

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 834—2024

刚地弓形虫试验临床应用

Clinical application of tests for *Toxoplasma gondii*

2024 - 04 - 02 发布

2024 - 09 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准为你推荐性标准。

本标准在GB/T 30224—2013《刚地弓形虫试验临床应用》基础上制定。与GB/T 30224—2013相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了术语刚地弓形虫（见3.1，2013年版的3.1）和弓形虫病（见3.3，2013年版的3.2），增加了术语弓形虫感染（见3.2）；
- 将安全预防措施更改为生物安全（见4，2013年版的6）；
- 将标本采集和处理更改为标本采集、转运和处理（见第5章，2013年版的第5章），增加了概述（见5.1）、直接镜检标本（见5.2）、组织培养标本（见5.3）、核酸检测标本（见5.4）和血清学检测标本（见5.5）；
- 在检验方法中增加了概述（见6.1），将刚地弓形虫病原学检查更改为病原学检查（见6.2，2013年版的4.1），在直接镜检中增加了概述（见6.2.1.1）、体液标本（见6.2.1.2）、组织活检标本印片（见6.2.1.3）、组织活检标本切片（见6.2.1.4）、Giemsa法染色（见6.2.1.5）、光学显微镜镜检（见6.2.1.6）和结果判断（见6.2.1.7），将接种和组织培养更改为组织培养（见6.2.2，2013年版的4.1.2）；
- 在核酸检测中增加了概述（见6.2.4.1）、实时荧光PCR（见6.2.4.2）和二代测序（见6.2.4.3）；
- 将刚地弓形虫抗体检测更改为抗体检测（见6.3，2013年版的4.2），在抗体检测中增加了抗体检测指标（见6.3.2）和抗体检测方法（见6.3.3），删除了刚地弓形虫IgG抗体检测（见2013年版的4.2.2）、刚地弓形虫IgM抗体检测（见2013年版的4.2.3）、刚地弓形虫IgA抗体检测（见2013年版的4.2.4）和刚地弓形虫IgE抗体检测（见4.2.5）；
- 将试验选择更改为检验方法的选择，并移入检验方法中（见6.4，见2013年版的A.2），在检验方法的选择中增加概述（见6.4.1）、初筛实验室（见6.4.2）和确证实验室（见6.4.3）；
- 将质量保证更改为质量控制（见7，2013年版的A.4），并增加了概述（见7.1）、室内质控（见7.2）、实验室内结果可比性（见7.3）和实验室间结果比对（见7.4）；
- 将免疫诊断试验的临床应用更改为免疫学试验的临床应用（见第8章，2013年版的第7章），增加了概述（见8.1），将确定抗体状况更改为特殊人群发生感染的风险评估（见8.2，见2013年版的7.1），将先天性感染的诊断更改为妊娠及孕前感染的诊断（见8.4，见2013年版的7.3），将新生儿感染的诊断更改为先天性感染的诊断（见8.5，见2013年版的7.4）；
- 在附录A中新增检验程序性能验证（见A.2），删除了试验选择（见2013年版的A.2）、假阳性反应（见2013年版的A.3）、质量保证（见2013年版的A.4）和参考实验室（见2013年版的A.5）；
- 增加了附录B。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：北京大学人民医院、首都医科大学附属北京朝阳医院、首都医科大学附属北京友谊医院、武汉大学中南医院、四川大学华西医院。

本标准主要起草人：赵晓涛、王清涛、张正、苏建荣、李一荣、岳志红、马莹、马立艳、岳育红、夏长胜。

刚地弓形虫试验临床应用

1 范围

本标准规定了临床实验室刚地弓形虫试验及其临床应用，主要包括生物安全、标本的采集转运和处理、检验方法、质量控制和免疫学试验的临床应用。

本标准适用于临床实验室开展刚地弓形虫的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB 19781 医学实验室 安全要求
GB/T 38576 人类血液样本采集与处理
GB/T 38735 人类尿液样本采集与处理
WS/T 486 弓形虫病的诊断
WS/T 573 感染性疾病免疫测定程序及结果报告
WS/T 661 静脉血液标本采集指南
CNAS-CL02-A001 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求
CNAS-GL037 临床化学定量检验程序性能验证指南
CNAS-GL038 临床免疫学定性检验程序性能验证指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

刚地弓形虫 *Toxoplasma gondii*

刚地弓形虫是法国Nicolle和Manceaux于1908年首先从北非刚地梳趾鼠(*Ctenodactylus gondii*)单核细胞内发现的一种原虫，其虫体似弓形或半月形，故被命名为刚地弓形虫，简称弓形虫。弓形虫整个生活史过程包括5个发育期，即速殖子，在假包囊内或外；缓殖子，在组织包囊内；子孢子，在卵囊内；裂殖体，内含裂殖子；配子体，有雌（大）配子体和雄（小）配子体。

