



南宁市第二人民医院

NANNING SECOND PEOPLE'S HOSPITAL

广西医科大学第三附属医院

衣原体的实验室检测

南宁市第二人民医院
医学检验科
梁秀云

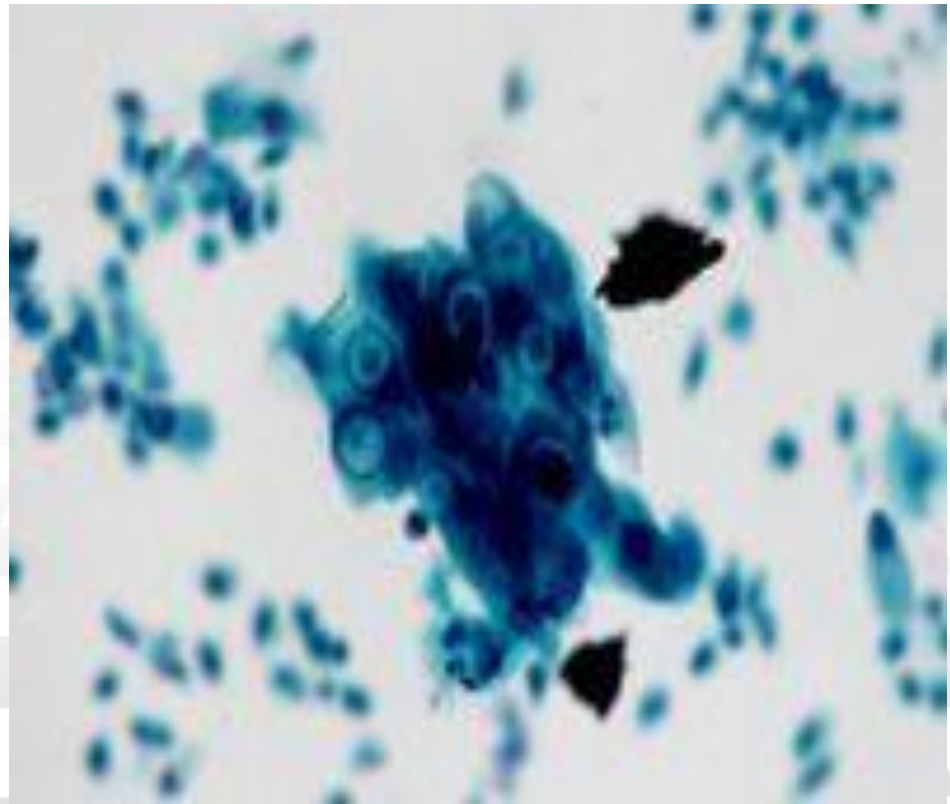




一、衣原体的病原学

• 衣原体 (Chlamydia)

是一类能通过细菌滤器，**严格细胞内寄生**，有独特发育周期的原核细胞型微生物。过去认为是病毒，现在归属细菌。





病原学（结构）

- **原体** (elementary body, EB)

直径为 $0.2\sim 0.4\mu\text{m}$ 的小球形颗粒，有胞壁，内有核质和核蛋白体，发育成熟的衣原体，为细胞外形式。

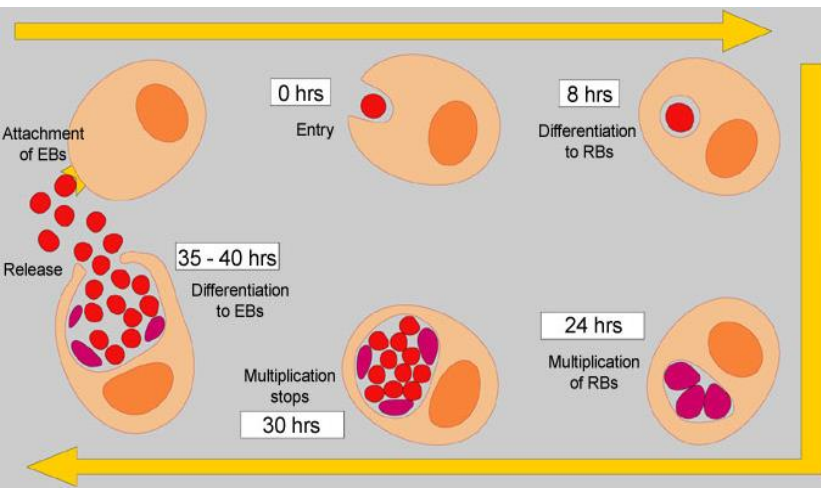
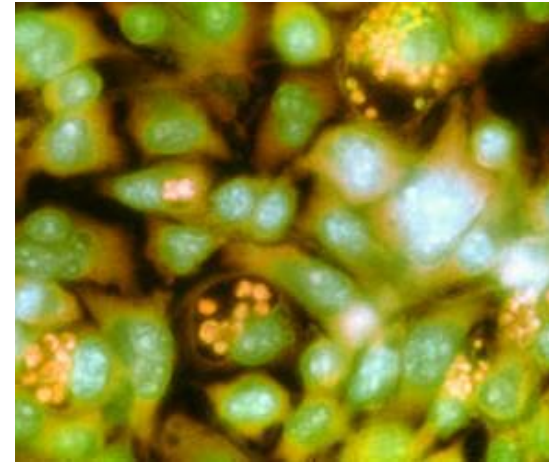
- **网状体** (reticulate body, RB)

或称始体 (initial body)，EB通过吞饮作用进入胞内，由宿主细胞包围EB形成空泡，并在空泡内逐渐增大为RB。直径为 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ，圆形或椭圆形。RB为细胞内形式，无感染性。

