

弓形虫病病原的实验诊断研究进展

李潭清, 宋勤叶, 杨润德, 高轩, 刘兰亚 (河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071000)

摘要 综述了诊断弓形虫病的方法, 包括血清学试验、核酸检测(如PCR)、组织学检测寄生虫和/或其抗原(如免疫过氧化酶染色)或组织分离。其他较少使用的方法包括细胞培养、动物接种、弓形虫皮肤试验和抗原特异性淋巴细胞转化试验。论述了细胞培养、动物接种、血清学方法和核酸检测方法检测弓形虫的研究进展。

关键词 弓形虫; 弓形虫病; 细胞培养; 动物接种; 血清学试验; 核酸检测

中图分类号 S855.9⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-15909-03

Study Progress on Laboratory Diagnosis of Toxoplasmosis

Li Tan-qing et al (College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract The method of diagnosing toxoplasma gondii was summarized, including serological test, nucleic acid detection (such as PCR), histological detection of parasites and / or its antigen (such as immunization peroxidase stain) or organization separation. Other methods include cell culture, animal inoculation, toxoplasma skin test and antigen-specific lymphocyte transformation test. The study progress of cell culture, animal vaccination, serology method and nucleic acid detection methods for detection of toxoplasma gondii was reviewed.

Key words Toxoplasma gondii; Toxoplasmosis; Cell culture; Animal vaccination; Serological tests; Nucleic Acid Detection

弓形虫, 又称弓形体(*Toxoplasma gondii*, TOX), 属原生动物门(Protozoa)、孢子虫纲(Class sporozoa), 是一种专性细胞内寄生虫, 为一种人畜共患病, 可寄生于除红细胞外的所有有核细胞内, 呈全球性分布, 特别集中于温暖、潮湿和低海拔区域, 估计全世界有1/3的人感染此病原体, 由于它主要引起机会性感染, 孕妇和免疫功能缺陷者感染严重。由于弓形虫的高度感染率及它与围产医学、优生优育学和艾滋病等以及畜牧业有密切关系, 因此, 对其有效地诊断显得尤为重要。

1 病原学诊断

1.1 组织学诊断 组织切片或体液涂片(如脑脊液、羊水或支气管灌洗液)查找弓形虫速殖子可以诊断弓形虫的急性感染。但在传统染色的组织切片中查找速殖子较为困难, 使用弓形虫抗血清的过氧化物免疫酶标记法被证明具有良好的敏感性和特异性, 能够成功检测到 AIDS 患者中枢神经系统(CNS)中弓形虫的存在。免疫过氧化物酶法也适用于未固定或用福尔马林固定的石蜡组织切片^[1]。此外, 还可通过对脑脊液的离心沉淀或组织进行瑞氏-吉姆萨染色涂片镜检。对炎症灶邻近的组织囊肿用上述方法检查可进行急性感染和潜伏感染的诊断。

1.2 动物实验和细胞培养法 动物接种是一种最为经典、能直接确认病原体存在的方法。孙新分别用小鼠腹腔接种和 THP-1 细胞培养的方法对 30 例孕妇羊水进行病原分离比较, 2 组共分离出 6 株弓形虫, 提示细胞培养可作为先天性弓形虫病早期病原诊断的可行性方法^[2]。Chai 等成功地从 1 例眼弓形病患者血液中分离出弓形虫, 成功传代 1 年以上, 并进行动物腹腔接种^[3]。虽然这 2 种方法结果可靠, 但敏感性低、耗时、易漏诊和难于实际操作。

1.3 生活史调查 弓形虫的整个发育过程需要两个宿主, 猫科动物如家猫为终末宿主, 在终末宿主肠上皮细胞内进行无性繁殖, 而有性繁殖只限于猫小肠上皮细胞内, 有性繁殖即可在小肠上皮细胞也可在其他组织器官内进行。弓形虫

对中间宿主的选择性不强, 无论哺乳类、鸟类和人都可作为中间宿主, 猫既可作为终末宿主又可作为中间宿主。

2 免疫学诊断

2.1 美蓝染色试验(DI) 由 Sabin 和 Feldman 首创, 是一种弓形虫感染的独特血清学技术, 根据抗体效价可区分感染时期, 其特异性强、敏感性好已被普遍公认。但要活虫参与试验, 由于在实际应用时不易操作, 国内几乎不再采用。