3.2

弓形虫感染 *Toxoplasma gondii* infection

弓形虫能寄生于人体所有有核细胞，猫科动物是其唯一的终末宿主，其它哺乳动物、鸟类和人类都可为其中间宿主。感染后弓形虫经人体消化道黏膜、损伤的皮肤和胎盘等途径随血液或淋巴液扩散到全身有核细胞内，形成包囊后可长期寄生于中枢神经系统或横纹肌内，免疫功能正常情况下可不出现明显临床症状和体征。感染途径包括先天性和获得性两种。先天性感染是指虫体经母体胎盘垂直传染给胎儿。获得性感染方式主要包括食入被弓形虫卵囊污染的食物或水、摄入含有包囊的未熟肉类或乳制品、输血

或器官移植，以及实验室工作人员接触污染器材后，不慎经口、鼻和眼或注射器针头刺伤皮肤等途径，亦可造成感染。

3.3

弓形虫病 toxoplasmosis

弓形虫寄生于人体并侵犯脑或眼、肝、心、肺等器官，破坏有核细胞引起相应的临床症状和体征。免疫功能低下者或缺陷者易发病，为机会性人兽共患寄生虫病。

4 生物安全

在标本的采集、储存、转运、处理、检测，以及检测后剩余标本的处理等操作过程中，特别是在风险较高的直接镜检和组织培养等操作过程中，存在感染相关人员的风险，应严格按照《医学实验室 安全要求》规范操作。

5 标本采集、转运和处理

5.1 概述

标本须按规范要求采集，对疑似病例应多次采集送检；标本应做好标记，可使用粘贴好条形码的标本采集容器盛放标本，标本条形码至少包含唯一随机产生的条形码号、患者标识（包括患者姓名和住院患者住院号或是门诊患者就诊卡号）、检测项目、采集时间和执行科室等信息；标本不能及时送检时，通常可在-20℃以下冷冻保存180天。冻存标本如需多次使用，能分装的应分装，避免多次冻融。不同类型和不同检验项目的标本，均应避免细菌污染，按照要求常温或冷链转运。

5.2 直接镜检标本

用于直接观察弓形虫的标本包括体液标本（脑脊液、支气管肺泡灌洗液、痰、唾液、胎盘渗出液等）和组织活检标本（脑组织、淋巴结、肺组织、骨髓、肝脏组织、脾脏组织等）。骨髓标本应使用EDTA抗凝。将无菌采集的标本放入采样管或采样瓶内，组织活检标本应浸没在无菌生理盐水中保湿，标记待检标本，常温3天内送检。若是多种标本需要同一天平行检测，在预固定后可在-20℃以下冷冻保存。

对于中枢神经系统有局灶性体征或病灶产生占位效应的患者，慎重行腰椎穿刺，特别是病变位于颅后窝时；如果未见局灶性体征和明显占位效应，可进行脑脊液检查。如果采自尸体，还可取脑、肝、脾、肺、心、肾、眼球、肌肉和肠道等相应病变部位的组织。

5.3 组织培养标本

用于组织培养的标本包括脑组织、淋巴结、骨髓等。将无菌采集的标本放入采样管或采样瓶内，组织标本应浸没在无菌生理盐水中保湿，标记待检标本，常温立即送检。

5.4 核酸检测标本

核酸检测标本的采集应严格遵守无菌原则，标本应直接从患者感染部位的体液或组织中进行采集。当患者存在感染表现但病情危重或不能耐受有创操作时，宜考虑采集患者的血液标本。对于有菌部位的标本，在标本采集过程中应尽量避免引入该部位的正常菌群。所有采集的标本均应及时送检，如不能及时检测，应于-20℃以下冷冻保存。标本远距离运输应采用冷链运输。核酸检测标本类型包括血液标本、

体液标本（如尿液、脑脊液、房水、支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、胎盘渗出液等）和组织标本（如脑组织、淋巴结、肺组织、骨髓、肝脏组织、脾脏组织等）。血液和骨髓标本应使用EDTA抗凝。

5.5 血清学检测标本

应采用体外诊断试剂盒说明书标明的标本类型进行检测。抗体和抗原检测使用的标本类型包括血清、血浆、脑脊液和房水。脑脊液和房水应与同一时间采集的血清或血浆标本平行检测。但目前国内尚无适用于脑脊液和房水标本检测的试剂盒。标本可在常温下过夜运送，如果运送需数天，则应冷链运送。标本在4℃可储存7天，也可于-20℃以下冷冻保存。

6 检验方法

6.1 概述

弓形虫感染和弓形虫病的实验室检验方法主要包括病原学检查和抗体检测，根据实验室开展的检验项目，可将实验室分为弓形虫病初筛实验室和确证实验室。

6.2 病原学检查

6.2.1 直接镜检

6.2.1.1 概述

直接镜检简便，特异性高，灵敏度低，要求检测人员具备丰富的形态学识别经验。此外，该法阴性不能排除，必须做进一步检查。

6.2.1.2 体液标本

500 g离心10 min，取沉淀滴在洁净玻片上制成涂片，Giemsa法染色后镜检。

6.2.1.3 组织活检标本印片

将组织标本置于两张洁净玻片之间，轻压，再将玻片打开，印片即可制成。室温干燥，无水乙醇固定，Giemsa法染色后镜检。

6.2.1.4 组织活检标本切片

用10%甲醛溶液固定，水冲洗，依次经70%、80%、90%乙醇溶液脱水，各30 min，再浸入95%、100%乙醇溶液各2次，每次20 min，浸蜡、石蜡包埋后连续切片，厚度7 μm~10 μm，贴片、二甲苯脱蜡后备用。

