

ICS 11.020
C59
备案号:20493—2007

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 275—2007

白喉诊断标准

Diagnostic criteria for diphtheria

2007-04-17 发布

2007-10-15 实施



中华人民共和国卫生部 发布

前 言

根据《中华人民共和国传染病防治法》制定本标准。

按照国家质检总局 国家标准委公告(2005 年第 146 号),GB15997—1995《白喉诊断标准及处理原则》自本标准实施之日起废止。

本标准的附录 A 是资料性附录,附录 B 是规范性附录。

本标准由卫生部传染病标准专业委员会提出。

本标准由中华人民共和国卫生部批准。

本标准起草负责单位:黑龙江省疾病控制中心、中国疾病预防控制中心、哈尔滨医科大学附属第一医院。

本标准主要起草人:苏华、张荣珍、殷大鹏、马英骥。

白喉诊断标准

1 范围

本标准规定了白喉的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及其工作人员对白喉的诊断和报告。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1 异染颗粒 metachromatic granule

用奈瑟(Neisser)染色或阿尔伯特(Albert)法染色,白喉杆菌菌体两端或一端可见着色较深的浓染的颗粒。

2.2 白喉毒素 diphtheria toxin

一种毒性强、具有高度抗原性的蛋白质,由 A、B 两个肽链经二硫键连接而组成。

2.3 假膜 pseudomembrane

在扁桃体、腭弓或腭垂处,由炎性分泌物形成的致密、不易剥离的白色或灰白色的膜。

2.4 毒源菌和非毒源菌 exotoxin-producing strain and nonexotoxin-producing strain

产生外毒素的为毒源菌,即带有毒素生物结构基因编码。非毒源菌株不产生外毒素,即不带有毒素生物结构基因编码。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

3.1.1 多在秋冬季节发病,参见附录 A。

3.1.2 一周内与白喉病人有直接或间接接触史。

3.2 临床表现

潜伏期 1d~7d,多数为 2d~4d。根据病变侵犯部位分为以下四种类型:

3.2.1 咽白喉 最常见,占发病人数的 80%左右。根据病情轻重又分为 4 型。

3.2.1.1 轻型 全身及咽部症状均较轻,假膜呈点状或小片状,常局限于扁桃体上,有时可无假膜,但白喉杆菌培养阳性。

3.2.1.2 普通型 全身症状有轻至中度发热、乏力、食欲减退、恶心、呕吐、咽痛等,伴有扁桃体肿大,表面有灰白色片状假膜,可逐渐扩大,延及咽喉壁。常有颌下淋巴结肿大及压痛。

3.2.1.3 重型 全身中毒症状明显,有高热、面色苍白、明显乏力、恶心、呕吐、咽痛明显,严重者出现血压下降。扁桃体和咽部水肿,假膜延至咽部及鼻咽部,甚至整个口腔,呈灰白色和黑色。口腔有腐臭味,颈部淋巴结肿大,颈部有明显的软组织肿胀,称为“牛颈”,常并发心肌炎和周围神经炎。

3.2.1.4 极重型 起病急,病情进展快。假膜范围广泛,多呈黑色,并有局部坏死,口腔有特殊的腐臭味,扁桃体和咽部出现高度肿胀,可影响呼吸和吞咽,颈部到锁骨上窝软组织明显水肿,出现重度“牛颈”。全身中毒症状严重,并发有严重心肌炎和周围神经炎,亦有血小板减少、出血等表现,病死率极高。

3.2.2 喉白喉 原发性喉白喉少见,多为咽白喉向下扩散所致。起病较缓,全身中毒症状轻,起病时呈犬样咳嗽,声音嘶哑,甚至失音。重者出现吸气性呼吸困难,呼吸道梗阻而窒息。

3.2.3 鼻白喉 原发性鼻白喉少见,多由咽白喉扩展而来。全身症状轻,局部表现为鼻塞、流浆液血性鼻涕,鼻孔周围皮肤红、糜烂或结痂,鼻前庭或中隔上可见白色假膜。

3.2.4 其他部位的白喉 其他部位的白喉少见,皮肤、眼结膜、耳、外阴、新生儿脐部、食管等处偶尔可发生白喉。均有局部炎症、假膜形成,全身症状轻,但在疾病传播上有重要意义。