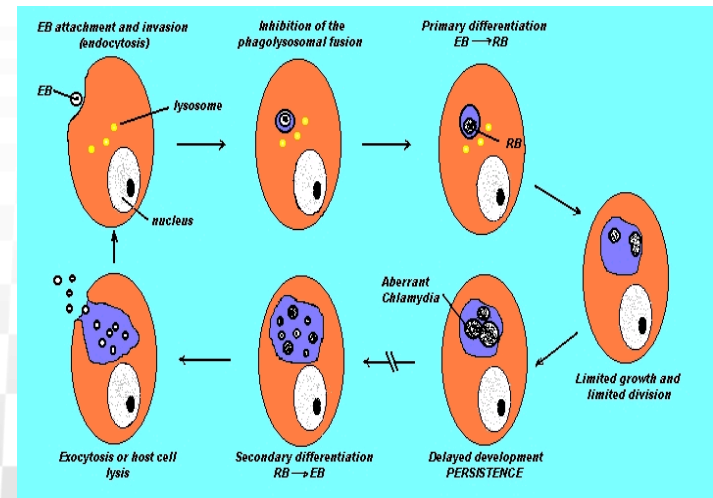


衣原体的病原学

- 严格细胞内寄生 →
- 生活特性：原体和始体



正常生活周期



持续性感染



与细菌区别

其缺乏合成生物能量来源的ATP酶，其能量完全依赖被感染的宿主。

与病毒区别

其具有DNA、RNA的两种核酸、核糖体和一个近似细胞壁的膜，并以二分裂方式进行增殖，能被抗生素抑制。



病原学（抵抗力）

1. 衣原体耐冷不耐热，56 ~ 60度仅存活5 ~ 10min，在-70度可保存数年。
2. 0.1%甲醛液、0.5%石碳酸30min可杀死。
3. 75%酒精0.5min可杀死。
4. 对四环素、红霉素、螺旋霉素、强力霉素及利福平均很敏感。



二、衣原体的分类

- 沙眼衣原体
- 肺炎衣原体
- 鹦鹉热衣原体

◇Serovar: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, K, L1, L2, L3

◇B群: B、Ba、D、E、L1和L2

◇C群: A、C、H、I、J、K和L3

◇中间群: G和F



沙眼衣原体生物变种

◇沙眼生物变种（A、B、C、D、J、K）

◇性病淋巴肉芽肿（L1、L2、L3）

◇鼠生物变种



三、沙眼衣原体致病性

- 1、男性特有的感染：
 - 尿道炎
 - 附睾炎
 - 前列腺炎
 - 关节炎
- 2、女性特有的感染：
 - 宫颈炎
 - 尿道炎
 - 盆腔炎



3、男性和女性共有的感染： 直肠炎
眼结膜炎
无症状感染

4、婴儿及儿童感染： 新生儿结膜炎
新生儿肺炎



四、沙眼衣原体实验室检测方法

(一) 目前检测方法

- 1、**抗原检测：** 快速免疫层析法
ELISA
直接免疫荧光试验 (DFA)
- 2、**核酸检测：** 实时荧光PCR法
- 3、**细胞培养法：**



(二)各种标本的采集

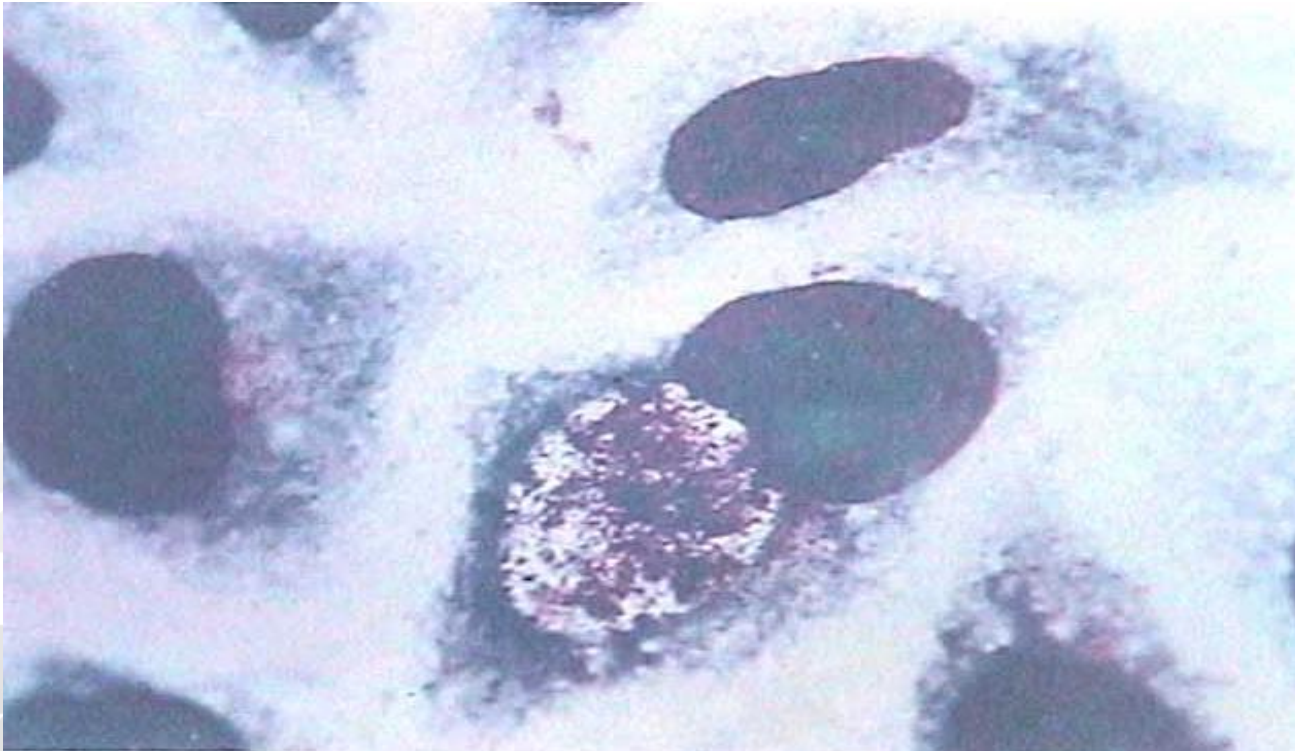
- **泌尿生殖道感染：**
 - ◇男性：尿道拭子、尿沉渣和EPS等。
 - ◇女性：宫颈拭子/阴道拭子等。
- **眼结膜感染：** 刮片或分泌物。
- **肺部感染：** 咽拭子，支气管肺泡洗液。