6.2.1.5 Giemsa 法染色

将染液覆盖涂片、印片或是切片表面，染色1 min~3 min，滴加等量的磷酸盐缓冲液至玻片上，轻吹混匀，4 min~8 min后用缓冲液冲洗，晾干。

6.2.1.6 光学显微镜镜检

在10×100倍油镜下，位于组织细胞内的弓形虫速殖子呈新月形，一端较尖、一端钝圆，大小约3 μm~7 μm×2 μm~4 μm，经Giemsa法染色后胞浆呈蓝色，胞核呈紫红色位于虫体中央偏后，速殖子既

可独立存在，也可在组织细胞内不断增殖，达数个至十几个，虫体被组织细胞膜包裹形成假包裹。弓形虫缓殖子大小约 $5\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ ，数个至数千个虫体位于圆形的包裹内，囊壁坚韧。

6.2.1.7 结果判断

镜检发现假包裹或包裹判为病原学阳性。

6.2.2 组织培养

组织培养操作复杂、成功率低、质量控制困难，实验室不常规开展。组织培养通常将患者体液如脑脊液、支气管肺泡灌洗液或羊水离心沉淀，用培养基将沉淀物重悬后与组织细胞（猴肾或猪肾细胞等）共孵育以分离、鉴定虫体。

6.2.3 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，是筛查病原体存在的重要依据，可使用ELISA双抗体夹心法检测，但可能存在假阳性和假阴性结果。有关弓形虫检测试剂盒和检验程序性能验证的要求见附录A。目前国内尚无通过国家药品监督管理局注册的弓形虫抗原检测试剂盒。如果实验室自行研制检测试剂或建立检验程序，则该类检测属于实验室自建项目，应在执业医师指导下在本单位内使用，同时应严格遵守国家的相关管理规定。

6.2.4 核酸检测

6.2.4.1 概述

为确定是否感染，可应用分子生物学技术如聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）技术等检测生物标本中弓形虫特异性核酸。多个目标基因可用于弓形虫的核酸检测，包括*BI*基因、*AF146527*序列、*18S rDNA*、*ITS-1*、*SAG1*、*SAG2*、*BAG1*、*GRA1*和*MIC3*等。目标基因序列的选择对于提高PCR检测的灵敏度起着至关重要的作用。目前国内尚无通过国家药品监督管理局注册的弓形虫PCR试剂盒。另外，利用二代测序技术进行宏基因组分析也可用于弓形虫感染的诊断。弓形虫核酸检测阳性是活动性感染的有力证据，但核酸阴性并不能排除弓形虫感染。

6.2.4.2 实时荧光 PCR

实时荧光PCR是目前应用最广泛的弓形虫核酸检测技术，常以*BI*基因、*AF146527*序列、*SAG1*和*BAG1*为靶基因，引物和探针相结合使用不仅可提高检测的特异性和灵敏度，而且无需进行PCR扩增后的产物分析，避免发生产物污染，该法检测时间短，但需要实时荧光定量PCR仪。附录B分别以*BI*基因和*AF146527*序列为靶基因，并提供靶基因序列、扩增体系和扩增条件来介绍实时荧光PCR检测弓形虫核酸。

6.2.4.3 二代测序

宏基因组二代测序具有无偏倚性和广覆盖等优点，是一种有效的诊断弓形虫病的方法。其主要步骤包括核酸提取、人源性核酸去除、文库构建与测序及原始测序数据质量分析与评价，随后去除质量不符合要求的序列和标签序列，并在序列拼接完成后先与人基因组序列进行比对，从而将人源性基因序列去除，最后在病原体的序列数据库中将保留的序列与已知病原体的序列进行比对，判定病原体的种属，并分析病原体的数量和丰度。

6.3 抗体检测

6.3.1 概述

血清学检测弓形虫抗体是目前临床实验室诊断弓形虫感染的主要方法。IgM、IgG、IgA、IgE和IgG亲和力检测均有助于弓形虫感染和弓形虫病的诊断，检测方法主要包括ELISA、化学发光免疫分析及免疫层析试验等。

6.3.2 抗体检测指标

IgM: 感染后第1周即可在血清中检测到，被认为是急性弓形虫病早期敏感的诊断指标，血清IgM也可能持续数月或数年阳性。

IgG: 感染后1周~2周可在血清中检测到，通常在1个月~2个月内达到高峰，然后逐渐下降，不同个体下降速度不同，往往可终身持续阳性。定性的IgG抗体被认为是感染过的指标，无法区分既往和近期感染。定量IgG抗体4倍以上滴度或浓度增高可提示近期活动性感染。

