

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 513—2016

生殖道沙眼衣原体感染诊断

Diagnosis of genital chlamydia trachomatis infection

2016-11-29 发布

2017-06-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

目 次

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 前言 | III |
| 1 范围 | 1 |
| 2 术语和定义 | 1 |
| 3 诊断依据 | 1 |
| 4 诊断原则 | 2 |
| 5 诊断标准 | 2 |
| 6 鉴别诊断 | 2 |
| 附录 A (规范性附录) 生殖道沙眼衣原体标本采集方法 | 3 |
| 附录 B (规范性附录) 生殖道沙眼衣原体细胞学检测和抗原检测 | 4 |
| 附录 C (规范性附录) 生殖道沙眼衣原体核酸检测 | 7 |

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：首都医科大学附属北京地坛医院、首都医科大学附属北京佑安医院、首都医科大学宣武医院、中国医学科学院北京协和医院、中国医学科学院皮肤病研究所、广东省皮肤性病防治中心。

本标准主要起草人：陈志海、伦文辉、吴昊、连石、郑和义、王千秋、郑和平、吴焱、朱威、刘安、宋蕊。

生殖道沙眼衣原体感染诊断

1 范围

本标准规定了生殖道沙眼衣原体感染的诊断依据、诊断原则、诊断标准和鉴别诊断。

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生殖道沙眼衣原体感染的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

衣原体 *chlamydia*

一类严格细胞内寄生、有独特发育周期、能通过细菌滤器的原核细胞型微生物。衣原体进入宿主细胞后增大繁殖成为网状体,再发育成熟为小的、致密的原体,释放到细胞外感染新的宿主细胞。

注:根据衣原体的抗原结构和 DNA 同源性特点,衣原体属分为沙眼衣原体、肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体和家畜衣原体等。根据主要外膜蛋白(MOMP)的不同,沙眼衣原体可分为不同的血清型,其中 D、Da、E、F、G、H、I、Ia、J、K、Ga 血清型主要感染生殖道,引起尿道炎、宫颈炎等。

2.2

生殖道沙眼衣原体感染 *genital chlamydia trachomatis infection*

由沙眼衣原体引起的以生殖道部位炎症为主要表现的性传播疾病,包括无症状沙眼衣原体感染者和患者两类。前者仅在实验室检查中发现沙眼衣原体,但无相应临床表现,后者同时具有生殖道症状体征。

2.3

莱特尔综合征 *Reiter syndrome*

感染后出现以结膜炎、尿道炎、关节炎为特点的三联症,多见于成年男性。

注:生殖道沙眼衣原体感染所致的莱特尔综合征一般发生在尿道炎之后 4 周左右,患者关节液中可分离到衣原体。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

有不安全性行为史,或性伴感染史,或多性伴史。

3.2 临床表现

3.2.1 男性生殖道沙眼衣原体感染

潜伏期平均 1 周~3 周,多数感染者症状轻微。有症状者主要表现为尿道刺痛或痒感,部分伴有轻重不等的尿频、尿急、尿痛、排尿困难及阴茎体局部疼痛。尿道口轻度红肿,可有少量稀薄浆液性或浆液脓性分泌物。长时间不排尿或晨起首次排尿前可见尿道口分泌物结成黏糊状,或分泌物污染内裤。部分感染者并发前列腺炎、附睾炎。偶有感染者出现莱特尔综合征。

3.2.2 女性生殖道沙眼衣原体感染

潜伏期平均 1 周~3 周,多数感染者症状轻微。有症状者主要表现为白带异常及下腹部不适,可伴

有轻度尿频、尿急、尿痛。可见宫颈充血、水肿及浆液性或浆液脓性分泌物，触之易出血。部分感染者并发急性输卵管炎、子宫内膜炎、盆腔炎等。

3.3 实验室检查

3.3.1 涂片镜检，采样方法见附录 A，涂片镜检方法见附录 B 的 B.1，判断标准如下：

- a) 男性尿道分泌物革兰染色涂片检查，平均每视野白细胞计数 ≥ 5 个(油镜 10×100 倍)。晨尿(前段尿 15 mL)沉淀物检查，平均每视野白细胞计数 ≥ 10 个(高倍镜 10×40 倍)。
- b) 女性宫颈黏液脓性分泌物革兰染色涂片检查，平均每视野白细胞计数 ≥ 10 个(油镜 10×100 倍)。