(三) 方法学

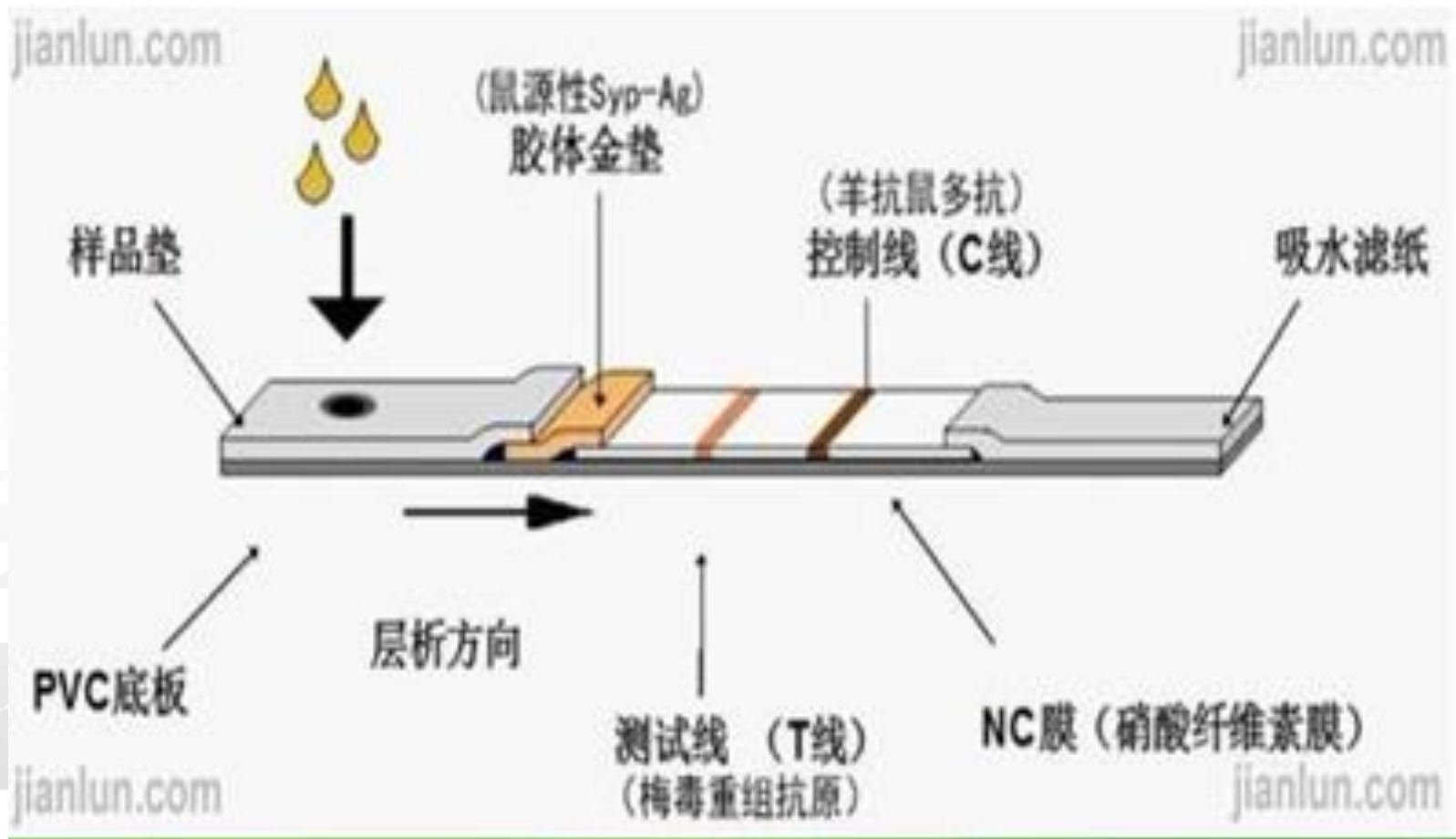
1、直接涂片法（姬姆萨染色）

◎方法：涂片---姬姆萨染色---镜检包涵体





2、免疫胶体金快速法 原理：





操作:





操作:





胶体金法操作注意事项

- 1、保持板块试剂盒的干燥；
- 2、细菌污染不能测；
- 3、检测线颜色深浅程度与样品中抗体的滴度没有一定的必然联系，即使只有非常弱的色带，也应判定为阳性结果；
- 4、实验环境应保持一定的温度，避风，避免在高温下进行实验，测试条从包装中取出后应尽快进行实验，避免放置于空气中过长时间，导致受潮；
- 5、严格按操作说明书控制实验结果判定时间，避免错判。



