

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 237—2016
代替 WS 237—2003

性病性淋巴肉芽肿诊断

Diagnosis of lymphogranuloma venereum

2016-11-29 发布

2017-06-01 实施

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 WS 237—2003《性病性淋巴肉芽肿诊断标准及处理原则》。

本标准与 WS 237—2003 相比,除编辑性修改外主要变化如下:

- 标准性质由强制性修改为推荐性;
- 标准名称改为“性病性淋巴肉芽肿诊断”;
- 修改了范围一章的表述(见第 1 章);
- 增加了“术语和定义”(见第 2 章);
- 将诊断标准修改为诊断依据,接触史修改为流行病学史(见第 4 章和 4.1,2003 年版的第 2 章和 2.1);
- 删除了实验室检查部分中的组织病理学检查(见 2003 年版的 2.3.2);
- 在实验室检查部分中增加核酸检测与分型鉴定(见 4.3.3);
- 将病例分类修改为诊断分类,将诊断分成二级:疑似病例和确诊病例(见第 5 章、5.1 和 5.2,2003 年版的 2.4、2.4.1 和 2.4.2);
- 删除了治疗原则部分(见 2003 年版的第 3 章);
- 删除了临床治愈部分(见 2003 年版的第 4 章);
- 删除了管理及预防部分(见 2003 年版的第 5 章);
- 删除了附录 B(规范性附录)性病性淋巴肉芽肿的治疗方案(见 2003 年版的附录 B)。

本标准起草单位:中国医学科学院皮肤病医院(研究所),复旦大学附属华山医院,湖南省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:苏晓红、龚向东、王千秋、蒋娟、齐淑贞、徐金华、陈曦。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- WS 237—2003。

性病性淋巴肉芽肿诊断

1 范围

本标准规定了性病性淋巴肉芽肿的诊断原则、诊断依据、诊断分类和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及其医务人员对性病性淋巴肉芽肿的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

性病性淋巴肉芽肿 **lymphogranuloma venereum; LGV**

由 L1、L2、L3 血清型沙眼衣原体感染生殖器、肛门直肠部位所致的,以局部化脓性淋巴结病或出血性直肠炎为主要特征的一种慢性性传播疾病。

2.2

腹股沟横痃 **inguinal buboes**

一种急性化脓性腹股沟淋巴结炎,表现为腹股沟和(或)股淋巴结疼痛性肿大。

2.3

沟槽征 **groove sign**

腹股沟韧带上方的腹股沟淋巴结和下方的股淋巴结均肿大,使皮肤呈现沟槽状。

3 诊断原则

依据流行病学史、临床表现及实验室检查进行综合分析,作出诊断。

4 诊断依据

4.1 流行病学史

有无保护性行为史,或性伴感染史,或多性伴史。

4.2 临床表现

4.2.1 早期阶段

潜伏期为 3 d~30 d,平均 7 d~10 d。感染部位出现无痛性小丘疹、丘疱疹或脓疱,很快形成糜烂或浅溃疡,常为单个,称为初疮。在 1 周内自愈,不留疤痕。皮损好发于男性的冠状沟、龟头、包皮、阴茎体等部位,女性的大小阴唇、阴道、阴唇系带或宫颈等部位。有肛交性行为者可发生直肠结肠炎,表现为肛门直肠疼痛、里急后重、黏液便或脓血便等。

4.2.2 中期阶段

在原发皮损发生后 2 周~6 周,或更晚发生。

腹股沟综合征:主要见于男性外生殖器部位感染者,常为单侧受累,表现为腹股沟疼痛性淋巴结肿大(腹股沟横痃);典型患者出现沟槽征;部分患者腹股沟淋巴结坏死、破溃或穿孔,形成窦道或排出脓液,愈后遗留瘢痕。