IgA: 感染后的第1周产生，并在1个月内达到高峰，很快消失。弓形虫IgA对疑似先天性感染新生儿的诊断有辅助作用。但目前国内尚无通过国家药品监督管理局注册的弓形虫IgA检测试剂盒。

IgE: 也在感染早期产生，很快消失。弓形虫IgE抗体检测也有助于判断是否为急性感染。但目前国内也尚无通过国家药品监督管理局注册的弓形虫IgE检测试剂盒。

IgG亲和力: 在急性感染期IgG与抗原结合力较弱，在慢性感染期抗体与抗原结合力增强，因此IgG亲和力检测是区分既往和近期感染的另一指标。高IgG亲和力提示感染至少发生在3个月~5个月之前，为判断慢性感染最有用的指标，可排除急性感染。但IgG低亲和力并不一定提示近期感染，因低亲和力抗体在感染后1年还可检测到。

通常不能根据弓形虫某一类抗体的检测结果作出诊断，应进行弓形虫多类抗体联合检测。如果患者相隔2周~3周采集的两份血标本发生IgG血清学从阴性到阳性的转换，或是IgG滴度或浓度4倍以上升高；或是单次检测IgM阳性，IgG阴性或阳性。上述几种情况一般可以作为弓形虫近期感染的依据之一。

6.3.3 抗体检测方法

6.3.3.1 ELISA

ELISA是弓形虫IgG和IgM抗体测定应用最广泛的试验，具有高灵敏度和特异性，其中IgG检测最常使用间接法，IgM检测可使用间接法或捕获法。间接法是将可溶性抗原包被于固相载体；患者血清与抗原共同孵育、洗涤后加入酶标记抗人IgG或IgM抗体孵育；洗涤后加入底物孵育，再加入终止液，酶标仪读取吸光度值。不同厂商的产品操作步骤不尽相同，应按照产品说明书要求进行实验。弓形虫IgG抗体有世界卫生组织(WHO)标准品，定标品可溯源至WHO标准品的不同厂家试剂的检测结果有一定的可比性(注：WHO标准品已经有四代产品，量值结果只有溯源至同一代次的标准品才具有可比性)。弓形虫IgM抗体检测，不同厂商试剂的结果只能进行阴性或阳性的定性比较。假阳性反应常由类风湿因子引起，弓形虫IgG抗体的封闭可导致IgM检测的假阴性，捕获法可减少这种干扰。

ELISA也可用于IgG亲和力检测。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和力抗体。计算尿素处理标本与未处理标本的终点滴度比值，以百分数表示。

6.3.3.2 化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)

CLIA是目前弓形虫IgG和IgM抗体测定的主流方法，其精密度、灵敏度和特异性均高于ELISA，可以做IgG、IgM定量检测，但需要使用化学发光免疫分析仪，其中IgG检测最常使用间接法或是双抗原夹心法，IgM检测常使用捕获法。不同厂商的产品检测原理和操作步骤不尽相同，应按照产品说明书要求进行操作。CLIA亦可用于IgG亲和力检测。CLIA法弓形虫IgG和IgM抗体测定结果的可比性同ELISA试验。其干扰因素也同ELISA试验类似。

6.3.3.3 免疫层析试验(immunochromatographic test, ICT)

ICT可定性检测弓形虫IgG和IgM抗体。将特异性抗原固定于硝酸纤维素膜的某一区带，在硝酸纤维素膜的一端加入标本后，由于毛细管虹吸效应，标本沿着膜向前移动，当移动到固定有抗原的区域时，标本中的抗体与抗原发生特异性结合。用免疫胶体金染色可使该区域显示颜色，肉眼可判定结果。该方法简便、快速，不需要特殊设备，适合床旁及现场应用。

6.4 检验方法的选择

6.4.1 概述

不同级别实验室应根据自身的能力和水平选择适宜的检验方法，以满足临床需求。

6.4.2 初筛实验室

初筛实验室应能进行弓形虫抗体IgG和IgM的定性或定量检测，首选定量检测，作为妊娠前后、器官移植供者、器官移植受者移植前后、HIV阳性者、疑似感染者等常规筛查。有条件的初筛实验室宜开展弓形虫IgG亲和力检测，在弓形虫IgG检测阳性后，进一步检测IgG亲和力，以区分近期和既往感染。初筛实验室选择检验方法，应考虑多种因素，主要包括标本数量、操作复杂性和实验室自身条件等。如果标本数量少，宜选择ICT，但对于ICT检测IgM阳性标本，以及临床高度怀疑但ICT检测阴性标本，应使用灵敏度和特异性更高的方法，如ELISA或CLIA重新检测。如果标本量大，应采用ELISA或CLIA。CLIA的方法学性能优于ELISA，有条件的初筛实验室应优先选择CLIA，进行弓形虫抗体和IgG抗体亲和力检测。因为弓形虫病诊断较难，应将IgG、IgM和IgG亲和力检测结果提示可能近期感染的患者标本送至弓形虫病确证实验室进一步检测。