◎免疫胶体金快速法检测临床应用

☆敏感性：33.3---49.7% 低

☆特异性：88.1---99.2% 高

缺 点： 需要确证，不宜质控操作

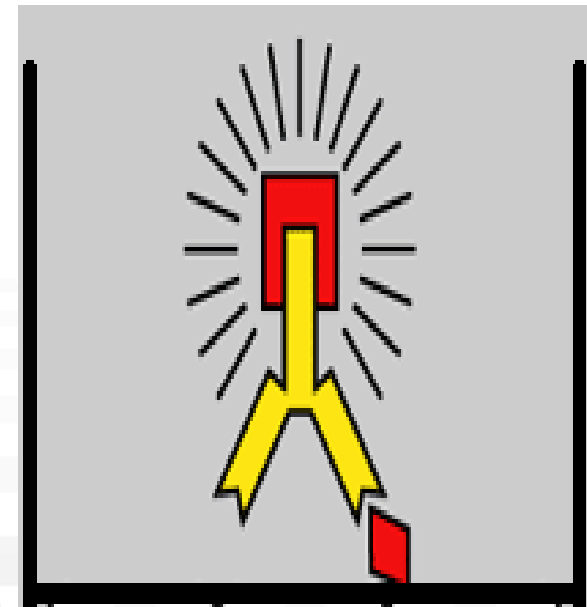
临床应用： 适合临床症状典型病例的检测
不适合非典型感染的筛查



3、ELISA法

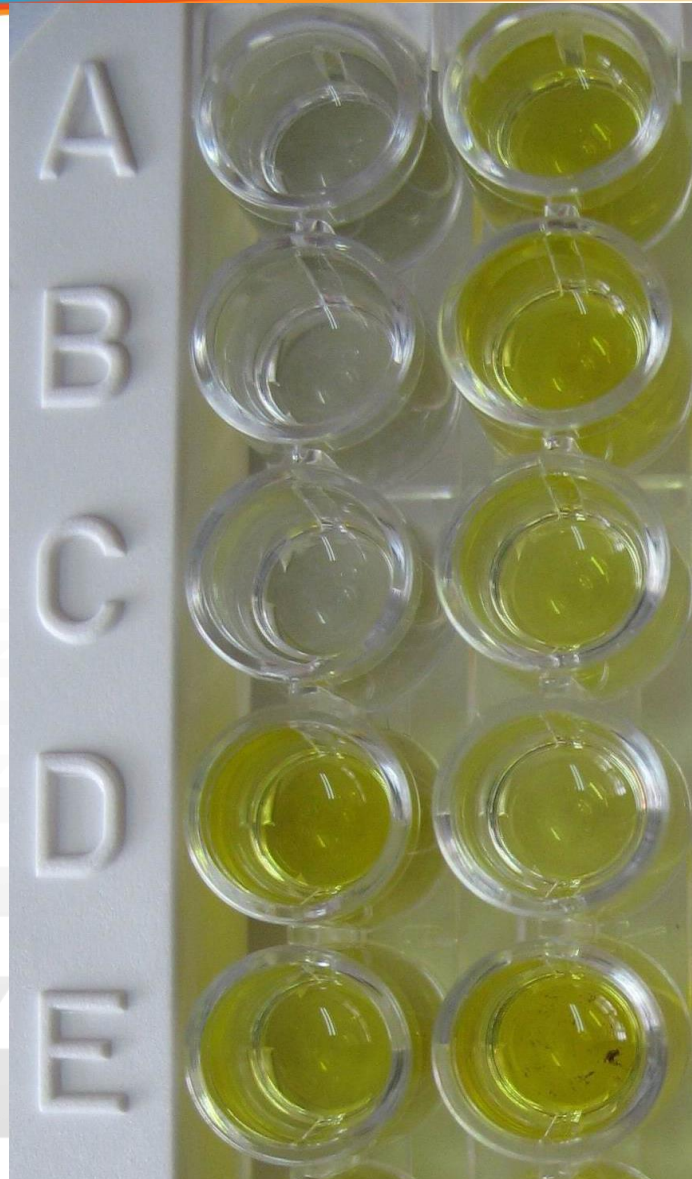
原理： Ab—Ag—Ab—酶
—底物—显色

方法： 加入标本（孵育后洗板）
酶标抗体（孵育后洗板）
底物（孵育）
终止液——机读或肉眼读。





ELISA法





ELISA操作注意事项

10. 临床ELISA测定中可能会出现的问题及可能的原因：

问题1. 弱阳性质控样本检测不出可能的原因：

- 1) 温育时间或温度不够；
- 2) 显色反应时间太短；
- 3) 所用配制缓冲液的蒸馏水有问题。



ELISA操作注意事项

问题2. 测定的重复性差（相同样本两次测定结果不一致）
包括

- 1) 加样本及试剂量不准，孔间不一致；
- 2) 加样过快，孔间发生污染；
- 3) 加错样本；
- 4) 加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；
- 5) 不同批号试剂盒中组分混用；
- 6) 温育时间、洗板、显色时间不一致；
- 7) 孔内污染杂物；
- 8) 酶标仪滤光片不正



ELISA操作注意事项

问题3. 白板（阳性对照不显色）

- 1) 漏加酶结合物；
- 2) 洗板液配制中出现問題，如量筒不干净，含酶抑制物
（如叠氮钠）等；
- 3) 漏加显色剂A或B；
- 4) 终止剂当显色剂使用。



