维普资讯 http://www.cqvip.com

(19)
229-232

重庆医科大学学报 1993年第18卷第3期

泌尿生殖道沙眼衣原体分离培养方法探讨*

微生物学教研室 朱道银 朱汉林 李 伟 王 毅 秦亚恬 裘润芳

R446.5

提 要 本文采用放线菌酮处理的McCoy细胞分离培养泌尿生殖道沙眼衣原体。450例宫颈炎，盆腔炎患者培养阳性234人(52%)，30例男性尿道炎患者培养阳性15人(50%)，提示沙眼衣原体引起的泌尿生殖道感染在国内十分常见。249份阳性中二次传代阳性73人(29.3%)，放线菌酮最适浓度为1～4μg/ml，经离心处理的标本包涵体形成数明显高于不离心标本。用放线菌酮处理细胞、离心、二次传代在分离培养该病原体中是必不可少的步骤

关键词 沙眼衣原体；沙眼衣原体培养；泌尿生殖道感染 泌尿生殖系统

中图分类号 R446.5

沙眼衣原体是重要的性传播疾病病原体之一，其引起泌尿生殖道的感染远远超过淋球菌。实验室诊断的方法虽然有多种，但分离培养仍是最可靠的方法。沙眼衣原体专营细胞内寄生，常用细胞培养法作分离培养，使用的细胞有McCoy，Hela229、BHK-21[1]。本文主要参照Ehret等[1]的方法，采用McCoy细胞分离培养泌尿生殖道沙眼衣原体，报道480名宫颈炎、尿道炎患者的检查结果并对主要实验条件作探讨。

材料和方法

1. 材料

（1） McCoy细胞 由北京市眼科研究所提供。

（2） 培养基 ①细胞培养基含改良Eagle培养基(MEM，GIBCO出品)9.4g，HEPES(中国科学院上海生化所出品)4.5g，重蒸水1000ml，过滤除菌。用前加入10%胎牛血清，调PH为7.2～7.4，用于McCoy单层细胞培养。②接种培养基是在细胞培养基内加入1μg/ml放线菌酮（Cyclohexiimide，瑞士分装），庆大霉素10μg/ml，万古霉素50μg/ml，二性霉素2μg/ml和0.06%葡萄糖。用于接种临床标本后培养衣原体。③转送培养基用于运送和保存临床标本，含0.21%K_2HPO_4，0.11%KH_2PO_4，68.5%蔗糖，8磅高压灭菌后加入3%胎牛血清，庆大霉素10μg/ml，万古霉素100μg/ml，二性霉素5μg/ml，用无菌试管分装为每支1ml，4℃保存备用。

（3） 5%碘液：取碘化钾15g溶于95%乙醇50ml，再加5g碘，溶解后加入50ml蒸馏水，过滤后存于棕色瓶中，用于衣原体包涵体染色。

（4） 沙眼衣原体标准株TE55卵黄囊培养物，由北京市眼科研究所提供。

（5） 沙眼衣原体荧光单克隆抗体（北京科生技术公司出品）。

2. 临床标本

于1990年10月至1991年12月在本校第一附属医院妇产科、泌尿科门诊收集。病员年龄分布19～55岁，其中19～35岁青年居多。450名女性患者临床诊断为宫颈炎、盆腔炎、尖锐湿疣等；30名男性患者临床诊断为非淋菌性尿道炎。

3. 方法

（1） 标本采集：对女性患者，暴露子宫颈，用拂拭拭去宫颈表面分泌物，取一木制刮片伸入子宫颈管内1—2cm刮取上皮细胞，收集于预冷的转送培养基中，3h内送回实验室－60℃冰箱保存。对男性患者，用接种环伸入尿道4cm反复刮取上皮细胞，用同法送实验室保存。

* 四川省卫生厅资助课题

维普资讯 http://www.cqvip.com

（2） 单层细胞培养：将细胞培养瓶中生长良好的McCoy细胞，用0.02%EDTA消化，吹散后分装于含有一直径约8mm的圆形盖玻片的平底螺盖试管中，36℃ 温育 48～72h，检查细胞长势，直至盖玻片上单层细胞铺满。

（3） 标本接种：取出冻存的临床标本，室温中融化后用吸管反复吹打以破碎上皮细胞。将0.5ml标本液加入生长良好的单层细胞管中，每份标本接种两支试管，水平离心机中室温2000g离心1h，置36℃温育2h，弃去培养液，加入1ml接种培养基，置36℃ 温育48h。每批实验均设正常单层细胞对照和阳性对照。