6.4.3 确证实验室

目前国内尚无官方认可的弓形虫病确证实验室，此处确证实验室特指除开展弓形虫抗体IgG、IgM和IgG亲和力检测外，还同时开展弓形虫病原学检查的实验室。该类实验室通常至少应开展弓形虫血清学筛查、直接镜检，最好还能开展核酸检测，甚至能开展组织培养。确证实验室宜选择上述多种方法进行联合检测，具体可根据实验室自身条件进行选择，但至少应包括血清学筛查试验和1项确证试验，确证试验应为病原学检查，要求特异性大于98%。

7 质量控制

7.1 概述

目前仅弓形虫抗体检测试剂盒通过国家药品监督管理局的注册，抗体检测的相关质控品和室间质评样品可以获取，因此本部分主要规定弓形虫血清学试验的质量控制措施。有关病原学检查的直接镜检、抗原检测和核酸检测，其质量控制的具体要求可参考《医学实验室质量和能力认可准则的应用要求》。

7.2 室内质控

实验室应常规开展弓形虫检测项目的室内质控。每检测日或分析批使用阴性、弱阳性和/或阳性外部质控品进行质控。阳性质控品浓度宜在2~4倍临界值，阴性质控品浓度宜在0.5倍临界值左右。使用的质控规则应至少包括一个偶然误差及一个系统误差规则。阴、阳性质控物的检测结果必须分别为阴性和阳性，做好质控记录。

7.3 实验室内结果可比性

如果采用手工操作或同一项目使用两套及以上检测系统时,应至少每半年进行1次实验室内部比对,包括人员(手工)和不同方法/检测系统间的比对,至少选择2份阴性标本(至少1份其它标志物阳性的标本)和3份阳性标本(至少含弱阳性2份)进行比对,评价比对结果的可接受性。出现不一致,应分析原因,并采取必要的纠正措施,及评估纠正措施的有效性,保留相应的记录。

7.4 实验室间结果比对

实验室应常规参加弓形虫检测项目的实验室间比对计划,如室间质量评价活动、能力验证活动。国家卫生健康委临床检验中心的临床检验室间质量评价计划,其中优生优育免疫学检测评价项目中包含弓形虫IgG和IgM抗体检测,该项目全年发放20个标本,全年测定2次。每次检测须 $\geq 80\%$ 的结果符合要求,结果不一致时应分析不一致的原因,必要时,采取有效的纠正措施。应保留参加能力验证/室间质评的检测结果、回报表、证书,以及纠正措施记录。当无实验室间比对计划可利用时,实验室应采取其他替代方案并提供客观证据,确定检验结果的可接受性,例如可参加同级别实验室间的分割样品检测活动。每年至少2次,每次样品数量至少5份,包括阴性、弱阳性和阳性;检测结果判定和相关记录等要求如上所述。

8 免疫学试验的临床应用

8.1 概述

免疫学试验可以检查抗原和抗体,该处特指弓形虫抗体的测定,并主要介绍其临床应用。特异性抗体的检测在弓形虫感染诊断中具有重要的临床意义,而病原学试验是诊断的金标准。对于免疫功能正常者,可疑弓形虫急性获得性感染时,应首选免疫学试验。对于免疫功能低下者,免疫学试验可作为潜伏感染的筛查。总之,弓形虫感染的诊断应根据流行病学史、临床表现、实验室检查、影像学检查,以及诊断性治疗结果等进行综合判断。

8.2 特殊人群发生感染的风险评估

筛查血清中的弓形虫IgG抗体,选择ELISA或CLIA等灵敏度高的试验即可。IgG抗体阴性一般提示未获得感染,阳性提示可能感染弓形虫。以下情况应筛查血清中是否存在弓形虫IgG抗体:

- 育龄妇女妊娠前:免疫力正常的妇女弓形虫IgG抗体阳性提示有免疫力,将感染垂直传播给胎儿的风险很小;IgG抗体阴性提示该妇女为易感人群。
- 免疫抑制剂(特别是T细胞抑制剂)治疗开始前:弓形虫IgG抗体阳性提示潜伏感染再激活的风险。
- 首次HIV阳性确诊后:弓形虫IgG抗体阳性且CD4⁺ T淋巴细胞计数 $< 100/\mu\text{L}$,提示存在需要治疗的弓形虫感染。
- 器官移植供者捐赠前:供者弓形虫IgG抗体阳性提示受者存在器官移植发生弓形虫感染的风险。

8.3 急性获得性感染的诊断

弓形虫免疫学试验结果的临床意义见表1,ELISA-IgG或CLIA-IgG结果阴性基本上可排除近期弓形虫感染。采用同一试验方法平行检测间隔3周采集的血标本,血清学从阴性到阳性转换或IgG抗体滴度或浓度升高超过4倍,可明确急性获得性感染的诊断。IgG抗体阳性时,ELISA-IgM(或CLIA-IgM)和IgG亲和力检测结果能够提供额外的证据支持或否定近期感染。IgM阴性基本上可排除近期感染。IgM和IgG均阳性可提示近期感染;但是,一些患者初始感染后血清IgM抗体可持续阳性,甚至长达18个月。