肛门直肠综合征:表现为直肠疼痛、腹痛、腹泻、里急后重、便秘、脓血便或便中带血等。

可出现全身症状,如不适、发热、寒战、肌痛、关节痛等,有时可出现结节性红斑或多形红斑样皮疹。

4.2.3 晚期阶段

感染 2 年后或更晚发生,表现为直肠狭窄、肛瘘、直肠阴道瘘、阴道尿道瘘、慢性直肠疼痛,生殖器象皮肿等。

4.3 实验室检查

4.3.1 血清学试验

微量免疫荧光试验(MIF)检测到高滴度的沙眼衣原体抗体($\geq 1:512$)(见附录 A)。

4.3.2 细胞培养与鉴定

从临床标本中通过细胞培养分离和鉴定出 L1、L2 或 L3 血清型沙眼衣原体(见附录 A 和附录 B)。

4.3.3 核酸检测

应用核酸扩增试验从临床标本中检测到 L1、L2 或 L3 血清型沙眼衣原体 DNA(参见附录 B)。

5 诊断分类

5.1 疑似病例

符合 4.2,同时有或无 4.1 及 4.3.1。

5.2 确诊病例

符合 5.1 的要求,并符合 4.3.2 或 4.3.3 之一者。

6 鉴别诊断

6.1 一期梅毒

生殖器部位浅表性溃疡,一般为单发,直径约 1 cm~2 cm,圆形或椭圆形,界限清楚,边缘略隆起,创面清洁;触诊基底坚韧,呈软骨样硬度,无疼痛、无触痛,称为硬下疳;伴无痛性腹股沟淋巴结肿大。溃疡面取材暗视野显微镜检查可见梅毒螺旋体,梅毒血清学试验可呈阳性。

6.2 生殖器疱疹

生殖器或肛周集簇的或散在的小水疱,继之浅表糜烂,有疼痛或灼热感;易复发;可伴腹股沟淋巴结肿大,有压痛。水疱性皮损取材 HSV 抗原、核酸检测多呈阳性。

6.3 软下疳

生殖器或肛周炎性小丘疹,1 d~2 d 后迅速变为脓疱,破溃形成疼痛性溃疡,基底柔软,边缘不整,可潜行穿凿。周围可有卫星状病变,常伴化脓性疼痛性腹股沟淋巴结炎。杜克雷嗜血杆菌培养阳性。

附录 A (规范性附录)

性病性淋巴肉芽肿相关沙眼衣原体分离和血清学检测方法

A.1 标本的采集

A.1.1 标本的采集类型与要求

应根据临床表现或分期的不同采集相应的标本,常用的标本类型主要包括溃疡面渗液、淋巴结穿刺液或活检组织、直肠拭子或直肠活检组织。沙眼衣原体为专性细胞内寄生,故做病原学检查的标本中必须含有细胞成分。血清学试验需要采集血液标本。

A.1.2 不同类型标本的采集方法

A.1.2.1 皮损标本:对生殖器部位的溃疡皮损,先用无菌棉拭子将溃疡表面的痂皮和污物擦去,用另一棉拭子从溃疡基底部或边缘取渗出液。用作培养的标本应置于运送培养液中,在 18 h 内(置湿冰上)送至实验室,或于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.1.2.2 淋巴结标本:对有波动的淋巴结,在常规清洁消毒皮肤后,用注射器从临近健康组织进针作淋巴结穿刺抽吸脓液。对无波动的肿大淋巴结,可向其中注射 1 mL 生理盐水,再从中回抽液体。也可常规手术摘除淋巴结送检。

A.1.2.3 直肠标本:对有直肠结肠炎的患者,最好能在直肠镜的直视下采集直肠黏液脓性分泌物或直肠组织。无条件时可用肛窥镜帮助取材(跨越齿状线)或盲取直肠拭子,后者是将棉拭子插入肛管内 3 cm~4 cm,向侧方用力避免接触粪团,从紧靠肛环边的隐窝中转动 10 s 采集分泌物。由于直肠标本在培养时可出现污染和细胞毒作用,建议接种前进行超声波处理。

A.1.2.4 静脉血标本:从肘静脉穿刺采集 5 mL 血液,将血液注入不含抗凝剂的干燥清洁的试管中,待血液凝固后,1 200 r/min,离心 10 min,分离血清备用。

A.2 微量免疫荧光试验(MIF)