3.3 实验室检查

3.3.1 白喉杆菌分离培养阳性并证明能产生外毒素,检测方法见附录 B。

3.3.2 咽拭子直接涂片镜检可见革兰氏阳性棒状杆菌,并有异染颗粒,检测方法见附录 B,病原学参见附录 A。

3.3.3 病人急性期和恢复期血清特异性抗体四倍或四倍以上增长,检测方法见附录 B。

4 诊断原则

根据临床表现及实验室检查,结合流行病学史进行综合分析,做出诊断。

5 诊断

5.1 疑似病例

符合 3.2.1 或 3.2.2 或 3.2.3 或 3.2.4。

5.2 临床诊断病例

疑似病例加 3.3.2,参考 3.1。

5.3 确诊病例

疑似病例同时符合 3.3.1 或 3.3.3 任何一项者。

6 鉴别诊断

6.1 咽白喉需与下列疾病鉴别

6.1.1 急性扁桃体炎 起病急,高热,咽部疼痛较重,扁桃体充血水肿明显,表面脓性分泌物附着疏松,不超出扁桃体范围,且易擦去。

6.1.2 鹅口疮 病变多在口腔粘膜两侧,呈乳白色斑块状融合,疏松易剥离,全身中毒症状轻,多见于久病体弱幼儿或长期应用广谱抗生素者。

6.1.3 奋森咽峡炎 本病主要在齿龈或咽部有坏死、溃疡和假膜形成,口有恶臭。涂片可见梭形杆菌和螺旋体。

6.2 喉白喉应与下列疾病鉴别

6.2.1 急性咽炎 该病多发生于婴幼儿,起病急,呼吸困难有日轻夜重现象。咽部无假膜形成。

6.2.2 气管异物 异物吸入后呛咳明显,多无发热,咽部无假膜,可有局限性肺气肿,肺不张,纵隔摆动等。

6.3 鼻白喉应与下列疾病鉴别

6.3.1 鼻腔异物 有异物史,直接窥检可见异物。

6.3.2 慢性鼻炎 分泌物不呈血性,无假膜。

附录 A
(资料性附录)
病原学、流行病学

A.1 病原学

白喉杆菌为革兰氏阳性细菌,约 $(1.5\mu\text{m}\sim 4\mu\text{m})\times(0.5\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m})$ 大小。菌体一端或两端膨大呈棒状,形态常呈多样化,不运动、无假膜、不产生芽胞。用 Neisser 染色,菌体黄褐色,颗粒呈紫黑色。Albert 法染色,菌体蓝绿色,颗粒蓝黑色,由于菌体着色不均匀,而出现异染颗粒。异染颗粒是白喉杆菌形态学诊断的重要依据。

白喉杆菌在含血、血清和鸡蛋的培养基上生长良好,生长的最适温度为 $35^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}7.2\sim 7.8$ 。

白喉杆菌比较脆弱, 58°C 10min 可灭活,普通消毒液在常用浓度下几分钟内可杀死白喉杆菌。但对寒冷及干燥耐受性比较强,在分泌物中,尤其是在阴暗处能存活 1~3 个月。对磺胺类药物耐受性比较强,对多种抗生素,如青霉素或红霉素等敏感。

白喉杆菌产生的外毒素,是致病主要因素。

A.2 流行病学

人类是白喉杆菌已知的唯一宿主,病人和有毒菌株的带菌者为唯一的传染源,患者在潜伏期即有传染性,不典型和轻型患者容易误诊,所以在传播白喉中的危害性更大。

白喉主要通过呼吸道飞沫传播,也可以通过污染的器具和食物传播,外伤性感染主要通过破损的皮肤或呼吸道以外的粘膜感染。一年四季均可发生,但秋冬季发病较多。白喉主要为儿童传染病,1~5 岁发病率最高。广泛推行白喉疫苗免疫预防后,患者年龄构成向大年龄推移并呈高度散发的趋势。