表1 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。
—	±	不确定：重新采集标本检测 IgM；如果结果仍是 ±，应 3 周内重新采集标本检测。
—	+	近期急性感染或 IgM 假阳性。3 周内重新采集标本检测 IgG 和 IgM。如果两份结果相同，IgM 结果可能是假阳性；如果 IgG 转为阳性，急性感染。
±	—	不确定：重新采集标本检测 IgG；如果结果仍是 ±，应 3 周内重新采集标本检测。
±	±	不确定：重新采集标本检测 IgG 和 IgM。
±	+	可能近期急性弓形虫感染。3 周内重新采集标本检测 IgG 和 IgM。如果 IgG 滴度或浓度 4 倍以上升高或 IgG 转阳，IgG 亲和力检测（孕期≤16 周）和/或标本送至弓形虫病确证实验室进一步检测。
+	—	通常弓形虫感染超过 6 个月
+	±	不确定：重新采集标本检测 IgM；如果结果仍是 ±，应 3 周内重新采集标本检测。
+	+	弓形虫感染，但 IgM 结果可能由于近期感染或 IgM 假阳性。3 周内重新采集标本检测，如果 IgG 滴度或浓度 4 倍以上升高，IgG 亲和力检测（孕期≤16 周）和/或标本送至弓形虫病确证实验室进一步检测。

注：+，阳性；—，阴性；±，可疑阳性。

8.4 妊娠及孕前感染诊断

所有孕妇应尽早（妊娠前3个月最为理想）进行弓形体抗体IgG和IgM的筛查试验。妊娠期感染诊断包括孕妇近期感染诊断和胎儿宫内感染诊断。先天性弓形虫病由母婴垂直传播发生，其发病率和严重程度与孕妇确认弓形虫感染后的第1~3个月的治疗密切相关。因此，在孕妇感染早期做出快速准确的诊断和采取及时的治疗十分重要。疑似母体感染孕妇应转至有胎儿医学的产前诊断机构进行诊治。

妊娠后第1次检测弓形体抗体IgG和IgM，如果在妊娠的较早阶段（4周~12周）IgG抗体阳性、IgM抗体阴性，不推荐进行确证试验；如果在妊娠的较晚阶段（20周~26周）IgG抗体阳性、IgM抗体阴性，应将标本送至弓形虫病确证实验室进行确证试验。如果IgM阳性，应进行IgG亲和力检测来确定是否近期感染，IgG亲和力高提示慢性感染（>4个月），基本除外孕妇近期感染；IgG亲和力低且IgG抗体浓度连续（间隔3周）升高4倍以上时提示近期感染。

如果孕妇确诊弓形虫急性感染，应进行治疗并检测宫内胎儿是否感染。推荐妊娠18周或更晚些的时候进行羊水实时荧光PCR检测，作为胎儿宫内弓形虫感染的确证试验。另外，胎儿出生前每2~4周应进行B超检查，以寻找更多非特异性感染指征。

如果采集胎儿血液标本，应进行病原体形态学检查、弓形虫IgG、IgM和IgA检测。结合非特异性感染指标进行分析，以明确胎儿宫内感染的诊断。

8.5 先天性感染的诊断

除高流行区外，没有弓形虫感染症状的新生儿不必常规筛查。如果产前诊断尚未明确，对疑似弓形虫感染的新生儿应尝试采集胎盘、羊水和脐血，根据病原体直接镜检及弓形虫特异性抗体的检测结果，可做出先天性感染的诊断。新生儿血清弓形虫IgM或IgA抗体阳性，2~4天后复测弓形虫IgM仍为阳性，或10天后复测弓形虫IgA仍为阳性，提示先天性弓形虫感染。可疑中枢神经系统感染时，采集脑脊液进行总IgG和弓形虫IgG、IgM抗体以及弓形虫速殖子的检测。此外，疑患有先天性弓形虫感染的新生儿还应进行眼部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先行治疗。

由于母源IgG抗体半衰期约为1个月，应重复检测患儿血清标本，以便区分母源抗体和患儿产生的抗体。与母亲血清抗体相比，患儿总IgG阳性、持续升高或IgM抗体阳性可作为先天性弓形虫感染的依据。

8.6 眼部感染的诊断

多数弓形虫脉络膜视网膜炎病例由先天性感染造成。当疾病处于非活动期时，不需进行血清学试验之外的实验室检测。当疑似疾病处于活动期时，血清弓形虫IgG抗体阳性支持眼部弓形虫病的诊断，但非确诊依据，宜同时检测血清和房水的弓形虫IgG和IgM抗体，以及房水弓形虫核酸来确诊。初次感染后，通常进展数月出现眼部受损的临床表现。再激活感染病例中，弓形虫IgM抗体可为阴性，IgG抗体滴度则呈升高趋势，因此弓形虫IgM抗体阴性不能排除眼部弓形虫感染。

8.7 免疫功能低下者感染的诊断

免疫功能低下者发生弓形虫病时症状通常比较严重，甚至导致死亡，其发生常常与潜伏感染再激活有关。由于检测不到IgM抗体，IgG抗体阳性提示潜伏感染。建议通过对脑脊液、支气管肺泡灌洗液、脑组织、胎盘等部位中的虫体进行直接镜检、分离培养或核酸检测来确诊感染。