ELISA操作注意事项

问题4. 全部板孔均有显色

- 1) 洗板不干净;
- 2) 显色液变质;
- 3) 加底物的吸光受酶污染;
- 4) 洗版液受酶等污染。



◎沙眼衣原体酶免疫法检测临床应用

☆敏感性：79---97% 高

☆特异性：97---99% 高

缺点： 需要确证，批量操作

临床应用： 临床和健康体检
沙眼衣原体感染的筛查



◎沙眼衣原体包涵体姬姆萨染色临床应用：

☆眼部感染：敏感性95%

☆男性尿道：敏感性15%

☆宫颈感染：敏感性41%

应用范围：眼部标本。

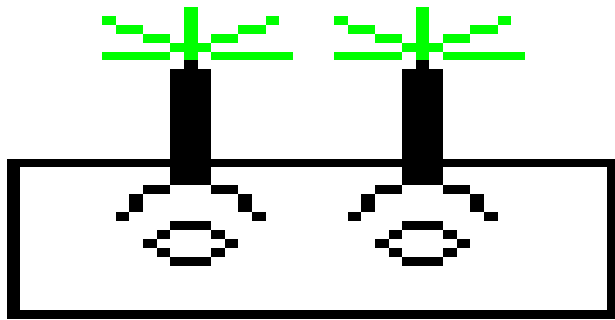


4、直接免疫荧光试验

• 免疫荧光法：

原理：Ag + Ab---荧光---荧光镜镜检。

方法：涂片---固定---抗体---封片---镜检

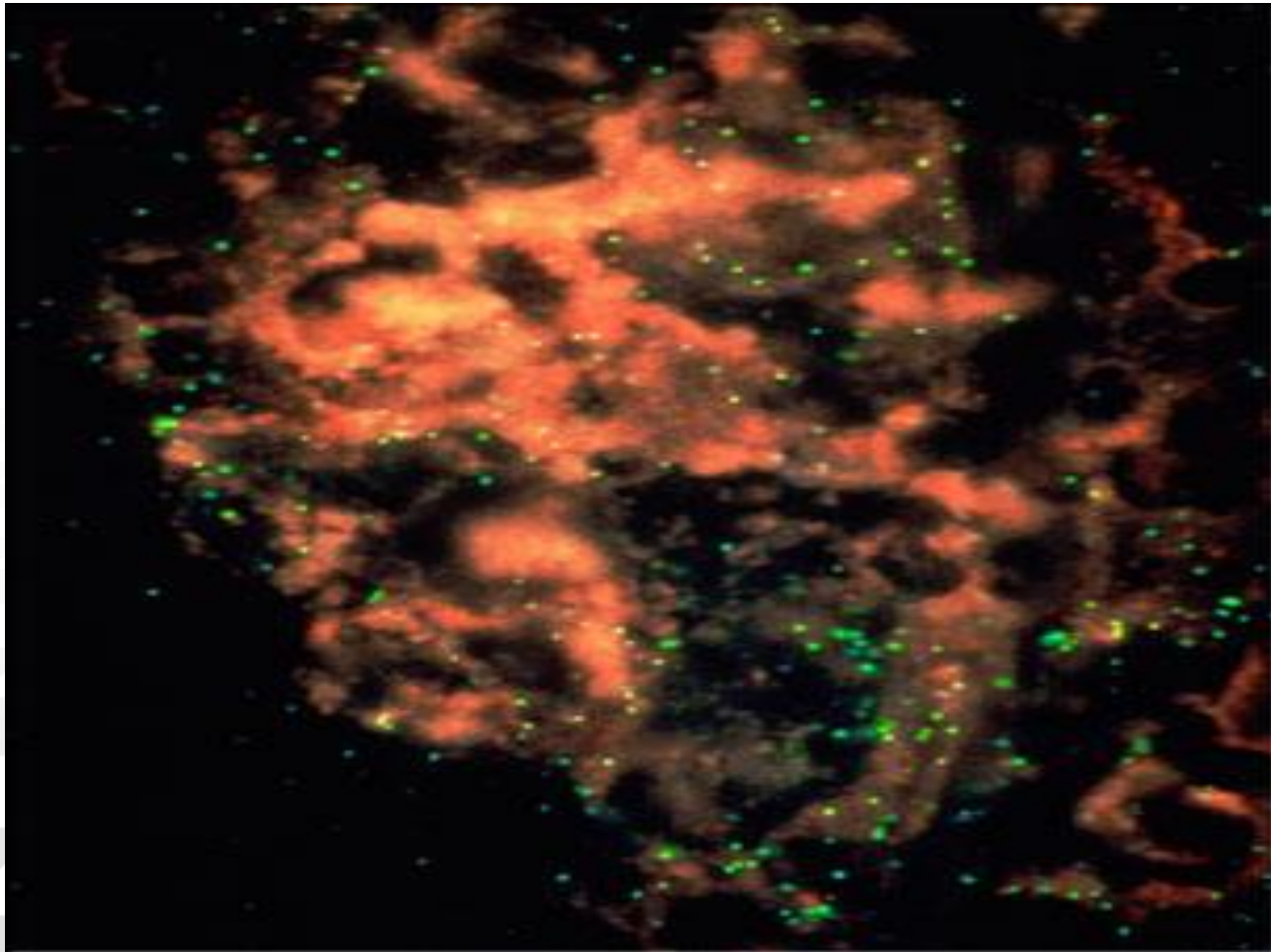


结果：原体：单个、针尖大小，苹果绿
荧光 颗粒

阳性：>=10个原体/片



免疫荧光法





◎沙眼衣原体免疫荧光法检测临床应用

☆敏感性：74---90% 高

☆特异性：98---99% 高

缺点： 主观性，荧光显微镜

临床应用： 快速检测

非培养法阳性标本的确证



5、PCR

原理：

以单链DNA为模板，4种dNTP为底物，在模板3'末端有引物存在的情况下，用酶进行互补链的延伸，多次反复的循环能使微量的模板DNA得到极大程度的扩增。PCR循环过程为三部分构成：模板高温变性、引物低温退火、DNA聚合酶在中温下催化DNA链延伸合成。

