



中华人民共和国国家标准

GB/T 30224—2013

刚地弓形虫试验临床应用

Clinical use of tests for Toxoplasma gondii

2013-12-31 发布

2014-12-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：北京大学人民医院、首都医科大学友谊医院、首都医科大学附属北京朝阳医院。

本标准主要起草人：张正、岳志红、赵晓涛、苏建荣、许淑珍、王清涛。

刚地弓形虫试验临床应用

1 范围

本标准规定了刚地弓形虫临床实验室检验方法、标本的采集和处理、安全预防措施和免疫诊断试验的临床应用。

本标准适用于开展刚地弓形虫检测的临床实验室。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

实验室生物安全手册(第三版)世界卫生组织 2004 年

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

刚地弓形虫 *Toxoplasma gondii*

弓形虫是法国 Nicolle 和 Manceaux(1908 年)首先从非洲刚地梳趾鼠(*Ctenodactylus gondii*)体内单核细胞发现的,由于该虫的滋养体似弓形或半月形,故命名为刚地弓形虫。

3.2

弓形虫病 *toxoplasmosis*

由刚地弓形虫引起的一种人畜共患病,通过先天性和获得性两种途径获得感染。

4 检验方法

4.1 刚地弓形虫病原学检查

4.1.1 直接镜检

用于直接观察寄生虫的标本包括分泌物、排泄物、体液和组织。液体标本应 2 000 r/min 离心 10 min,取沉淀制成显微镜涂片。经干燥、固定和 Giemsa 法染色后镜检,以发现速殖子、变性虫体。组织印片 Giemsa 法染色可检测到刚地弓形虫包囊,也可以检测到假包囊或速殖子。在少数情况下,确诊弓形虫病依据病原学检查。

4.1.2 接种和组织培养

将患者组织或体液接种于小鼠或组织培养细胞获得虫体或进行被接种动物的血清学检测。

4.1.3 抗原检测-酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

血清或体液中的循环抗原比特异性抗体出现早,是病原体存在的确证。可使用 ELISA 双抗体夹心

法检测。

4.1.4 核酸检测

为确定是否感染,可应用 PCR 技术检测虫体 DNA。靶基因从 B1 基因和 AF146527 序列等选取。血液、尿液、脑脊液、羊水、眼部体液和支气管灌洗液刚地弓形虫 DNA 检测阳性是活动性感染的有力证据,但虫体 DNA 阴性并不能排除弓形虫病。

4.2 刚地弓形虫抗体检测

4.2.1 概述

血清学检测刚地弓形虫抗体是目前临床实验室主要的诊断方法。通常,不能根据一种抗体做出确诊,需进行多种抗体联合检测。如果患者妊娠期采集的两份标本发生血清学从阴性到阳性的转变,可以作为确诊依据。刚地弓形虫抗体检测方法中详细注意事项参见附录 A。

4.2.2 刚地弓形虫 IgG 抗体检测

4.2.2.1 IgG 抗体-Sabin-Feldman 染色试验(Sabin-Feldman dye test,DT)

DT 是标准试验。将患者血清与刚地弓形虫速殖子活体、辅助因子和甲基兰染液共同孵育。如果患者体内有刚地弓形虫抗体,虫体的细胞壁溶解,不能吸收染液。DT 检测的早期 IgG 抗体通常出现于感染 1 周~2 周,6 周~8 周滴度达到高峰。此试验敏感性和特异性高,由于活的虫体培养有一定的难度,对实验室生物安全防护有较高要求,因此临床实验室多用其他方法替代 DT。

4.2.2.2 IgG 抗体-间接血凝试验(indirect hemagglutination test,IHA)

IHA 试验是将患者血清和经鞣酸处理的可溶性虫体抗原致敏红细胞共同孵育。如果患者体内有刚地弓形虫抗体,红细胞将凝集。IHA 试验适于大量血清标本流行病学调查检测,缺点是红细胞质量和抗原的变化较难控制。但是,IHA 检测的抗体迟于 DT 出现,不适于患者早期诊断。

4.2.2.3 IgG 抗体-凝集试验

直接凝集(direct agglutination,DA):血清经 2-巯基乙醇处理,与经甲醛处理后的速殖子孵育。如果患者体内有刚地弓形虫抗体,虫体发生凝集。DA 试验操作简便、无种属特异性。