A.2.1 材料

包括 L 型沙眼衣原体在内的各型沙眼衣原体抗原。FITC 标记的抗人免疫球蛋白 IgG。

A.2.2 试验步骤

A.2.2.1 将各型抗原按一定的排列顺序点于玻片上,置空气中干燥 30 min,用丙酮固定 10 min。

A.2.2.2 将对倍稀释的血清(1:8 以上)10 μL 加于各组抗原点上。将涂片置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度孵育 30 min,每张玻片用磷酸盐缓冲液(PBS)淋洗 4 遍,蒸馏水洗 3 遍,置室温干燥。

A.2.2.3 将荧光素标记的抗人免疫球蛋白(IgG)10 μL 加于抗原点上,再经孵育、淋洗和干燥。

A.2.2.4 抗原点上加 1 滴甘油 PBS 固封剂,覆以盖玻片,在荧光显微镜下观察结果,检查每个抗原点上是否有特异性荧光。

A.2.3 结果判断

反应终点判断为抗原点上出现明显荧光的最高血清稀释度。与最高稀释度的血清呈现阳性反应的

抗原型即为感染的沙眼衣原体血清型。

A.2.4 临床意义

L型沙眼衣原体感染具有侵袭性,所诱发的血清抗体滴度较非L型沙眼衣原体感染时的滴度明显升高。有症状的患者,MIF的滴度 $\geq 1:512$ (IgG)时对LGV有诊断意义;但低滴度时不能排除LGV,高滴度在缺乏症状情况下也不能证实LGV。

A.2.5 注意事项

在试验前抗原需进行预滴定,使最高稀释度的抗原获得强的特异性染色。以PBS制备抗原工作液,用滤膜过滤($0.45\ \mu\text{m}$)或离心($1\ 500\times g, 4\ ^\circ\text{C}, 30\ \text{min}$)进行澄清。

A.3 细胞培养

A.3.1 标本的预处理

将标本(拭子、抽吸液或刮取物等)从 $-70\ ^\circ\text{C}$ 取出,置 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴中振摇,融化。在旋涡振荡器上振荡30 s,无菌条件下取出拭子并弃之。直肠标本因含大量的杂菌,做衣原体培养前应先应用抗生素(包括庆大霉素、万古霉素、链霉素和制霉菌素)作预处理。淋巴结抽吸液先以生长培养基做1:10稀释,以减少对衣原体的可能毒性作用。

A.3.2 材料与试剂

A.3.2.1 细胞生长培养液

每1 000 mL中含RPMI 1640 16.4 g,胎牛血清10%,庆大霉素 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$,万古霉素 $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$,制霉菌素 $25\ \text{U}/\text{mL}$,HEPES $10\ \text{mmol}/\text{L}$,L-谷氨酰胺 $2\ \text{mmol}/\text{L}$,用碳酸氢钠调节pH至7.2。正压过滤除菌, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

A.3.2.2 运送培养液

每1 000 mL细胞生长培养液另加葡萄糖3.5 g。

A.3.2.3 分离培养液

细胞生长培养液加入放线菌酮(环己亚胺),终浓度为 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

A.3.2.4 无钙镁 PBS

每100 mL双蒸水中加NaCl 8.0 g,KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g。

A.3.2.5 胰蛋白酶-EDTA液

每200 mL无钙镁PBS中,加胰蛋白酶0.1 g,EDTA $\cdot\text{Na}_4$ 0.04 g。

A.3.2.6 碘染色液

每50 mL蒸馏水中,加KI 5.0 g,结晶紫 5.0 g,甲醇 50 mL。

A.3.2.7 碘甘油封固液

等量碘染色液与甘油混合。

A.3.2.8 吉姆萨染液

每 50 mL 甘油中加吉姆萨染料 600 mg, 加热溶解后再加甲醇 50 mL, 过滤后保存于棕色瓶中(贮存液)。取 1 mL 贮存液加 19 mL pH 7.4 磷酸缓冲液即成工作液。

A.3.3 操作方法

A.3.3.1 细胞单层的制备

常用的敏感细胞株有 McCoy、HeLa229 或 BHK-21 细胞等, 最常用的是经放线菌酮处理的单层 McCoy 细胞。McCoy 细胞单层制备操作步骤:

- 将 McCoy 细胞从液氮中取出, 置 37 °C 水浴中迅速融化;
- 将其加入已含有 10 mL 细胞生长培养液的 25 cm² 培养瓶中, 37 °C 孵育 8 h, 待细胞贴壁后更换新鲜生长培养液;
- 继续在 37 °C 培养 2 d~3 d, 直至细胞融合成单层;
- 吸去培养液, 用少量胰蛋白酶溶液清洗单层;
- 加 2 mL~3 mL 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化单层, 室温中孵育 2 min~3 min, 让细胞完全离散;
- 加入 10 mL 生长培养基, 吹打细胞使之混悬;
- 用血球计数器计数细胞, 再以培养液稀释, 调整细胞悬液的浓度为 2×10^5 /mL, 然后接种于预先放置有盖玻片的 96 孔培养板中, 每孔加入 0.2 mL 细胞悬液;
- 在 5%CO₂、37 °C 及潮湿空气条件下培养 48 h, 倒置显微镜下观察细胞已长成单层即可用于标本接种。

A.3.3.2 临床标本的接种

操作步骤:

- 细胞生长成单层时, 取出 96 孔培养板, 吸去孔中的上清液, 加入处理过的标本液 0.1 mL。
- 每份标本接种 2 孔(1 孔观察结果, 另 1 孔作盲传)。每批临床标本均设阳性对照和阴性对照。
- 将已接种标本的培养板在 37 °C 条件下静置 1 h~2 h(不需要离心)。
- 吸去所接种的标本液, 每孔中加入 0.2 mL 含有放线菌酮的分离培养液, 在 5%CO₂、37 °C 及潮湿空气条件下培养 48 h, 然后观察结果。

A.3.3.3 染色鉴定

A.3.3.3.1 碘染色

操作步骤:

- 吸去培养孔中的培养液, 每孔加入 0.2 mL 甲醇, 固定 10 min;
- 弃去甲醇, 加 0.2 mL 碘染色液, 染 15 min 后弃去染色液;
- 从孔中取出盖玻片, 细胞面朝下, 放于滴加有碘甘油封固液的洁净载玻片上, 置显微镜(10×40 倍)下观察。

A.3.3.3.2 吉姆萨染色

操作步骤:

- 吸去培养孔中的培养液, 每孔加入 0.2 mL 甲醇, 固定 10 min;
- 弃去甲醇, 每孔加入 0.2 mL 吉姆萨染液, 染 30 min 后弃去染色液;
- 以磷酸缓冲液洗片, 取出盖玻片, 自然干燥后镜检。

A.3.3.3.3 免疫荧光染色

操作步骤：

- a) 吸去培养孔中的培养液,每孔加入 0.2 mL 甲醇,固定 10 min;
- b) 弃去甲醇,每孔加入 0.1 mL 荧光标记的单克隆抗体,在 36 °C 下孵育 30 min;
- c) 吸去单抗,取出盖玻片,用去离子水漂洗 30 min;
- d) 用滤纸吸干水分,将盖玻片的细胞面朝下,放于滴加有封固液的洁净载玻片上,置荧光显微镜下观察(10×40 倍)。

A.3.4 结果报告

碘染色时见到深棕色胞浆内包涵体为阳性;吉姆萨染色时见到紫红色胞浆内包涵体为阳性;免疫荧光染色时见到发苹果绿色荧光的包涵体为阳性。

A.3.5 临床意义

细胞培养是诊断沙眼衣原体的“金标准”方法,其特异性很高(100%),但由于脓液对培养细胞有毒性作用,诊断 LGV 的敏感性通常只有 50%左右。沙眼衣原体培养阳性后需进一步用 DNA 测序等分子生物学方法鉴定是否是 L 型沙眼衣原体。从皮损、直肠拭子或淋巴结抽吸液等标本中培养出 L 型沙眼衣原体可明确 LGV 的诊断。