附录 B
(规范性附录)
白喉杆菌实验室检测方法

B.1 白喉杆菌的分离培养和鉴定

B.1.1 标本的采集

B.1.1.1 病人

以无菌棉拭子或无菌棉拭子吸附新鲜配制的亚硝酸钾、甘油氯化钠溶液保存液,从疑似患者咽喉假膜边缘蘸取标本或同时采取鼻咽拭子,迅速放入灭菌试管内同时送检。

B.1.1.2 带菌者或疑似病人

由于未见到明显的假膜,故应采集鼻咽部或扁桃体粘膜上的分泌物送检。

B.1.2 白喉杆菌的分离培养:鼻咽拭子接种吕氏血清斜面(非选择性培养基)或亚硝酸钾培养基(选择性培养基)等作细菌培养观察鉴定

B.1.2.1 菌形

白喉杆菌为革兰氏阳性,细长呈棒状,排列不规则,常呈人字形、栅栏状。Neisser 或 Albert 法染色可见异染颗粒。

B.1.2.2 培养及生化特性

白喉杆菌在血平板上形成灰白色、圆形光滑菌落,有溶血环。在亚硝酸钾血平板上,菌落呈中心黑色或灰黑色,边缘带灰色。在尿素卵黄双糖培养基上,经 37℃ 12h~48h 培养后可做初步鉴定。白喉杆菌发酵葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、糊精,均产酸不产气,不发酵蔗糖、甘露醇、乳糖、可溶性淀粉。依据形态、培养、生化特性可将白喉杆菌分为轻、中、重三型。

B.1.3 白喉杆菌外毒素鉴别试验

白喉杆菌产生的外毒素是其主要致病因素,只有那些携带 β -棒状杆菌噬菌体的菌株才能产生外毒素。白喉杆菌外毒素鉴别试验可测定白喉杆菌产生外毒素的能力,常用的方法有两种。

B.1.3.1 艾立克(Elek)平板毒力试验

将 Elek 培养基加热熔化,冷却至 50℃ 左右,混匀后用无菌镊子取预先制好的白喉抗毒素(每毫升含 1 000IU~3 000IU)干燥滤纸条,贴于平板中央表面,置 37℃ 孵箱内约 0.5h,烘干表面水分,时间不宜过长,以免影响结果。

将试验菌株划线接种于平板上成一直线,使其与抗毒素滤纸成直角相交。同一平板可同时接种 4~5 个标本。同时要用已知有毒菌株作阳性对照。于 37℃ 培养 48h~72h,如发育良好即可观察结果。阳性者于距纸条稍远处沿接种线开始有絮状沉淀线出现。如 72h 仍未出现沉淀线者可作阴性报告。

B.1.3.2 豚鼠皮内接种毒力试验

将待试菌株接种吕氏血清斜面,于 37℃ 培养 16h~18h,加肉汤 1mL,刮下菌苔,制成悬液,吸取此菌液 0.5mL,加入 3.5mL 肉汤中,混匀后即可应用。同时要用已知有毒菌株作对照。

选体重 250g 左右豚鼠两只,一只在试验前 24h 腹腔注射白喉抗毒素 1 000IU,作为对照动物;另一只不注射抗毒素,作为试验动物。接种前先将动物腹部向上,固定在架上。以温水洗净腹部后剃毛。剃毛后再用无菌生理氯化钠溶液擦洗一次待干,用 1mL 注射器吸取菌液,准确注射 0.1mL 于皮内,可同时接种 6~8 株菌。注射后 4h,给试验动物注射抗毒素 4 000IU,以免因毒株毒力太强而致死。

注射后经 24h、48h、72h,各观察皮内反应一次。对照动物无论接种有毒或无毒菌株,均应无局部反应;试验动物在注射有毒株的部位,于 24h 呈红肿,48h 在红肿部位边缘有化脓性病变,72h 可见硬块,出现灰黑色坏死斑,无毒的菌株则无病变。动物毒力试验也可应用家兔作试验动物。

B.2 白喉抗体测定(间接血凝法)

B.2.1 原理

间接血凝法是利用红细胞作为载体,并经过一定处理后,使蛋白质抗原吸附于红细胞表面制备成致敏红细胞。然后用致敏红细胞来测定相应的微量抗体。当特异抗体存在时,发生抗原抗体结合,红细胞出现特异性凝集,为阳性反应。

B.2.2 材料

B.2.2.1 抗原

作致敏红细胞用。白喉类毒素含量为 20Lf/mL~30Lf/mL 以上。

B.2.2.2 标准抗毒素

每毫升含 10 个国际单位。用以测定致敏红细胞效价,用前须进行 56℃,30min 灭活。

B.2.2.3 试验溶液配制

B.2.2.3.1 0.15mol/L 磷酸盐和食盐溶液配制

B.2.2.3.1.1 0.15mol/L Na_2HPO_4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (M. W=358.16) 53.72g

蒸馏水至

1 000mL

B.2.2.3.1.2 0.15mol/L KH_2PO_4

KH_2PO_4 (M. W=136.09)

20.41g

蒸馏水至

1 000mL

B.2.2.3.1.3 0.15mol/L NaCl

NaCl (M. W=58.45)

8.77g

蒸馏水至

1 000mL

B.2.2.3.2 pH7.2 磷酸盐缓冲液 (P. B. S)