乳胶凝集(latex agglutination,LA):未经前处理的患者血清与抗原致敏的乳胶颗粒反应。如果有刚地弓形虫抗体,则发生凝集。LA 试验操作简便价廉,可用于刚地弓形虫 IgG 抗体筛查。由于非特异性 IgM 反应,可出现少量假阳性。

鉴别凝集(differential agglutination,AC/HS):比较丙酮处理(AC)速殖子和甲醛处理(HS)速殖子的凝集反应有助于区别急性和慢性感染。急性感染患者血清标本可使 AC 和 HS 虫体悬液均凝集;慢性感染患者血清标本 HS 高滴度凝集,AC 低滴度凝集或阴性。

4.2.2.4 IgG 抗体-间接荧光抗体试验(indirect fluorescent antibody test,IFA)

IFA 试验采用甲醛固定完整速殖子涂片,经空气干燥作为抗原。患者血清与抗原涂片孵育,加入荧光素标记抗人免疫球蛋白抗体。IFA 已替代 DT 广泛应用。抗核抗体阳性患者可出现假阳性反应。对于每周筛查少于 10 份血清标本的临床实验室,IFA 试验是理想的测定方法。

4.2.2.5 IgG 抗体-ELISA

ELISA 是刚地弓形虫 IgG 抗体筛查应用最广泛的试验。可溶性抗原包被于固相载体;患者血清与

抗原、酶标记抗人抗体(结合物)和底物孵育;分光光度计读取颜色变化。与 DT 和 IFA 试验结果比较,敏感性高。有些 ELISA 试剂盒,血清热灭活可导致假阳性反应。

4.2.2.6 IgG 抗体-IgG 亲合力

ELISA-IgG 检测经改变测定模式或改良后可用于确定刚地弓形虫 IgG 抗体结合抗原的亲合力,并已发现是一个判断慢性感染的最有用的指标,可排除急性感染。方法为同时检测双份血清标本,其中一份经尿素处理分离低亲合力抗体。计算两个终点滴度比值,以百分数表示。

4.2.3 刚地弓形虫 IgM 抗体检测

4.2.3.1 IgM 抗体-IFA

IFA-IgM 试验和 IFA-IgG 试验相似,只是采用了抗 IgM 的结合物。多数患者感染后 1 周内滴度升高,6 个月~9 个月转为阴性。由于未去除血清标本中 IgG,IFA-IgM 试验可观察到类风湿因子引起假阳性和刚地弓形虫 IgG 抗体封闭引起假阴性,敏感性较差。建议检测前处理标本以降低这些干扰因素影响。

4.2.3.2 IgM 抗体-ELISA

ELISA-IgM 试验主要有捕获法和间接法两种类型。ELISA-IgM 试验检测新生儿先天性刚地弓形虫感染的阳性率较 IFA-IgM 试验高。急性获得性感染可在感染的 6 个月内检测到 IgM 抗体,最长可至 18 个月。这些试验不适于确定孕妇感染时间。

4.2.3.3 IgM 抗体-免疫吸附凝集试验 (immunosorbent agglutination, ISAGA)

IgM-ISAGA 同时采用了 ELISA 中 IgM 捕获步骤和 DA 试验中完整虫体抗原,此试验用于先天性感染的诊断比 IFA-IgM 和 ELISA-IgM 更敏感。缺点是 ISAGA 法比 ELISA 法可在更长的感染时间内检测到 IgM 抗体,因此该试验不适于确定孕妇感染时间。

4.2.4 刚地弓形虫 IgA 抗体检测

刚地弓形虫 IgA 抗体检测是判断新生儿感染的一个附加方法。所有怀疑先天性感染的新生儿应同时检测血清 IgA 和 IgM 抗体,先天性感染的新生儿 IgA 抗体比 IgM 抗体更常见。

4.2.5 刚地弓形虫 IgE 抗体检测

刚地弓形虫 IgE 抗体检测是确定急性感染的辅助指标。血清 IgE 抗体可持续数月,阴性结果并不能排除急性感染。

5 标本采集和处理

大多数实验室使用商品诊断试剂盒检测刚地弓形虫抗体。诊断试剂盒制造商必须明确检测的标本类型。血清、血浆、脑脊液和眼部体液标本都可用于抗体和抗原检测。脑脊液和眼部体液应与同一时间采集的血清标本平行检测。建议操作者遵循制造商的试剂说明书。标本 4℃ 可储存数天,冷冻可储存时间更长。除非运送时间超过 1 周或温度极高,标本可在常温下运送。