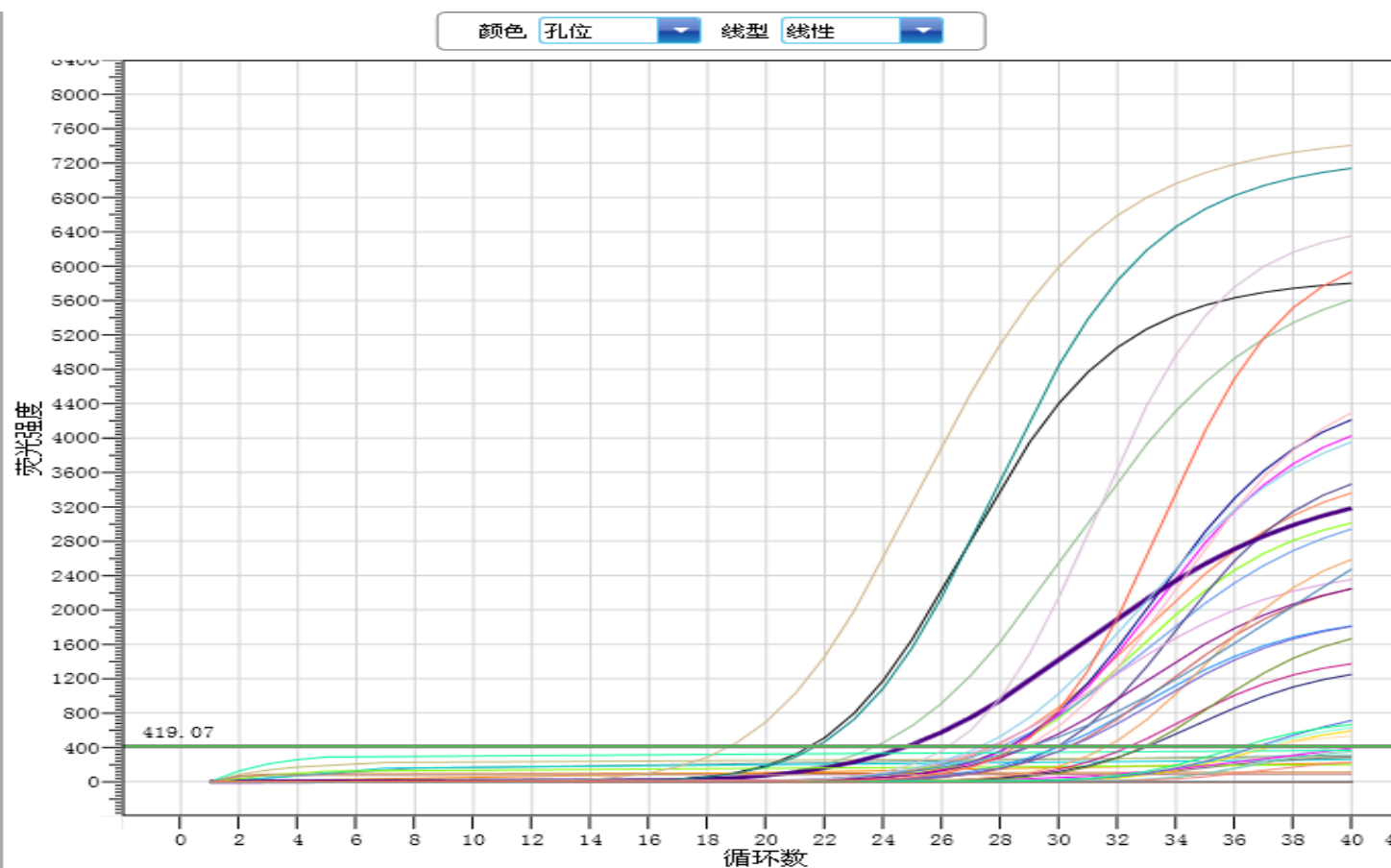


PCR扩增仪





扩增曲线





基因法检测临床应用：

敏感性： 90—97% 高

特异性： 99—100% 高

缺 点： 实验室条件和技术要求高，成本
高，抑制物

临床应用：

临床早期诊断和健康体检
沙眼衣原体感染的筛查



PCR操作注意事项

PCR常见假阳性或假阴性：

1、假阳性原因：

- (1) 新扩增的目的DNA特异性不强，不仅存在病原菌中，而且在非病原菌中也有存在。
- (2) 扩增时退火温度过低造成非特异性条带出现。
- (3) 在被模板中有杂质污染，这是PCR出现假阳性的最常见的原因，应严格遵守操作规范。



PCR操作注意事项

2假阴性原因

- (1) PCR扩增体系中存在Taq酶的抑制剂，如酶类性质、
SOS、血红蛋白等；
- (2) 模板DNA纯度不够；
- (3) 模板含量过少。



PCR操作注意事项

- **污染原因:**
- PCR反应的最大特点是具有较大扩增能力与极高的灵敏度；极其微量的污染即可造成假阳性。
 - 1、标本间交叉污染
 - 2、PCR试剂的污染
 - 3、PCR扩增产物污染
 - 4、实验室中克隆质粒的污染



PCR操作注意事项

(二) 对照试验

- 1、阳性对照
- 2、阴性对照
- 3、重复性试验：选择不同区域的引物进行PCR扩增

(三) 防止污染的方法

- 1、合理分隔实验室：
 - 样本处理区
 - PCR反应液制备区
 - PCR循环扩增区
 - PCR产物鉴定区



PCR操作注意事项

- 2、加样枪使用
- 3、预混合分装PCR试剂
- 4、防止操作人员污染
- 5、设立适当的阳性对照和阴性对照
- 6、减少PCR循环的次数
- 7、选择质量好的离心管



PCR质量控制

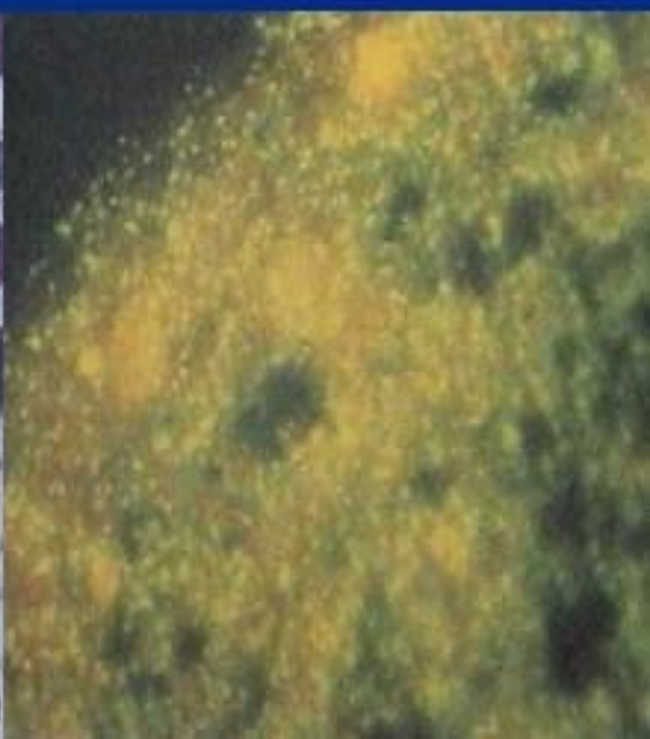
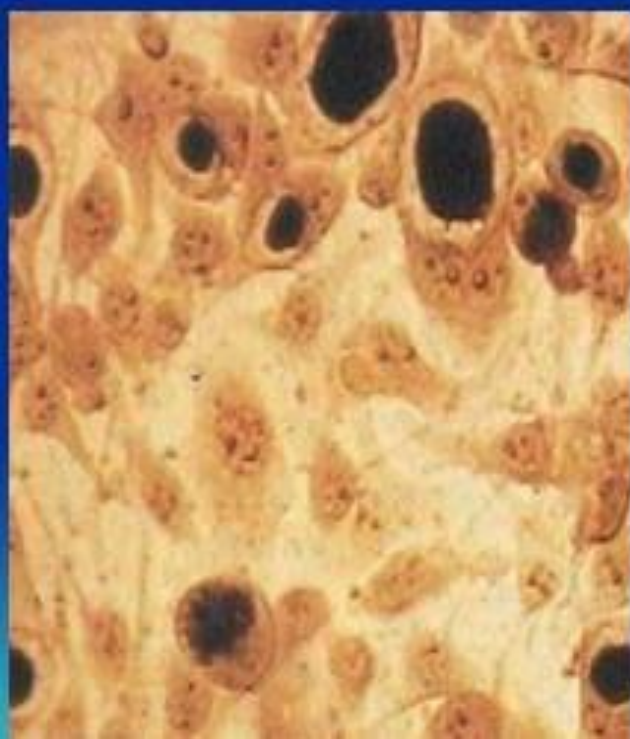
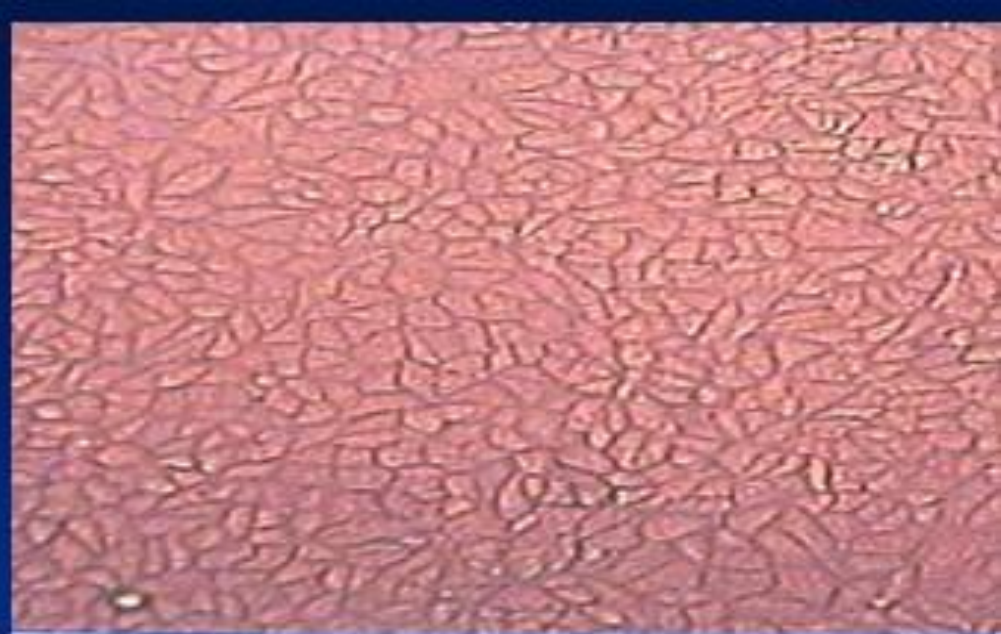
- 1、人员要求：进行严格的岗前培训且具有上岗证，严格按照操作规程（SOP）进行日常操作。
- 2、仪器设备的质量控制：定期进行仪器的校验和保养，特别是加样枪的检定。
- 3、辅助材料的质量控制。