0.15mol/L Na_2HPO_4

286mL

0.15mol/L KH_2PO_4

90mL

0.15mol/L NaCl

376mL

配后测 pH 值,灭菌后备用。

B.2.2.3.3 pH6.4 磷酸盐缓冲液 (P. B. S)

0.15mol/L Na_2HPO_4

100mL

0.15mol/L KH_2PO_4

210mL

0.15mol/L NaCl

310mL

配后测 pH 值,灭菌后备用。

B.2.2.3.4 pH8.2 磷酸盐缓冲液 (P. B. S)

0.15mol/L Na_2HPO_4

97mL

0.15mol/L KH_2PO_4

3mL

配后测 pH 值,灭菌后备用。

B.2.2.3.5 戊二醛稀释液

pH8.2 磷酸盐缓冲液 (P. B. S)

100mL

0.15mol/L NaCl

900mL

蒸馏水

500mL

灭菌后放冷库备用。

B.2.2.3.6 1%戊二醛溶液

25%戊二醛溶液

4mL

戊二醛稀释液 96mL

B.2.2.3.7 1%鞣酸溶液

鞣酸 1g

蒸馏水加至 100mL

4℃避光保存可用一周,用前以生理盐水稀释至1:20 000。

B.2.2.3.8 红细胞保存液

葡萄糖 2.05g

枸橼酸钠 0.8g

NaCl 0.42g

蒸馏水加至 100mL

测 pH,需用 10%枸橼酸校正至 pH6.15,于 0.7kPa 消毒 20min。

B.2.3 致敏红细胞制备

B.2.3.1 红细胞采集与处理

选择健康绵羊静脉采血,注入红细胞保存液中(红细胞与保存液比例为1:1),摇匀放冷库(2℃~8℃)48h,离心弃上清,用生理盐水洗涤红细胞三次,每次离心(2 000r/min~2 500r/min)20min~25min,弃上清得压积红细胞。

B.2.3.2 红细胞醛化

取上述压积红细胞1份,加入24份冷却的1%戊二醛溶液中,放2℃~6℃,固定时间大于等于30min,每5min~6min摇动一次,离心(2 000r/min,10min)弃上清,用生理盐水洗五次,再用蒸馏水洗五次,最后用生理盐水配成10%红细胞悬液,加入1:10 000硫柳汞防腐,放2℃~8℃冷库备用。

B.2.3.3 红细胞致敏

10%醛化红细胞悬液,白类用 pH7.2 磷酸盐缓冲液(P.B.S)稀释至2.5%后进行鞣酸处理。

B.2.3.3.1 鞣酸处理

2.5%红细胞一份加1:10 000的鞣酸一份,混匀后放45℃或37℃水浴30min(每5min~6min摇一次),然后用 pH7.2 磷酸盐缓冲液(P.B.S)洗涤三次(2 000r/min~2 500r/min,5min~6min),最后用 pH6.4 磷酸盐缓冲液(P.B.S)配成2.5%鞣化红细胞悬液。

B.2.3.3.2 致敏

2.5%鞣化红细胞一份加精制白喉类毒素一份(25Lf/mL)加 pH6.4 磷酸盐缓冲液(P.B.S)三份置45℃或37℃水浴30min(须经常摇动),离心弃上清,用0.5%兔血清生理盐水洗涤二次,再用0.5%兔血清生理盐水配成2.5%红细胞悬液。

B.2.3.4 对照红细胞制备

2.5%鞣化红细胞一份加4份 pH6.4 磷酸盐缓冲液(P.B.S)置45℃或37℃水浴30min(须经常摇动),离心弃上清,用0.5%兔血清生理盐水洗涤红细胞二次,再用兔血清生理盐水配成2.5%对照红细胞悬液。

B.2.4 效价滴定

B.2.4.1 致敏红细胞、敏感度的测定

将标准白喉抗毒素用0.5%兔血清生理氯化钠溶液先行稀释使每毫升含1个单位,然后进行适当倍比系列稀释,每个稀释度取25μL加入血凝板孔中,再加入致敏红细胞25μL,摇匀放37℃2h,取出判读结果或放2℃~10℃冰箱,次日判读结果,以“++”为凝集试验终点。

同时设立鞣化红细胞和致敏红细胞对照:a)不同稀释度抗血清加鞣化红细胞,以检查抗血清有无非特异性凝集;b)0.5%兔血清生理氯化钠溶液加致敏红细胞以检查红细胞有无非特异性凝集。以上两种对照皆为阴性试验才能成立,否则应重试。