2.2 酶免疫技术(EIA)

2.2.1 间接荧光抗体试验(Indirect fluorescence antibody test, IFAT) IFAT 有较高的敏感性、特异性和重复性, 可用于测定 IgM 和 IgG 抗体。IgM 出现较早(感染后第 7~8 天), 持续数周至数月, 偶有数年者。如果 IgM 水平升高, 提示近期感染。Miller 等采用 IFAT 法检测经免疫组化和病原学分离的 28 例阳性和 46 例阴性者的血清, 发现其敏感性达 96.4%、特异性为 67.3%^[4]。但试验结果需用荧光显微镜观察, 限制了该法的广泛应用。IFAT 法可检测血清中的抗体, 也可检测组织内的虫体。但有抗核抗体的动物可出现假阳性, 结果判定尚需有经验的人员, 有一定的主观性。

2.2.2 酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 可检测抗弓形虫 IgM、IgA、IgG、IgE 抗体及 Cag 抗原(循环抗原)。Carlier 等对 ELISA 和其他血清学方法诊断弓形虫病进行评价, 认为该法是检测弓形虫抗体的一种可重复的方法, 易自动化和标准化^[5]。与染色试验(DI)符合率高, 且敏感性强。近年来随着分子生物学技术的应用, 重组抗原取代天然抗原作为诊断抗原, 省去抗原制备的繁琐过程, 从而达到经济、特异和安全的目的, 使血清学方法有了更广泛的应用前景。国外许多实验室也有用重组抗原诊断弓形虫病的报道, 如 Lecorder 等用重组的致密颗粒抗原(Dense granule antigen, GRA), GRA1 和 GRA6 作为诊断用抗原, 取得良好效果^[6]。国内贾雪梅等也建立了 GRA1 基因的体外扩增方法。进一步研究发现 GRA1 与 GRA6-N 联合应用可使敏感性达 98%, GST-GRA6-N 与 GRA1 联合采用 ELISA 法可用于弓形虫病的血清学诊断^[7]。

2.2.3 亲和素-生物素-酶联免疫吸附试验(ABC ELISA)。同 ELISA 相比, 该法优点更为明显。ABC ELISA 的基本原理

作者简介 李潭清(1969-), 男, 河北沧州人, 实验师, 从事预防兽医学研究。

收稿日期 2008-10-13

是通过亲和素对生物的高度亲和力,与导入生物素的酶分子密切结合,产生多极放大作用。国内外资料显示,ABC-ELISA 比 ELISA 法的敏感性高3~8倍,且该法显色更为清晰,能减少假阳性率,为弓形虫微量抗原/抗体的检测开辟了新路。

2.2.4 免疫吸附凝集试验(Immunoabsorption agglutination assay, ISAGA)。该法整合了抗体捕获法和凝集试验方法。张述义等报道了检测弓形虫病IgM抗体免疫吸附凝集试验,共检测孕妇44例,总符合率为93.2%,ISAGA的滴度较玻片HA高18倍^[8]。用WHO国际生物标准化实验室提供的抗弓形虫患者血清定量测得其灵敏度为0.08 IU/ml,且具有敏感性高、特异性强、操作简便等优点。

2.2.5 抗体亲和度(Avidity)的酶联免疫吸附试验。抗体亲和度指抗原、抗体间结合的强度。IgG亲和度试验可用于确认既往或新近感染。原理是基于测量特异抗弓形虫IgG抗体亲和度(功能亲和力)。在免疫刺激的演变中,抗体亲和力水平在数周或数月内累积提高,IgG亲和力水平的提高源于抗原驱使B细胞的选择处理^[9],结果导致抗原-抗体结合位点的补充。抗体与抗原的紧密结合是通过化学力如氢键、静电力和范德华力来维系。在抗弓形虫IgG抗体亲和度的酶联免疫吸附试验中,尿素或其他蛋白变性剂可用来拆分抗原-抗体复合物。滴度不但反映尿素抵抗和总IgG,而且还可通过检测未处理过的尿素和样品的光密度(OD值)比值来定量。这种方法最初由芬兰的Hedman等使用,可用于确认患者的感染是发生在4~5个月前^[10]。这对于怀孕动物最初的抗弓形虫IgG和IgM阳性试验十分有用。但是,亲和度试验不能单独作为确证实验,目前尚无任何亲和度试验被美国FDA批准通过^[11]。