6、细胞培养法

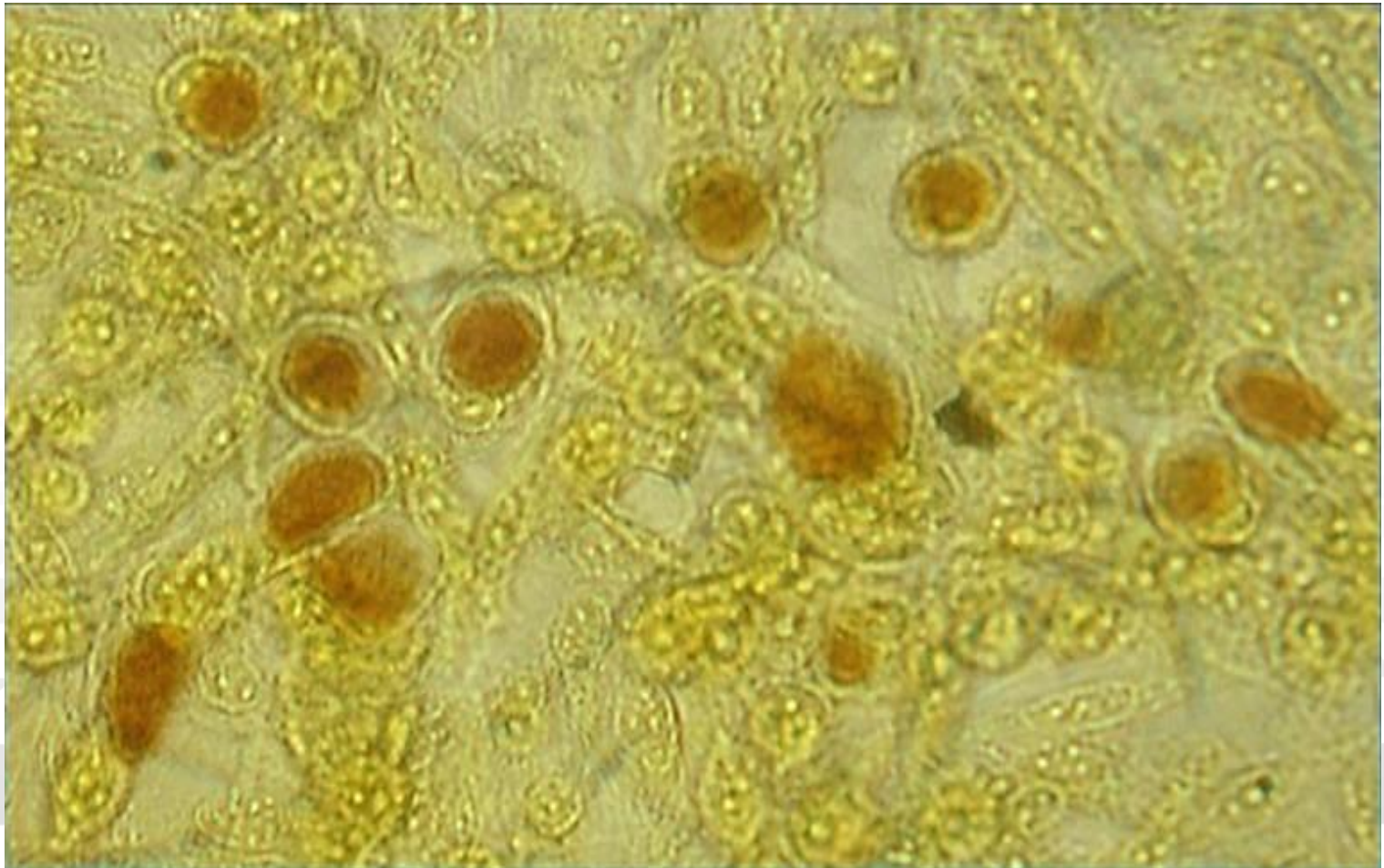
- **原理：**
衣原体在瘤细胞生长，染色检测
- **方法：**
 - ① 制备McCoy细胞接种标本
(2500 转, 1h), 去上清加新培养液 (培养48---72h)
 - ② 检测 (碘或姬姆萨染色, 荧光法)