B.2.4.2 待检血清处理

a) 待检血清经 56℃ 30min 灭活。

b) 醛化红细胞吸收。吸收方法：待检血清 1 份加 50% 醛化红细胞 2 份，放 37℃ 1h~2h，离心沉淀，吸取上清即为 1:2 稀释的血清样品。

B.2.4.3 待检血清滴定

先在血凝板中每孔加入 0.5% 兔血清生理氯化钠溶液 25 μ L，再将 25 μ L 待检血清滴入第一孔中，使与 0.5% 兔血清生理氯化钠溶液混合，每孔均取 25 μ L，加入到第二孔中混匀，进行系列稀释。最后一孔取出 25 μ L 弃掉。取 25 μ L 0.5% 致敏红细胞加到每个孔中，然后摇匀，放 37℃ 2h，或放 2℃~10℃ 冰箱内次日判读结果，以“++”为凝集试验终点。每份待检血清设立醛化红细胞和致敏红细胞阴性对照，每血凝板设定阳性对照。

B.2.4.4 结果计算

待检血清单位 = 待检血清终点稀释度 $\times$ 标准血清终点稀释度所含单位数。

例如标准白喉抗毒素 (10IU/mL) 终点稀释度为 1:2048，含有 0.0048IU/mL，而待检血清终点稀释度为 1:8，于是其单位为 0.038IU/mL。

B.2.4.5 结果判定标准

- 凝集的红细胞均匀地铺在孔底形成一薄层为“++++”；
- 凝集的红细胞基本同 a)，只是在此薄层的底部有一很弱红圈为“+++”；
- 凝集的红细胞在孔底形成的薄层，同时中间可见一松散的红圈为“++”；
- 凝集的红细胞在孔底形成一圆圈，周围可见少量的红细胞比对照圆圈稍大为“+”；
- 红细胞在孔底形成紧密的圆圈成圆点为“-”。

影响血凝试验的准确性与敏感度因素很多，如用具的清洁，材料的标准化，操作的细致等。

B.3 酶联免疫吸附试验检测白喉毒素抗体

B.3.1 原理

利用包被在固相载体上白喉类毒素捕捉待检血清中相应抗毒素抗体，再用酶标记的抗人 IgG 抗体去掉反应 (抗原-抗体-酶标记抗体)，利用底物使酶显色而测知是否存在抗体。

B.3.2 材料

B.3.2.1 抗原

精制白喉类毒素 1000Lf/mL 以上。

B.3.2.2 结合物

羊抗人 IgG 酶标记抗体。

B.3.2.3 参考血清

多份间接血凝法阳性高效价血清混合为阳性参考血清，多份阴性血清混合为阴性参考血清。或试剂盒提供的参考血清。

B.3.2.4 被检血清

白喉病人和健康者血清，56℃ 30min 灭活。

B.3.3 方法及步骤，按试剂盒使用说明书进行。

参 考 文 献

1. Vaccines and Biological World Health Organization. WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases[R]. Geneva:WHO,2003.
2. 连文远. 计划免疫学. 第二版[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2001. 404-417.
3. 张延龄,张辉. 疫苗学[M]. 北京:科学出版社,2004. 837-853.
4. 彭文伟. 传染病学. 第六版[M]. 北京:人民卫生出版社,2004. 161-164.
5. 李兰娟. 传染病学[M]. 北京:高等教育出版社,2004. 118-121.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;twelfth informational supplement[R]. Atlanta: CDC,2002.
7. Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, et al. An outbreak of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infection; single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users[J]. Clin Infect Dis. 1998, 27 : 1295-1298.
8. CDC. Respiratory diphtheria caused by *Corynebacterium ulcerans*—Terre Haute, Indiana, 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep[J]. 1997, 46 : 330-332.
9. Wong TP, Groman N. Production of diphtheria toxin by selected isolates of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*[J]. Infect Immun. 1984, 43 : 1114-1116.
10. Galazka AM, Robertson SE, Oblapenko GP. Resurgence of diphtheria[J]. Eur J Epidemiol. 1995, 11 : 95-105.
11. Galazka A. Implications of the diphtheria epidemic in the former Soviet Union for immunization programs[J]. J Infect Dis. 2000, 181 Suppl 1 : S244-248.
12. Tharmaphornpilas P, Yoocharoan P, Prempre P, et al. Diphtheria in Thailand in the 1990s[J]. J Infect Dis. 2001, 184 : 1035-1040.
13. 刘运德. 微生物学检验. 第二版[M]. 北京:人民卫生出版社,2005. 252-256.