A.3.6 注意事项

A.3.6.1 McCoy 细胞浓度影响衣原体的生长,应该事先摸索好适宜的细胞接种浓度,以防细胞单层过密或过疏。

A.3.6.2 细胞老化影响衣原体的生长,可能产生假阴性结果。细胞传代许多次后活性不好时需换用新鲜的细胞。

A.3.6.3 胎牛血清是培养液中的关键成分,应选用符合质量的胎牛血清。每批血清应该事先检测是否适合衣原体的生长。

A.3.6.4 对于 L 型沙眼衣原体,临床标本接种后不需要离心即可生长良好,而非 L 型菌株则需要离心。

A.3.6.5 如果一孔染色结果为阴性,将另一孔作盲传,可增加培养的敏感性。

附录 B

(资料性附录)

沙眼衣原体核酸扩增试验及 L 型鉴定方法

B.1 核酸扩增试验

B.1.1 仪器材料

B.1.1.1 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪、高速冷冻离心机、旋涡混合器、加热仪、移液器。

B.1.1.2 荧光定量 PCR 试剂盒:包括 DNA 提取液、PCR 反应液(含引物及荧光探针)、阳性和阴性质控标准品等。

B.1.1.3 针对沙眼衣原体质粒 pCTT1 基因的引物及探针:

引物序列 PCT1:5'-CGA TGA TTT GAG CGT GTG TAG CG-3';PCT2:5'-ATA CGA GCC AGC ACT CCA ATT TC-3';荧光探针 FPCT:5'-TGA GCA ATT TCA TTT TCC GCT CG-3'。

B.1.2 检测步骤

B.1.2.1 DNA 提取。将标本充分洗脱至无菌生理盐水中,12 000 r/min,离心 5 min。沉淀加无菌生理盐水 1 mL,充分混匀后,12 000 r/min,离心 5 min,再重复洗涤一次。沉淀中加 50 μ L DNA 提取液并充分混匀,沸水浴 10 min,12 000 r/min,离心 5 min,转至 4 $^{\circ}$ C 静置以保证充分裂解。离心沉淀,取上清液做 PCR 反应模板。

B.1.2.2 质控标准品处理。取阴性和阳性质控标准品加 DNA 提取液混匀,沸水浴 10 min 后同上处理。

B.1.2.3 加样。取单管单人份 PCR 反应管若干管,分别加入处理后样品、阴性质控标准品、阳性质控标准品,8 000 r/min,离心数秒。

B.1.2.4 PCR 扩增。将各反应管放入荧光 PCR 仪,按下列条件扩增:93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后按 93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,先做 10 个循环,最后按 93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,做 30 个循环。可根据不同的 PCR 仪和商品化试剂盒设置扩增条件和阈值。

B.1.3 结果判断

仪器自动判断检测结果,可分别作定性和定量分析。

B.1.4 临床意义

临床标本中检测到沙眼衣原体核酸可作为沙眼衣原体感染的依据,但不能确定是 L 型或非 L 型沙眼衣原体感染,需进一步做分型鉴定才能确诊是否是 LGV。

B.2 L 型鉴定方法

B.2.1 主要外膜蛋白基因(omp1)序列测定

用 PCR 扩增沙眼衣原体外膜蛋白的可变区(VD1-VD4)的基因,扩增产物纯化后作 DNA 序列测定,应用相应软件将测序结果与基因库中的标准菌株序列做 BLAST 比对,分析确定沙眼衣原体的型别。

B.2.2 omp1 基因限制性片段长度多肽性分析

用巢式 PCR 扩增 1.1kb 的 omp1 基因,第一次反应的引物可用 NLO (5'-ATGAAAAA ACTCTT-GAAATCG-3') 和 NRO (5'-CTCAACTGTAACTGCGTATTT-3');第 2 次反应的引物可用 PCTM3 (5'-TCCTTGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCT-3') 和 CT4 (5'-CCGCAAGATTTTCTAGATT-TCATCTTGT-3')。扩增产物用 AluI 酶切,与标准对照 L1、L2、L3 的酶切模式进行比较,如果是 L3 型,再用 EcoRI 和 DdeI 酶切,以鉴别 H、I 和 L3 型沙眼衣原体。

B.2.3 临床意义

对沙眼衣原体细胞培养阳性或 DNA 检测阳性的标本,分型结果鉴定为 L1、L2 或 L3 血清型沙眼衣原体则可明确 LGV 的诊断。