器官或骨髓移植受者移植前应检测弓形虫IgG抗体，移植前IgG抗体阴性属于易感人群，接受血清学阳性供者的移植，有发生弓形虫感染的风险；IgG抗体阳性有潜伏感染再激活的风险，宜连续监测外周血弓形虫核酸，作为判断潜伏感染再激活确证试验。

所有艾滋病病毒感染者确诊后应立即检测弓形虫IgG抗体以发现潜伏感染。大多数弓形虫脑炎的艾滋病患者脑脊液中可检测到弓形虫IgG抗体。

附 录 A

(规范性)

弓形虫检测试剂盒和检验程序性能验证的要求

A.1 试剂盒

临床实验室应根据需要选择通过国家或地方药品监督管理局注册或备案的试剂盒,以保证检验质量。目前属于体外诊断试剂第三类产品的弓形虫抗体IgG、IgM和IgG亲和力测定试剂盒通过国家药品监督管理局的注册,可选用。

A.2 检验程序性能验证

实验室开展弓形虫检测前、更换不同品牌试剂盒等时,应进行检验程序性能的验证(适用时)。目前通过国家药品监督管理局注册的弓形虫检测试剂盒几乎均使用临床免疫学方法,因此此处主要规定临床免疫学检验程序性能的验证。检验程序的性能验证内容应参考试剂盒说明书上明确标示的性能参数进行验证。临床免疫学定量检验程序参照临床化学定量检验程序进行性能验证,其内容应包括正确度、精密度和可报告范围,具体方法和操作见《临床化学定量检验程序性能验证指南》;临床免疫学定性检验程序的性能验证内容至少应包括符合率,适用时,还应包括检出限、灵敏度、特异性等,具体方法和操作见《临床免疫学定性检验程序性能验证指南》。

附录 B

(资料性)

弓形虫基因实时荧光 PCR 检测示例

B.1 弓形虫 B1 基因实时荧光 PCR 检测

B.1.1 B1 基因序列 (基因序列号 AF179871.1)

>AF179871.1 (1 bp - 2214 bp, 正向) 2214 bp

gaattcgttcgacagaaagggagcaagagttgggactaaatcgaaagctgagatgctcaaagtcgaccgcgagatgcacccgcaga
 agaagggctgactcgaaccagatgtgctaaaggcgtcattgtgttctgtcctatcgcaacggagtcttcccagacgtggatttccgt
 tggttccgctccttctgctccgtcgtatatacaggccttctgttctgttctgctgtcttagggcacccttactgcaagagaagtattt
 gaggtcatatcgtcccatgaagtcgaccacctgtttctctcttctactgtcacgtacgacatcgattcaagggaagagatccagcaga
 tctcgttctgttattcagacaagagaggtccgccccacaagacggctgaagaatgcaacattcttgtgtcgtcctcctctcatggcaa
 atgccagaagaagggtacgtgttgcatcataacaagagctgtatttcccgtggcaaatacaggtgaaatgtacctccagaaaagccac
 ctagtatcgtgcggcaatgtgccacctgcctcttgggagaaaaagaggaagagacgctgccgtgttttgcaaatgaaaaggattcat
 tttcgcagtagaccaggagttggatttttagagcgtctcttcttcaagcagcgtattgtcgagtagatcagaaggaactgcatccgtt
 catgagtataagaaaaaatgtgggaatgaaagagacgctaattgtgtttgcataggttgcaagtcactgacgagctcccctctgtctggcg
 aaaagtgaattcatgagtatctgtgcaactttgggtgtattcgcagattggctgcctgcaatcgatagttgaccacgaacgctttaag
 aacaggagaagaagatcgtgaaagaatacagaagaggtacacagagatagaagtcgctgcggagacagcgaagactgcggatgacttc
 actcccgtcgcaccagcagcagaggagtgccgggcaagaaaatgagatgcctagaggagacacagcgtgttatgaacaaatctattgag
 gtttcgcgaagaggagggaacatattatatacagaagaagaacaagagacgtgcccatgtcgttaagccatcggaagggtgctcaga
 aaatggcacagtagtatcattacagttccgttgattcgtctgatggtagcgaaggggaagaatagttgtcgcacccaaactggctagtt
 gttatittgaagaagacgagagatggagtgaaccacaaaaatcgagaaaaatcgatggtgtcacgtttttgtcagacttcactttgt
 gcagaagcattgccgtccaaactgcaacaactgctctagcgtgttctgtctccattccgtacagtcctcaaaaatacaaaagagaaca
 ttccagcaactctgcctttgtcttttagcctcaatagcaggtgacgcctccctcctatctttcagccaaccagcaaacaccgacg
 aactctctgtagtagtaacaaagagaaggcaaaacgcgccatcacgaacactcgcagagatgatacagagacgtgtcatcaggacaaggt
 tggctcgcttaattttctgtatatagcatttttagaatgcacctttcgacctaacaaccgtgcaaaaggatgcgccacctggtgtctct
 tcaagcgtcaaaacgaactatctgtatatctctcaaggaggactggcaacctggtgtcgacaacagaacagctgcagtcggaaataga
 aagccatgaggcactccaacggcgagtagcacctgaggagatacaaaactgctaaacgggtccgggtgaaacaatagagagtactggaac
 gtcgccgtactgccagttgtcatgccatcgacgtagaccagaaatgagcgagaaattaatattgttagtaaagcattcaaaaagt
 tccggtcgagaggttaaaccacaaaagtgcaaacatgcgcagccatcagcttaacaaaagcagttggtgatggttgccctcgagttcct
 tctgaaaatggattacttcatcaacgagccaccacgcagaatcatgctttccagtgctaaagcgtttctaaagtagccgcacaatgc
 ggaatgctaaggggatcgctacgtacacatgttgtgctcaccctccagctcgtgcgtcattctcttctcgtgcgcggct (加粗
 斜体即为靶序列)