2.2.6 免疫印迹技术(immunity blotting test, IBT)。又称Western印迹试验,是以聚丙烯酰胺凝胶电泳、转移电泳、固相酶免疫试验联合应用的实验新技术。母-婴配对的IgG和IgM蛋白印迹试验是较为敏感的一种诊断先天性弓形虫病的新技术。血清学诊断新生儿先天性弓形虫病通常是检测婴儿血清IgM或IgA抗体。母亲的IgG可以传给胎儿,因而即使婴儿血清中检出IgG也不能作出诊断。而母体的IgM和IgA也可能在分娩的过程中通过子宫传递给婴儿。由于IgM和IgA的半衰期相对短暂,对于IgM阳性结果一般必须在2~4d后复查,而IgA阳性者须在10d后复查。此外在新生儿期,一些先天性弓形虫病新生儿可能IgM或IgA或二者同时阴性。Rilling等报道用母-婴配对的IgG和IgM蛋白印迹试验检测175例婴儿,达到67%(出生时)敏感度和96%特异度^[12]。当与其他血清学方法组合使用,敏感性可达78%(出生时)、85%(生后3个月内)。整合传统的血清学方法,蛋白印迹可于3个月内检测到94%的先天性感染。IBT可望成为高度敏感和特异的诊断弓形虫病和区别感染期的有效方法^[13-14]。

2.3 免疫金银染色法由电镜示踪技术发展而来的一种极为敏感、特异的细胞化学和免疫组化技术。张阳根等用该法检测弓形虫抗体获得了满意效果,且与IFAT法比较,结果2法测得值高度一致^[15]。

2.4 乳胶凝集试验(LAT)以胶乳微粒作为载体的凝集反

应。陈雅堂等用LAT法检测672份育龄妇女血清弓形虫抗体,阳性率为3.1%^[16]。该法有较好的敏感性和特异性,方法简便,判断结果快速,适于现场应用。

3 核酸检测

3.1 核酸分子杂交(Nucleic acid hybridization) Angel等用ABGTg⁷标记的探针点杂交检测急性弓形虫脑炎患者的DNA,敏感度为66.7%^[17]。Blanco等用限制性内切酶HpaII切割弓形虫DNA得到一些重复的DNA片段,通过点杂交pTg4可以检测80pg的弓形虫DNA^[18]。Gajadhar等用³²P标记的20个碱基的寡核苷酸探针检测SSUrRNA,也达到1ng的检测水平^[19]。国内夏爱娣等首次应用DNA探针进行弓形虫病的病原检测,用³²P标记弓形虫DNA与无脑儿、脑积水及死胎标本的DNA进行分子杂交,结果7例中5例阳性^[20]。

3.2 聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR) PCR是一种非常敏感、特异、高效、快速的检测方法,但检测结果的可信度不足,在提高特异性方面,除了引物扩增靶基因特异及选择最优化的扩增条件外,还可通过“热启动”来减少引物的非特异性结合。由于PCR的高丰度,携带污染是造成PCR假阳性的主要原因。这可通过设立阴性对照来查明,也可使用dUTP/UDG酶法消除。对于假阴性,可能是存在PCR抑制物,可通过同时扩增内部阳性对照(Internal positive control, IPC)来避免。通过PCR检测寄生虫DNA被认为是提高诊断,特别是产前先天性弓形虫病的可靠方法^[21-22]。

3.2.1 引物。常用的引物靶基因有B1基因、P30(SAG1)基因和18srDNA,均为所有弓形虫株里高度保守的DNA基因^[23]。Ranzan等针对这3个基因分别用前人已经使用过的引物,用同时对水及弓形虫感染者的眼房水进行扩增,结果发现B1基因能够检测到50fg(近似为1个速殖子)弓形虫的量,而P30和rDNA引物的敏感性均低于B1基因,由此认为B1基因最为敏感和特异,可作为弓形虫检测的理想目的基因^[24]。