3.3.2 对分泌物标本进行细胞培养，沙眼衣原体阳性，方法见附录 B 的 B.2。

3.3.3 对分泌物标本进行抗原检测，沙眼衣原体抗原阳性，方法见附录 B 的 B.3。

3.3.4 对分泌物标本进行核酸扩增法检测，沙眼衣原体核酸阳性，方法见附录 C。

4 诊断原则

根据流行病学史、临床表现及实验室检查进行综合分析，作出诊断。

5 诊断标准

5.1 确定诊断

符合 3.2、3.3.1 表现，以及 3.3.2、3.3.3、3.3.4 中之一，同时有或无 3.1。

5.2 无症状感染

符合 3.3.2、3.3.3、3.3.4 之一，同时有或无 3.1。

6 鉴别诊断

6.1 淋病

多数男性淋病患者临床表现明显，起病急，自尿道口流出大量黄色脓性分泌物，呈急性尿道炎表现。多数女性淋病患者无明显症状，有症状者表现为脓性白带、宫颈充血、尿道口充血和脓性分泌物等。分泌物涂片可见多形核白细胞，白细胞内可见革兰阴性双球菌。分泌物培养或核酸扩增法检测淋球菌阳性。

6.2 其他

女性患者还应该注意与外阴阴道假丝酵母菌病、滴虫性阴道炎、细菌性阴道病、生殖道支原体感染相鉴别。

附录 A

(规范性附录)

生殖道沙眼衣原体标本采集方法

A.1 尿道标本采集方法

A.1.1 男性尿道拭子:将拭子插入男性尿道内 2 cm~4 cm,旋转拭子 3 s~5 s 后取出。

A.1.2 女性尿道拭子:用手指自耻骨下方沿女性尿道走向轻轻按摩,观察尿道口有无分泌物。将尿道拭子插入尿道内 1 cm~2 cm,轻轻转动后取出。

A.1.3 采样前应至少 1 h 内不排尿。

A.2 宫颈标本采集方法

A.2.1 拭子采样:清洁宫颈口外表面,然后将拭子插入宫颈内 1 cm~1.5 cm 处,轻轻压迫并转动拭子 15 s~20 s 后取出,获取柱状上皮细胞标本。拭子采样时应避免碰到阴道壁。

A.2.2 细胞刷采样:清洁宫颈口外表面,将细胞刷插入宫颈管内 1 cm~1.5 cm 处,旋转数圈,停留数秒后取出。孕妇不应选择细胞刷采样方法。

A.3 尿液标本采集方法

A.3.1 采集清晨首次尿液或禁尿 2 h~4 h 后尿液,尿液量 15 mL。

A.3.2 采集的尿液应置于无菌容器。24 h 以内检测的尿液,应置于 4 °C 冰箱保存,超过 24 h 检测时,应冻存于-20 °C 冰箱。

附录 B

(规范性附录)

生殖道沙眼衣原体细胞学检测和抗原检测

B.1 涂片镜检

B.1.1 仪器材料包括：

- a) 显微镜；
- b) 革兰染液、吉姆萨染液、丙酮；
- c) 检验标本：男性尿道拭子、女性宫颈拭子。

B.1.2 操作步骤如下：

- a) 涂片固定：将标本均匀地涂布于载玻片上，空气中自然干燥；通过火焰固定后进行革兰染色；
- b) 染色方法包括：
 - 1) 革兰染色：结晶紫染色 30 s~60 s，流水冲洗；
 - 2) 碘液染色 60 s，水洗；95%乙醇脱色 30 s~60 s，水洗；
 - 3) 用沙黄或碱性复红液复染 30 s，水洗。
- c) 镜检及结果判定方法为：
 - 1) 革兰染色结果：使用 100×油镜检查多形核白细胞；
 - 2) 男性尿道分泌物平均每视野 ≥ 5 个为阳性，有临床意义；
 - 3) 女性宫颈口黏液脓性分泌物平均每视野 ≥ 10 个为阳性，有临床意义。

B.2 细胞培养法

B.2.1 仪器材料包括：

- a) 二氧化碳培养箱、倒置显微镜、培养瓶、培养板、圆形盖玻片、恒温离心机；
- b) 敏感细胞株有 McCoy、HeLa229 或 BHK-21 细胞等；
- c) 胰酶-EDTA 液、蔗糖-磷酸盐标本运送培养基、衣原体生长培养基、衣原体分离培养基；
- d) 染色液：碘染色液、吉姆萨染色液或衣原体荧光单克隆抗体试剂；
- e) 检验样本：男性尿道拭子、女性宫颈拭子。