B.1.2 B1 靶序列扩增反应体系 (推荐使用)

正向引物序列 5'-GCATTGCCCGTCCAAACT-3', 反向引物序列 5'-AGACTGTACGAATGGAGACGAA-3', TaqMan 探针序列 5'-CAACAAGTCTCTAGCG-3' (5' 端标记荧光发光基团如 6-carboxyfluorescein, 3' 端标记荧光淬灭基团如 Black Hole Quencher 1), 扩增产物片段长度为 61 bp; 反应总体积 25 μ L, 包括 1 μ L Taqman PCR master 混合物 (含 dNTPs、Taq 酶、MgCl₂ 等)、100 nM 探针、900 nM (正向和反向) 引物, 以及模板 DNA。内部对照: 每个反应管还加入 1 份内部阳性质控试剂和 1 份内部阳性质控合成 DNA。外部对照: 使用无菌水作为阴性对照, 使用弓形虫纯化基因组 DNA 作为阳性对照。实时 PCR 可在荧光定量 PCR 仪器上运行。

B.1.3 B1 靶序列扩增反应条件

首先 50 $^{\circ}$ C, 2 min。然后 95 $^{\circ}$ C, 10 min。最后 45 个循环: 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 1 min。

B.2 弓形虫 AF146527 序列实时荧光 PCR 检测

B.2.1 AF146527 序列

>AF146527 (1 bp - 529 bp, 正向) 529 bp

ctgcagggaggaagacgaaagttgtttttttatgtttttttctttttgtttttctgattttgtttttttgactcgggccagc
tgcgtctgtcgggatgagaccgcggagccgaagtgcgtttttttttgactttttttgttttttcacaggcaagctcgctgtgct
tggagccacagaaggacagaagtcgaaggggactacagacgcgatgcc***gctcctccagccgtcttggaggagagatatcaggactgt
agatgaaggcgagggtagga***atgagggggtggcgtggttggaagcgacgagagtcggagaggagaagatgtttccggcttggtgc
ttttcctggaggggtgaaaaagagacaccggaatgcgatccagacgagacgacgctttcctcgtggtgatggcggagagaattgaagag
tggagaagagggcgagggagacagagtcggaggcttggacgaaggaggaggaggggtaggagaggaatccagatgcactgtgtctgca
g (加粗斜体即为靶序列)

B.2.2 AF146527靶序列扩增反应体系（推荐使用）

正向引物序列5'-GCTCCTCCAGCCGTCTTG-3'，反向引物序列5'-TCCTCACCTCGCCTTCAT-3'，TaqMan探针序列5'-AGGAGAGATATCAGGACTGTA-3'（5'端标记荧光发光基团如6-carboxyfluorescein，3'端标记荧光淬灭基团如Black Hole Quencher 1），扩增产物片段长度为60 bp；反应总体系等同本标准第B.1.2条。

B.2.3 AF146527靶序列扩增反应条件

扩增反应条件同本标准第B.1.3条。

参 考 文 献

- [1] “十三五”国家科技重大专项艾滋病机会性感染课题组. 艾滋病合并弓形虫脑炎临床诊疗的专家共识. 西南大学学报: 自然科学版, 2020, 42(7):38-48.
- [2] Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3):941-945.
- [3] Rostami A, Karanis P, Fallahi S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection*, 2018, 46(3):303-315.
- [4] Gildenberg PL, Gathe JC, Kim JH. Stereotactic biopsy of cerebral lesions in AIDS. *Clin Infect Dis*, 2000, 30(3):491-499.
- [5] Skiest DJ. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*, 2002, 34(1):103-115.
- [6] Khan AH, Noordin R. Serological and molecular rapid diagnostic tests for *Toxoplasma* infection in humans and animals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(1):19-30.
- [7] Robert MG, Brenier-Pinchart MP, Garnaud C, et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: recent advances and a look to the future. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2021, 19(12):1529-1542.
- [8] Wahab T, Edvinsson B, Palm D, et al. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2):591-592.
- [9] 朱宇宁, 尚世强, 陈英虎, 等. TORCH实验室规范化检测与临床应用专家共识. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(5):553-561.
-