除抗体检测之外,其他试验采集标本前应与实验室联系以确保标本正确的采集和处理。

6 安全预防措施

因不确定临床标本是否含有感染性物质,所以,所有标本都应当作为感染性对待,依据《实验室生物

安全手册》处理。

7 免疫诊断试验的临床应用

7.1 确定抗体状况

筛查一份血清标本的 IgG 抗体, IFA 或 ELISA 即可。试验结果阴性表明患者未受感染。任何程度阳性均表明已感染了刚地弓形虫。以下情况应确定血清中是否存在刚地弓形虫抗体:

- 育龄妇女妊娠前;
- 免疫抑制(特别是 T 细胞抑制)治疗开始前;
- 首次 HIV 阳性确诊后;
- 器官移植供者捐赠前。

7.2 急性获得性感染的诊断

刚地弓形虫血清学结果的临床意义见表 1。IFA-IgG 或 ELISA-IgG 结果阴性基本上可排除近期刚地弓形虫感染诊断。采用同一试验检测间隔数周时间采集的标本,血清学从阴性到阳性转变或滴度升高超过 4 倍,可明确诊断。IgG 抗体阳性时,ELISA-IgM 和 IgG 亲合力检测结果能够提供额外的证据支持或否定近期感染。IgM 阴性基本上可排除最近几个月感染。IgM 和 IgG 均阳性可提示近期感染;但是,一些患者初始感染后可检测到 IgM 抗体长达 18 个月。孕妇感染应进行 IgG 亲合力检测。妊娠 12 周~16 周 IgG 高亲合力基本上可排除妊娠期间获得感染。怀疑孕妇近期感染,采取干预措施之前应将标本送至有诊断弓形虫病经验的实验室比对。

表 1 刚地弓形虫血清学结果的临床意义

IgG 结果	IgM 结果	临床意义及处理
—	—	无刚地弓形虫感染的血清学证据。如果症状持续存在,3 周后重新采集标本检测
—	±	可能早期急性感染或 IgM 假阳性。3 周后重新采集标本检测 IgG 和 IgM。如果两份结果相同,患者可能未感染刚地弓形虫
—	+	近期急性感染或 IgM 假阳性。3 周后重新采集标本检测 IgG 和 IgM。如果两份结果相同,IgM 反应可能是假阳性
±	—	不确定:重新采集标本检测或采用不同方法重新检测此标本 IgG
±	±	不确定:重新采集标本检测 IgG 和 IgM
±	+	可能近期急性刚地弓形虫感染。3 周后重新采集标本检测 IgG 和 IgM。如果两份结果相同或 IgG 阳性,两份标本送至有弓形虫病诊断经验的实验室进一步检测
+	—	通常刚地弓形虫感染超过 6 个月
+	±	刚地弓形虫感染,但 IgM 结果可能由于近期感染或 IgM 假阳性。3 周后重新采集标本检测。如果两份结果相同,两份标本送至有弓形虫病诊断经验的实验室进一步检测
+	+	可能近期感染。标本送至有弓形虫病诊断经验的实验室进一步检测

7.3 先天性感染的诊断

先天性弓形虫病诊断包括孕妇近期感染诊断和证明胎儿感染。先天性弓形虫病可由母婴传播发生。

女性妊娠前 IgG 抗体阳性有免疫力,很少有机会将感染传给胎儿。尽管血清学阴性女性视为易感人群,但孕妇是否需要筛查应由专科医师根据具体临床情况决定。妊娠后第 1 次检测 IgG 抗体阳性,则应检测 IgM。如果 IgM 阳性,应进行亲合力检测来确定是否妊娠期间感染。如果孕妇确诊近期弓形虫病,可进行治疗并检测胎儿是否受感染。推荐选择妊娠 18 周羊水 PCR 作为宫内诊断先天性弓形虫病的试验。另外,胎儿出生前应每 2 周~4 周进行 B 超检查,以寻找更多非特异性感染体征。

如果采集胎儿血液标本,应进行病原学检查、刚地弓形虫 IgG、IgM 和 IgA 抗体检测。结合非特异性感染指标检测进行分析以明确先天性感染的诊断。

7.4 新生儿感染的诊断

根据病原学检查及血清抗体检测可做出新生儿刚地弓形虫感染诊断。如果尚未确诊,应尝试从胎盘、羊水和脐带血液分离刚地弓形虫。此外,怀疑患有先天性弓形虫病的新生儿还应进行眼科学检查和头部计算机断层扫描。最终确诊前,临床医师可依据早期体征、症状和血清学试验结果进行治疗。