（4） 染色及结果判定：每份标本取一支细胞管检查，弃去培养液后用PBS清洗单层细胞一次，加0.5ml含10%乙醚的甲醇固定 10m。弃甲醇，再加过滤碘液染20m。从试管中取出盖玻片，将细胞生长面贴于加有一滴碘甘油（碘液甘油各半）的载玻片上，置显微镜下仔细检查包涵体并计数。未查见包涵体的标本需将另一复本盖玻片冻存，融化后作二次传代，传代结果仍未查见包涵体时才判为阴性，任何一次检查发现包涵体者均判为阳性。

（5） 沙眼衣原体标准株接种：取低温保存的TE55卵黄囊培养物接种于7日龄鸡胚卵黄囊，每只鸡胚注射0.1ml。取接种48h后死亡鸡胚之卵黄囊膜一小块，用姬姆萨染色检查包涵体。有大量包涵体形成者，用匀浆器磨碎卵黄囊膜，经稀释后接种单层细胞管，同上法培养及判定结果。

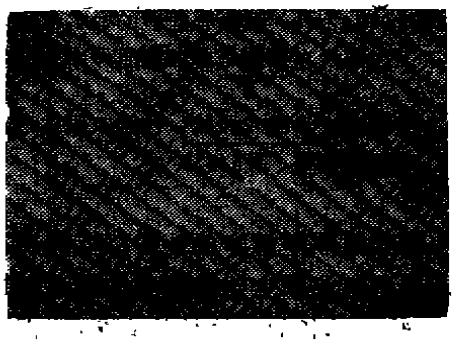
（6） 衣原体荧光单克隆抗体染色：取碘染色检查为阳性或阴性的复本盖玻片、TE55 接种细胞片，正常单层细胞片，干燥后丙酮固定，滴加荧光单抗试剂后湿盒温育30m，蒸馏水洗涤，置荧光显微镜下检查，发现细胞浆内亮绿色圆形小体判为阳性。

（7） 临床标本上皮细胞计数：取新采集的临床标本置血球计数板内计上皮细胞数。经冻融吹打后的标本，置显微镜下检查完整上皮细胞。

（8） 放线菌酮含量及离心步骤的影响：将衣原体阳性培养物反复传代繁殖后接种若干单层细胞管。在接种培养基内加入不同含量放线菌酮，每个浓度三份复本，包涵体计数取平均数，用同法比较经离心处理与不离心标本中包涵体数。

结　果

1. **临床标本检查**　150 份女性标本，培养阳性134份，阴性216份，阳性率52%。男性标本50份，培养阳性15份，阴性15份，阳性率50%。其中，女性标本二次传代后阳性68份(29%)，男性标本二次传代后阳性5份(33%)，占阳性标本总数的29.3%。包涵体位于细胞浆内，圆形，呈黑色或深棕色（见图）。与TE55包涵体形态完全相同。阳性标本包涵体计数结果见表。包涵体数女性平均6.7，男性平均2.9，差异显著（$P<0.01$）。



图：碘染色沙眼衣原体包涵体

表　沙眼衣原体分离物包涵体计数

标本	每盖玻片包涵体数				
	<5	6—10	11—20	>20	
子宫颈	130	56	38	10	6.62
男性尿道	12	3	0	0	2.67

2. **沙眼衣原体荧光单抗染色**　TE55 接种细胞片2张，单抗染色均为阳性，碘染色确定为阳性的细胞片15张，单抗染色阳性14张，阴性1张，碘染色阴性的细胞片5张，正常单层细胞片3张单抗染色均为阴性。

3. **标本上皮细胞检查**　抽查20份女性标本，上皮细胞数为2.5×10^6/ml左右，5份男性标本，上皮细胞数为1×10^6/ml左右。检查20份经冻融吹打后的标本，基本未见到完整上皮细胞。

4. **放线菌酮量效**　接种培养基内放线菌酮浓度分别为12、8、4、2、1、0.5μg/ml，三份复本包涵体平均数分别为1、4、10、

维普资讯 http://www.cqvip.com

12、12.2。

5. 离心 阳性标本接种5份复本，分别经室温2000g离心1h和不离心处理，经离心处理的包涵体平均数为9.4，不离心的包涵体平均数为1.4($P<0.01$)。经2000r/min和4000 r/min离心1h的包涵体平均数分别为9.4、9.0，差异不显著($P>0.5$)。

讨 论

沙眼衣原体是重要的性传播疾病病原体之一，国外报道青春期女性感染率达22%[2]，占女性宫颈炎、盆腔炎的30～50%，男性非淋菌性尿道炎的40～50%[8]。国内该项工作起步较晚，报道甚少。

本文用McCoy细胞分离培养泌尿生殖道沙眼衣原体。450女性病例以宫颈炎、盆腔炎为主，衣原体感染率52%；30男性病例属淋球菌培养阴性的非淋菌性尿道炎，衣原体感染率50%，与国外报道相近。表明国内泌尿生殖道沙眼衣原体感染的严重性，应当引起足够重视。患者大多否认不洁性生活史，对传染源和传播途径等尚需作进一步研究。