B.2.2 操作步骤如下：

- a) 按照下列方法进行标本接种及感染细胞：
 - 1) 取生长良好的单层细胞，加入 0.5 mL~1 mL 标本（冻存样本先置于 35℃水浴中速溶），每份样本接种 2 孔；
 - 2) 每板设阳性和阴性对照孔；
 - 3) 将接种后的培养板于 22℃~35℃、3 000×g 条件下离心 1 h，去除标本液，每孔加衣原体培养基 1 mL，培养 48 h。
- b) 染色鉴定方法包括：
 - 1) 碘染色：培养孔弃去培养液，每孔加入 0.2 mL 甲醇，固定感染细胞 10 min，弃去甲醇后加碘液 0.2 mL，染 5 min~10 min，取出盖玻片置显微镜下观察结果；
 - 2) 吉姆萨染色：培养孔弃去培养液，每孔加入 0.2 mL 甲醇，固定感染细胞 10 min，弃去甲醇后加吉姆萨染液 0.2 mL，染 30 min，取出盖玻片置显微镜下观察结果；

- 3) 直接免疫荧光法:感染细胞的盖玻片用甲醇固定 10 min,弃去甲醇后加荧光标记单克隆抗体,37 ℃染 30 min,洗涤数次,用碱性甘油封片后荧光显微镜下检查。

B.2.3 结果报告:显微镜检查,碘染色见细胞内深棕色包涵体,或吉姆萨染色见细胞内紫红色包涵体,或荧光单抗染色见苹果绿色荧光的包涵体和原体,均提示有沙眼衣原体生长。

B.2.4 注意事项如下:

- a) 细胞培养法是诊断沙眼衣原体感染检测的“金标准”,特异性可达 100%,其敏感性依实验室和样本类型而不同;
- b) 尿液、精液标本,以及患者使用抗生素或阴道制剂后采集的样本,不宜做衣原体培养;
- c) 第一孔染色阴性时,将第二孔进行盲传,可增加 1%~29%的阳性率;
- d) 直接免疫荧光法敏感性优于碘染色和吉姆萨染色,培养 36 h~48 h 即可进行鉴定。

B.3 抗原检测法

B.3.1 酶联免疫吸附试验法(ELISA)

B.3.1.1 仪器材料包括:

- a) 酶标仪、洗板机;
- b) 标本处理液、阳性对照、阴性对照、酶标抗体结合物、洗液、底物、终止液;
- c) 检验样本:男性尿道拭子、女性宫颈拭子和尿沉渣等。

B.3.1.2 操作步骤如下:

- a) 抗原提取:在标本中加入样本处理液,振荡数秒钟,充分混匀;取阳性和阴性对照,加入样本处理液;将样本和阴、阳性对照管置于 95 ℃~100 ℃水浴中处理后冷却至室温;
- b) 加样:将阴、阳性对照和样本分别加入酶标板中,孵育;
- c) 加酶结合物:洗板后,加入酶标抗体,孵育;
- d) 显色:洗板后,加入底物,避光显色数秒;
- e) 终止:加入终止液,置酶标仪检测各孔吸光值(OD 值)。

B.3.1.3 结果判定方法:

- a) 计算阴性质控平均值及临界值(cut-off 值);
- b) 阳性:标本 OD 值大于或等于 cut-off 值;
- c) 阴性:标本 OD 值小于 cut-off 值。

B.3.2 抗原快速检测试验(免疫层析试验)

B.3.2.1 仪器材料包括:

- a) 恒温水浴箱;
- b) 抗原提取液、阳性质控物、阴性质控物、检测板;
- c) 检验样本:男性尿道拭子、女性宫颈拭子和尿沉渣等。

B.3.2.2 操作步骤如下:

- a) 将拭子置于采集管内,加入抗原提取缓冲液;
- b) 80 ℃恒温水浴中作用 5 min~8 min,放置室温冷却;
- c) 在管壁旋转挤压拭子,充分释放液体后弃去拭子;
- d) 滴加标本提取物于检测板的检测窗,静置规定时间。

注:静置时间参考生产厂家的使用说明书。

B.3.2.3 结果判定方法:

- a) 阳性:结果窗出现条带,质控窗出现条带;

- b) 阴性:结果窗未出现条带,质控窗出现条带;
- c) 试验无效:质控窗未出现条带。

B.3.3 直接免疫荧光法

B.3.3.1 仪器材料包括:

- a) 荧光显微镜;
- b) 荧光标记的抗沙眼衣原体单克隆抗体、阳性和阴性对照片、磷酸盐缓冲液、碱性甘油封片剂;
- c) 检验样本:男性尿道拭子、女性宫颈拭子和尿沉渣等。

B.3.3.2 操作步骤如下:

- a) 将标本均匀涂布于载玻片上,空气中自然干燥,甲酮固定 10 min;
- b) 标本、阴性和阳性对照载玻片中,各滴加荧光标记抗沙眼衣原体抗体 30 μL ,覆盖整个标本;
- c) 置于湿盒中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;
- d) 磷酸盐缓冲液洗涤数次,空气干燥;
- e) 滴加碱性甘油后加盖玻片,荧光显微镜(40 \times 10 倍)下观察结果。

B.3.3.3 结果判定方法:

- a) 阳性:每片可见 ≥ 10 个单一针尖样发苹果绿荧光颗粒;
- b) 可疑:每片可见 < 10 个单一针尖样发苹果绿荧光颗粒,应重新采集样本检测;
- c) 阴性:未发现典型发苹果绿荧光颗粒。

附录 C

(规范性附录)

生殖道沙眼衣原体核酸检测

C.1 核酸扩增试验

C.1.1 总述

通过扩增沙眼衣原体的 7.5 kb 隐蔽性质粒 (cryptic plasmid)、主要外膜蛋白基因 (omp1) 和 16SrRNA 等靶基因来检测病原体。omp1 基因为 1.2 kb DNA, 包括 4 个可变区和 5 个保守区, 由于每个衣原体只有一个 omp1 基因, 故用其检测特异性高, 但敏感性稍差; 隐蔽性质粒为 7.5 kb DNA, 每个衣原体含有 7~10 个拷贝, 故检测的敏感性较高; 16sRNA 数量与衣原体繁殖及活跃程度相关, 检测敏感性主要取决于模板 RNA 的提取效果。目前主要使用的方法为实时荧光聚合酶链式反应 (PCR)。

C.1.2 实时荧光 PCR 技术

C.1.2.1 仪器材料包括:

- a) 荧光 PCR 仪。
- b) 检验样本: 男性尿道拭子、女性宫颈拭子和尿沉渣等。
- c) 扩增引物设计: 沙眼衣原体隐蔽性质粒引物设计位置常见于 5 个区域, 分别于 202~943、1 206~1 965、2 539~3 222、5 308~5 802 和 6 787~7 499。如扩增区域 270~378 的引物与探针, 上游: 5'-CAG CTT GTA GTC CTG CTT GAG AGA-3', 下游: 5'-CAA GAG TAC ATC GGT CAA CGA AGA-3', TaqMan 探针: FAM-5'-CCC CAC CAT TTT TTC CGG AGC GA-TAMRA -3'。omp1 引物设计, 如扩增区域 199~414 的引物: 上游: 5'-GAC TTT GTT TTC GAC CGT GTT-3', 下游: 5'-ACA RAA TAC ATC AAR CGA TCC CA-3', TaqMan 探针: FAM-MGB-5'-ATC TTT ACV AAY GCY GCT T- TAMRA 3'。
- d) DNA 抽提液, PCR 反应液, 临界阳性质控标准品, 阴性和阳性质控品。

C.1.2.2 操作步骤如下:

- a) DNA 提取 (可使用商品化 DNA 提取试剂盒按说明进行提取): 将标本充分洗脱至无菌生理盐水中, 离心沉淀; 沉淀中加 DNA 提取液并充分混匀, 沸水浴处理 10 min, 转至 4 °C 静置以保证充分裂解; 离心沉淀, 取上清液做 PCR 反应模板液; 质控品处理: 取阴、阳性对照质控标准品加 DNA 提取液混匀, 提取 DNA 方法同标本。
- b) 加样: 根据待检测样本数量将 PCR 反应液分装至 PCR 反应管中, 然后分别加入已处理好的待检样品, 阴性和阳性质控标准品, 以及临界阳性质控标准品, 加盖后离心数秒钟。
- c) PCR 扩增: 将各反应管放入实时荧光 PCR 仪, 按对应顺序设置阴阳性质控标准品以及未知标本, 并设置样品名称、标记荧光基团种类和扩增条件。设置扩增参数: 依据试剂盒和仪器的不同而有所不同, 如 95 °C 变性 5 min, 以 95 °C 30 s、60 °C 30 s 扩增 40 个循环, 在 60 °C 进行荧光检测。

C.1.2.3 结果判定方法:

- a) 根据分析后图像调节基线起始、终止值以及阈值。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点, 或可根据仪器噪音情况进行调整。
- b) 仪器自动判断测定结果。

C.2 质量控制

C.2.1 制定实验室质量保证与质量控制计划。

C.2.2 建立实验室质量控制制度。

C.2.3 定期参加实验室室间检测能力验证活动。