3.2.2 PCR类型。

3.2.2.1 传统PCR(Conventional PCR)。1989年美国斯坦福大学医学院Burg等首先以弓形虫拷贝的B1基因为靶基因,建立了弓形虫的PCR检测技术,可达到在 1×10^5 个人类细胞中检测到1个弓形虫的敏感性^[23]。在Romand等的研究中,PCR对于羊水检测的总体敏感度为64.0%,阴性预测值为87.8%,而特异度和阳性预测值均为100%^[25]。

3.2.2.2 巢式PCR(Nested PCR)。巢式PCR由于需选用2对引物2次识别靶基因,并进行2次扩增,因此特异性和敏感性均高于传统PCR。国内王胜昌等根据弓形虫P30基因序列设计2对引物,分别进行了PCR1次扩增和巢式扩增,结果提示巢式扩增比1次扩增具有更高的敏感性,用外引物进行扩增后,最低可以检测到1pg的弓形虫DNA^[26]。

3.2.2.3 实时荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, real-time FQ PCR)。实时荧光定量PCR为PCR技术的革命性进展,可同时对核酸进行扩增及定量。通过定量分析DNA或RNA样本的拷贝数,准确检测出样品中的基因数目,在临床上具有重要的意义和应用前景。对于常规实验室来说最为重要的是,实时PCR可从很大程度

上减少假阳性的发生。由于PCR产物的检测和数据分析是整合在实时PCR仪上,没有开管的后处理过程,避免了潜在的环境污染问题。实时PCR也提供给临床医生对治疗效果的评估,且时间不超过2h^[27]。就技术方法而言,FQPCR最简单的方法是使用SYBRGreen染料,核酸染料缚于双链DNA时能够极大地增加荧光值。通过分析溶解曲线和荧光数值就能够对初始模板DNA进行定量。对于诊断目的,确定产物是最重要的,通过使用特异的核酸探针来完成,PE/ABI研发使用的TaqMan技术是目前的主流,Lin等建立了以B1基因的实时定量PCR检测弓形虫的方法,可以检测出含0.05个速殖子的标本,具有高度重复性,可用于分析包括全血、羊水、房水等组织在内的临床样品^[28]。FQPCR与巢式PCR比较,具有简便、快捷和假阳性低的特点,且能够精确得出虫荷数,为临床评估提供客观依据。

4 发展与展望

病原学培养和动物接种操作复杂,但却是弓形虫检测的金标准。传统的血清学方法,在区分现症和既往感染及诊断免疫缺陷患者方面有缺陷,但由于操作简单,仍然是各实验室的首选方法^[29]。现代PCR方法虽大大改善了弓形虫病的诊断,但仍存在很多问题。随着免疫技术的发展及分子生物学、单克隆抗体^[30]的应用,DNA探针的基因诊断,将使弓形虫的检测技术达到简易、微量、快速、准确和经济的目的,显著提高了诊断水平,对该病的防治要采取预防为主防重于治的原则,采取综合防治的措施。随着高新技术的应用,将使弓形虫实验室检测方法达到更高层次。