新生儿是否已受母婴传播感染,应根据各种抗体半衰期,重复检测新生儿血清标本,有助于区分母亲来源的抗体和胎儿产生的抗体。新生儿 IgG 抗体阳性持续 12 个月则可确诊先天性感染。通过免疫印迹技术,检测母亲血清和新生儿血清中独特刚地弓形虫抗体,也可以作为先天性感染依据。

7.5 眼部感染的诊断

多数刚地弓形虫脉络膜视网膜炎病例是由于先天性感染造成。眼部损伤患者除血清中有刚地弓形虫 IgG 抗体外,局部产生 IgG 抗体和房水或玻璃体虫体 DNA 检测已用于确诊活动性眼部弓形虫病。

7.6 免疫功能低下者感染的诊断

各种免疫抑制者经常患有严重的、致命的弓形虫病,最常见的是与潜伏感染复发有关。由于检测不到 IgM 抗体,IgG 抗体阳性可作为潜伏感染提示。弓形虫病可通过组织学或细胞学检查发现虫体在组织中复制,或通过分离或鉴定羊水、脑脊液、支气管灌洗液或胎盘中虫体核酸确诊感染。

器官或骨髓移植患者移植前应检测刚地弓形虫 IgG 抗体,移植前血清学阴性属于易感人群,有急性原发性感染危险,阳性有感染复发危险。急性获得性感染患者常可检测到刚地弓形虫 IgG 和 IgM 抗体,而感染复发患者 IgG 抗体升高或下降,但通常检测不到 IgM 抗体。血清学阴性受者从血清学阳性供者接受移植,可感染弓形虫病。

推荐所有 HIV 感染者确诊后立即检测刚地弓形虫 IgG 抗体以发现潜伏感染。大多数弓形虫脑炎的 AIDS 患者有刚地弓形虫 IgG 抗体。

附录 A
(资料性附录)
与免疫学检测有关的问题

A.1 试剂盒

按照《医疗机构临床实验室管理办法》规定,进行临床刚地弓形虫检测的商品试剂盒(国产或进口)必须有国家食品药品监督管理局(CFDA)的正式批准文号方可使用,以保证试剂盒检测质量。实验室开始刚地弓形虫检测前、改变测定方法或更换试剂批号时,应评估试剂盒。实验室应建立和保存刚地弓形虫阴性和阳性的血清标本库用于将来试验评估。

A.2 试验选择

开始进行刚地弓形虫免疫诊断检测或改变测定方法时,应考虑多种因素,如:试验需求量、为什么需要试验、易于操作、适于实验室情况等。

如果试验需求量小,实验室可进行免疫荧光试验,IFA-IgG 试验比 ELISA 更高效。乳胶凝集方法经济、操作时间短,但结果阳性需要特异性更强的方法确认。如果试验需求量大,ELISA 更适用。有条件实验室可进一步进行抗体亲和力实验和分子生物学实验。

HIV 阳性患者、移植前、女性妊娠前常规筛查试验,IgG 方法足够敏感。如果考虑有孕妇急性感染,进行 IgM 抗体检测则更有价值。

A.3 假阳性反应

有许多原因引起假阳性反应,例如:血清 56 °C 灭活、抗核抗体、类风湿因子(RF)、同型之间抗原结合位点竞争、体内有天然抗体和许多涉及免疫球蛋白 Fc 部分的反应。使用吸附剂和(或)捕获步骤(抗 IgM 结合到载体)代替间接试验步骤(抗原结合到载体),消除了 IgM 试验中 RF 和同型之间竞争结合位点。但还有其他假阳性原因报道,需要引起实验室工作者注意。

A.4 质量保证

实验室应常规进行刚地弓形虫检测项目的室内质量控制。开展刚地弓形虫抗体(IgM 和 IgG)检测的实验室应参加室间质量评价。

A.5 参考实验室

因为刚地弓形虫病诊断很困难,建议将 IgG 和 IgM 结果显示可能近期感染的患者标本送至有诊断弓形虫病经验的实验室比对。

参 考 文 献

- [1] 医疗机构临床实验室管理办法 卫医发〔2006〕73号.
- [2] JS REMINGTON, PHILIPPE THULLIEZ, JG MONTOYA. Recent Development for diagnosis of toxoplasmosis [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004(42):941-945.
-