术；
- 运送的方法及时间的长短；
- 培养基的成分和质量；
- 孵育的条件；
- 用于鉴定分离株的试剂和技术。

在大多数国家中，对选择性培养基中通常使用的抗生素浓度敏感的淋球菌株流行率是可以忽视的。因此只推荐用选择性培养基如改良的Thayer-Martin (MTM)⁽⁴⁾ 和New York City (CYC)⁽⁵⁾ 用于常规淋病诊断。可以通过淋球菌株在特定化学成分培养基上（含有不同组合的某些氨基酸、嘌呤或嘧啶）的生长能力来鉴别它们⁽⁶⁾。需要精氨酸、次黄嘌呤及尿嘧啶才能生长的菌株称AHU⁻。在某些地区，高达5%的淋球菌（通常为AHU⁻营养型）对选择性

培养基中使用的3~4mg/L浓度的万古霉素敏感⁽⁷⁾，因此推荐使用低浓度的万古霉素(2mg/L)或用林可霉素替代。

在平皿大约1/4的表面上滚动蘸有标本的棉拭子(图1.4)。用无菌的细菌接种环，将接种物在培养基的其余部分展开，以确保分离的菌落生长。将接种的培养皿立即置于35~36℃，含3%~7%二氧化碳(CO₂)的潮湿环境中(70%湿度)(放置有湿棉球的烛缸或有产CO₂的气袋的缸或在有水瓶的CO₂孵箱)中孵育(图1.5)。18~24小时后检查平皿，如果阴性，再过48小时后检查。在孵育一天后，典型的菌落为直径0.5~1mm，颜色从灰色到白色，透明到不透明，球面到扁平。进一步孵育以后，直径可达3mm，变得较不光滑(图1.6)。通常，在一个平皿上有不同形态的菌落。

培养基的质量控制

平皿中应有一层厚的培养基，每个平皿(直径90mm)中至少有20ml的培养基。制备培养基后，将平皿置室温中过夜，或将平皿半开盖倒置、35~37℃孵育1小时，以使表面不至于过度的潮湿，但应避免过度的干燥，后者会干扰淋球菌的生长。培养基(置密封的塑料袋中)在冰箱中最多能存放3周。



图1.4
在培养基上1/4的表面
滚动棉拭接种



图1.5
装淋球菌培养皿的合适
罐子



图 1.6
在巧克力琼脂上，淋病
奈瑟菌的典型菌落

放置时间过久的平皿对淋球菌的培养效果不好。接种时，不应该将接种物直接接种到刚从冰箱拿出的冷平皿上。

最好，应检查每一批培养基淋球菌的生长能力。一个简单有效的方法是将男性尿道渗出物革兰氏染色涂片的结果和同一标本的培养结果进行比较。

推断性鉴定

用革兰氏染色和氧化酶试验可对呈淋球菌样外观的菌落作出推断性鉴定。在生殖器标本中，观察到淋球菌样菌落形态、氧化酶试验阳性的革兰氏阴性双球菌时，则为常规诊断淋病奈瑟菌提供了足够的及可靠的鉴定依据。

- **革兰氏染色** 在玻片上用一滴盐水将单个可疑的菌落制成乳状液，干燥、固定、染色。在 24 小时后，培养物显示有典型的革兰氏阴性双球菌，而时间过长的培养物（48 小时或以上），则因为细胞溶解比率高结果常常很难解释。
- **氧化酶试验** 有两种推荐的方法用于检测细胞色素 C 氧化酶。
 - (1) 将一滴盐酸四甲基对苯二胺直接滴到菌落上，如果试剂的颜色快速变为深紫色，且持续 30 秒以上，这个试验就被认为是阳性（图 1.7）。另一种方法是滴几滴试剂在一张滤纸上，然后用接种环挑一个菌落生长物涂在含试剂的滤纸上。
 - (2) 已有商品化的氧化酶圆纸片或纸条（含有盐酸二甲基对苯二胺）。挑一个可疑的菌落，涂在圆纸片或纸条上。阳性反应是在 20 秒内，将纸片变成紫色。

注：用镍铬合金替代白金接种环时可引起假阳性弱颜色改变。

1.6 确证鉴定

对所有生殖器外的分离菌株以及所有需要进一步分型和/或作药敏试验的分离株的氧化酶阳性的革兰氏阴性双球菌，必须进行确证鉴定⁽⁸⁾。



图 1.7
用盐酸四甲基对苯二胺
处理后, 氧化酶阳性的
紫色菌落

碳水化合物降解试验

确证鉴定最常用的试验是碳水化合物降解。由于用快速非生长方法可以获得更满意的结果, 可以在几小时以内得出更清楚的和更特异的结果, 所以不再推荐用胱氨酸胰酶琼脂 (CTA)⁽⁹⁾ 的常规生长方法⁽¹⁰⁻¹³⁾。

所有碳水化合物降解试验面临的一个最重要问题是由于其他细菌污染引起的假阳性反应, 以及培养物中自体溶解的细菌 (培养时间 > 24 小时) 引起的假阴性反应。为避免这些问题, 不要用初次选择性分离皿上的生长物, 因为它可能含有其他微生物菌落和被抑制的污染菌。而应该进行次代培养, 将几个典型的菌落转种到 1 或 2 个非选择性巧克力琼脂或 Columbia 血琼脂皿上, 孵育 18 ~ 24 小时。在进行试验前, 仔细检查次代培养的皿, 以确定培养物是纯的, 没有污染 (如果需要的话, 可作革兰氏染色检查)。

由 Kellogg 和 Turner 建立⁽¹⁰⁾, 以后由 Brown 改良⁽¹¹⁾ 的第一个非生长方法仍然是很满意的。用 3mm 的接种环加两满环分离物到一个小的无菌试管中, 该管含 0.3 ~ 0.4ml 缓冲平衡盐指示溶液 (BBS), 使之乳化。一个完整的试验还需要 5 个小的无菌试管。在 4 个试管中, 每一根管中分别加入 0.05ml 20% 无菌葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖。然后再加 0.1ml BBS, 第 5 根管作为阴性对照, 只加 0.1ml BBS, 不加糖。最后, 在 5 个管的每一根管中加 0.05ml 菌悬液, 混匀, 37℃ 水浴箱孵育 4 小时。颜色从红变为黄被认为是阳性。对照管必须仍然保持红色。淋病奈瑟菌利用葡萄糖, 但不利用麦芽糖、蔗糖或乳糖 (表 1.2)。

表 1.2 生长在选择性培养基上的几种奈瑟菌的碳水化合物和酶活性

种	底物或酶活性						
	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	ONPG	GLU-AMP	PRO-AMP
淋病奈瑟菌	+	0	0	0	0	0	+
脑膜炎奈瑟菌	+	+	0	0	0	+	0 (+)
乳酰胺奈瑟菌	+	+	+	0	+	0	+
灰质奈瑟菌 (N.cinerea)	0	0	0	0	0	0	+

ONPG: O-硝基苯-β-半乳糖苷酶 (O-Nitrophenyl-β-galactosidase)

GLU-AMP: γ-谷氨酰氨肽酶 (γ-Glutamyl aminopeptidase)

PRO-AMP: 羟脯氨酸氨肽酶 (Hydroxyprolyl aminopeptidase)