参考文献

- [1] CONLEY F K, JENKINS K A, REMINGTON J S. *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate *Toxoplasma* in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections [J]. *Hum Pathol*, 1981, 12(8): 690-698.
- [2] 孙新. 细胞培养和动物接种分离弓形虫病原比较研究[J]. 蚌埠医学院学报, 1996, 21(5): 291-292.
- [3] CHAI J Y, IINA, SHNE H, et al. Laboratory passage and characterization of an isolate of *Toxoplasma gondii* from an ocular patient in Korea [J]. *The Korean Journal of Parasitology*, 2003, 41(3): 147-154.
- [4] MILLER MA, GARDNER A, PACKHAMA, et al. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for demonstration of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sea otter (*Enhydra lutris*) [J]. *J Parasit*, 2002, 88(3): 594-599.
- [5] CARLIER Y, BAT D, DESSAINT J P, et al. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis [J]. *Bull World Health Organ*, 1980, 58(1): 99-105.
- [6] LECORDIER L, FOURMAUX M P, MERCIER C, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA 6 and GRA 1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, 7(4): 607-611.
- [7] 贾雪梅. 弓形虫GRA1基因的体外扩增、克隆及鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(3): 17-18.
- [8] 张述义, 魏梅雄, 赵惠芬, 等. 弓形虫病IgM免疫吸附凝集试验 (ISAGA) 的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(4): 225-227.
- [9] KLAREN V N, PEEK R. Evidence for a compartmentalized B cell response as characterized by IgG epitope specificity in human ocular toxoplasmosis [J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6263-6269.
- [10] HEDMANK K, LAPPALAINEN M, SEPPALAI, et al. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG [J]. *J Infect Dis*, 1989, 159(4): 736-739.
- [11] HESSENFELD O, MONTROYA J G, KINNEY S, et al. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory [J]. *J Infect Dis*, 2001, 183(3): 1248-1253.
- [12] RILLING V, DEIZ K, KREZAL D, et al. Evaluation of a commercial IgG IgM Western blot assay for early prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003, 22(3): 174-180.
- [13] HO YEN DO, CHAPMAN J, ASHBURN D. Immunoblotting can help the diagnosis of ocular toxoplasmosis [J]. *Mol Pathol*, 2000, 53(3): 155-158.
- [14] ROBERT G, HINSII P, ANTONETTI D, et al. Usefulness of immunoblotting and Goldmann-Witmer coefficient for ophthalmological diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004, 23(1): 34-38.
- [15] 张阳根. 免疫金银染色法检测抗弓形虫抗体[J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(1): 50.
- [16] 陈雅堂, 刘约瀚, 郑惠莲, 等. 重庆地区弓形体感染血清流行病学调查[J]. 中华传染病杂志, 1988, 6(4): 225-227.
- [17] ANGEL S O, MAITRAI M, MARGARIT J, et al. Screening for active toxoplasmosis in patients by DNA hybridization with the ABC Ig7 probe in blood samples [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(3): 591-595.
- [18] BLANCO J, ANGEL S, MAERO E, et al. Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, 46(3): 350-357.
- [19] GAJADHAR A, MARQUARDT W, BLAIR C. Development of a novel ribosomal RNA hybridization assay for the detection of *Sarcocystis* and other coccidia [J]. *Can J Vet Res*, 1992, 56(3): 208-213.
- [20] 夏爱娣, 顾允中, 徐世杰, 等. 特异弓形虫DNA顺序的克隆及用于弓形虫病的检测[J]. 上海医学, 1989, 12(9): 531.
- [21] BASTIEN P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2002, 96(S1): 205-215.
- [22] FARDEAU C, ROMAND S, RAO N A, et al. Diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis with atypical clinical features [J]. *Am J Ophthalmol*, 2002, 134(2): 196-203.
- [23] BURG J L, GROVER C M, POULETTY P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction [J]. *J Clin Microbiol*, 1989, 27(8): 1787-1792.
- [24] RAMZAN N, LOFTUS E, BURGART L J, et al. Diagnosis and monitoring of whipple disease by polymerase chain reaction [J]. *Ann Intern Med*, 1997, 126(7): 520-527.
- [25] ROMAND S, WALLON M, FRANCK J, et al. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis [J]. *Obstet Gynecol*, 2001, 97(2): 296-300.
- [26] 王胜昌, 谢建云, 邵伟娟, 等. 弓形虫PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 上海实验动物科学, 2003, 23(1): 15-17.
- [27] CLIN MICROBIOL, BRETAGNE S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays [J]. *Infect*, 2003, 9(6): 505-511.
- [28] LIN MH, CHENT C, KUOTT T, et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(11): 4121-4125.
- [29] VILLARD O, HUISETTI D, ROCHDERIES F, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic choro-retinitis [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(8): 3537-3541.
- [30] BOO YOUNG LEE, MYOUNG HEE A H N, HYUN CHUL KI M, et al. *Toxoplasma gondii*: Ultrastructural localization of specific antigens and inhibition of intracellular multiplication by monoclonal antibodies [J]. *Korean Journal of Parasitology*, 2001, 39(1): 67-75.