一般报道，初次分离培养漏诊达38%[1]，所以首次阴性标本需盲传一代。本文盲传后阴性标本女性18份，男性5份，占阳性标本数的29.3%，提示分离培养过程中盲传步骤不可缺少。包涵体计数女性标本多于男性，与男性标本中上皮细胞数量较少有关。男性尿道采样，常由于病人紧张而影响采样效果。棉拭采样病人较痛苦，不易达到深度。我们改用接种环反复采集，病人痛苦减轻，同样有效。临床标本在直径8mm盖玻片上形成的包涵体大多在20个以下，少数在20个以上，最多一例32个。与Benes等[4]报道相近。

用于分离培养沙眼衣原体的细胞需经处理以抑制细胞DNA和蛋白质合成，促进衣原体生长。常用试剂有放线菌酮、IUdR、DEAE等，而以放线菌酮处理为佳[1,4]。使用时需确定放线菌酮最适浓度，本文观察到接种培养基内含1—4μg/ml放线菌酮时包涵体形成数较多。

临床标本接种后需经离心处理，促进衣原体附着于单层细胞。本文比较离心与不离心的标本包涵体形成数明显差别，提示离心步骤必不可少。离心速度文献报道2000～4000r/min，本文观察离心速度高低对包涵体形成数似无影响。

碘染色操作一般报道在接种标本后48～72h内进行，包涵体位于包浆内呈深棕色至黑色[5]，我们在接种18h后染色，碘染色20m以上，包涵体大多呈黑色。细胞片单用甲醇固定有时发生细胞脱落，加入10%乙醚后效果明显提高。

文献介绍临床标本需经玻璃珠涡漩或超声粉碎上皮细胞，然后接种。我们采用冻融吹打法，镜下检查基本未见完整上皮细胞，简化了超声粉碎步骤。标本中上皮细胞含量多少，标本接种量的多少，单层细胞是否长满盖玻片以及细胞面积的大小均影响分离培养方法的敏感性。我们采用的试管法，标本接种量较多，获得较好效果。近年来推荐使用微滴板培养法[3]，该法虽然省钱省力，但由于标本接种量少，细胞生长面积小而敏感性较低。同时容易发生气溶胶污染。实验室污染也应引起足够重视。细胞培养和标本接种应分室操作，每次接种标本后应严格消毒处理工作场所。

（鸣谢 本工作承本校第一附属医院周永华教授、卞宽宏教授、张建华、丘彦医师大力支持，特致谢）。

参 考 文 献

[1] Ehret JM et al. Clin Lab Med 1989; 9:481.

[2] McGregor JA. Obstet Gynecol Clin Nor AM 1989; 16:565.

[3] Stamm WE. Ann Inter Med 1988; 108:710.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[4] Benes S,et al. J Clin Microbiol 1982; 16:847.
[5] Graham DM,Colle JG et al.Practical Microbiology 1989; 769

(收稿日期 1992—10—06)

A STUDY OF METHODS FOR CULTIVATION AND ISOLATION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN GENITOURINARY TRACT

Zhu Daoyin, et al

Dept. of Microbiology

Chlamydia trachomatis in genitourinary tract were cultivated and isolated by culturing McCoy cells treated with cycloheximide. Of the 450 cases of cervicitis or inflammatory diseases,234(52%) positive cultures were detected.15(50%) positive cultures were detected in 30 cases of urethritis in men. It was suggested that genitourinary infections caused by C.trachomatis were common in our country. Of 249 positive cultures, 73(29.3%) were detected by the second passage. Cycloheximide optimal concentration in inoculation media was 1—4μg/ml. Inclusion number of the samples centrifuged at 2000g was higher than that of uncentrifuged samples. Cells treated with cycloheximide,centrifugation, and a second passage were necessary for cultivation and isolation of the pathogen

KEY WORDS C. trachomatis; C. trachomatis cultures; genitourinary infection

(上接221页)

PRIMARY MALIGNANT MELANOMA OF THE VAGINA AND CERVIX: A CLINICOPATHOLOGIC STUDY OF 10 CASES

Peng Zhenmian, et al

Dept. of Pathology

The clinicopathologic features of ten cases of primary malignant melanoma of vagina and cervix are described. Seven of the tumors are located in vagina, three of them in cervix. Microscopically, the histologic features of the tumors resemble the malignant melanoma of the skin and other mucosa. Melanin is demonstrated in ten cases. S-100 protein has been known present in all cases. The electron microscopic examination of two cases reveal melanosomes in the tumor cells. The results support the diagnosis of primary malignant melanoma. The differential diagnosis is discussed

KEY WORDS Malignant melanoma; S-100 protein; Electron microscope