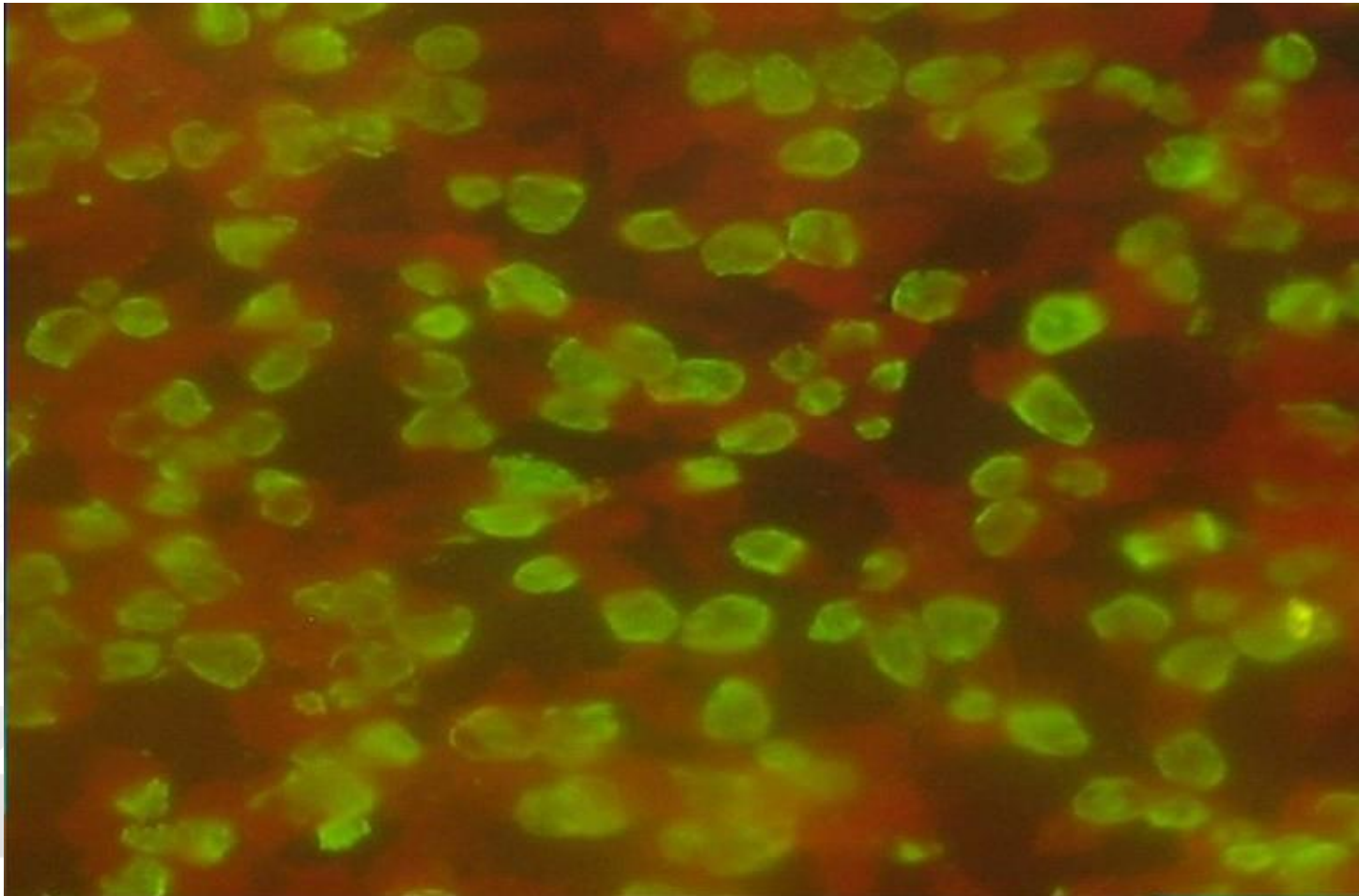


细胞培养法





细胞培养法





细胞培养法检测临床应用

☆敏感性：52—92% 低

☆特异性：99—100% 高

缺点：实验室条件和实验技术要求高，
费时，敏感性低

临床应用：“金标准”方法
方法学评价

沙眼衣原体感染的确证

沙眼衣原体感染的科研



衣原体阳性临床

No. _____ Date _____					No. _____ Date _____				
后来报告时间	科别	病名/检查	性别/年龄	科室	后来(CT)	检查者	送检医生	医师姓名	报告时间
2015.4.17	妇科	宫颈炎	女 23	妇科	CT	杨立	马旭芳	马旭芳	2015.4.17
			女 30		CT		马旭芳	李汉强	2015.4.17
2015.4.22	妇科	宫颈炎	女 30		CT		马旭芳		
			女 26		HSV-II		马旭芳		
			女 36		CT		卢斌珠		2015.4.22
			女 39		HSV-I		卢斌珠		
			女 29		HSV-II		卢斌珠		
	妇科	宫颈炎	女 31		CT.UU		雷秀		
			女 34		CT.UU		雷秀		
			女 20		CT.UU		雷秀		
			女 24		CT.UU		雷秀		2015.4.22
			女 25		CT.UU		雷秀		
			女 44		CT.UU		雷秀		
			女 22		CT.UU		雷秀		
			女 26		CT.UU		雷秀		2015.4.22
			女 23		CT.UU		雷秀		2015.4.22
			女 46		CT.UU		雷秀		2015.4.22
			女 23		CT.UU		雷秀		2015.4.22



衣原体检测阳性应用

- 1.单纯从尿道、阴道中检出衣原体，而没有任何伴随的症状，无需治疗。
- 2.检出衣原体，同时有生殖道炎症或合并性传播疾病，需进行抗衣原体治疗。
- 3.孕前检查发现衣原体阳性，有症状或生育要求时，建议男女双方同时检查，衣原体阳性者，应正规治疗。



- 生殖道沙眼衣原体感染是很常见的性传播疾病。
- 沙眼衣原体引起的疾病范围广泛，可累及眼、生殖道、直肠等多个脏器，也可导致母婴传播。
- 沙眼衣原体感染的防治具有十分重要的公共卫生和临床意义。



常规检测项目值得思考的几个问题

- (1) 是否选择好的方法学及灵敏度和特异性都较好的试剂。
- (2) 是否严格按sop文件规范做好日常的操作。
- (3) 是否全员切实树立室内质控的理念并严格实施。
- (4) 室间质评结果是否真实反映本身实验室的水平。



南宁市第二人民医院
NANNING SECOND PEOPLE'S HOSPITAL
广西医科大学第三附属医院

谢谢大家!

