

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 486—2015

弓形虫病的诊断

Diagnosis of toxoplasmosis

2015-12-15 发布

2016-06-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

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：浙江省医学科学院寄生虫病研究所、中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、江西省寄生虫病防治研究所。

本标准主要起草人：闻礼永、严晓岚、官亚宜、张剑锋、林丹丹。

弓形虫病的诊断

1 范围

本标准规定了弓形虫病的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级医疗机构和疾病预防控制机构对弓形虫病的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

弓形虫 *Toxoplasma*

一种寄生于人和动物体内的原虫,可寄生于人体几乎所有有核细胞内,因滋养体似弓形或半月形而被命名为弓形虫,可引起人体弓形虫感染或弓形虫病,参见附录A。

2.2

弓形虫感染 *Toxoplasma infection*

弓形虫经人体消化道黏膜、损伤的皮肤、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,仅弓形虫病原学阳性。有先天性和获得性两种感染途径。

2.3

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临床症状和体征。免疫功能低下或缺陷时易发病,为机会性人兽共患寄生虫病。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

有猫、犬等宠物饲养或接触史,或有生食或半生食猪、羊、牛、犬等动物肉类及其制品史,或有皮肤黏膜损伤、器官移植输血史,或有免疫功能低下或缺陷史,或妇女妊娠期有上述暴露史等,参见附录B。

3.2 临床表现

弓形虫感染有先天性和获得性两种途径。妇女在妊娠期感染弓形虫后多数可造成胎儿先天性感染,一般婴幼儿期常不出现明显临床症状和体征。当各种原因造成免疫功能低下时,儿童期可呈现中枢神经系统损害表现,成人期可出现视网膜脉络膜炎等。妇女妊娠初期感染弓形虫后少数可出现流产、早产、死产或畸形,妊娠中晚期感染弓形虫可造成胎儿出生后有脑、眼、肝、心、肺等部位的病变或畸形。

免疫功能正常者获得性感染弓形虫后,多数不出现明显临床症状和体征,为隐性感染。当免疫功能低下或缺陷时,弓形虫可侵犯人体各个器官而引起相应严重临床表现,如弓形虫脑病、弓形虫眼病、弓形虫肝病、弓形虫心肌心包炎、弓形虫肺炎等,参见附录C。

3.3 实验室检查(见附录D)

3.3.1 弓形虫抗体(IgG、IgM)阳性。

- 3.3.2 弓形虫循环抗原(CAg)阳性。
- 3.3.3 弓形虫核酸阳性。
- 3.3.4 血液、体液或穿刺液涂片或病理切片染色镜检发现弓形虫。
- 3.3.5 血液、体液或穿刺液经动物接种分离发现弓形虫。

4 诊断原则

根据流行病学史、临床表现及实验室检查结果等予以诊断。

5 诊断

5.1 弓形虫感染

无明显临床症状和体征，并同时符合 3.1 和 3.3.4、3.3.5 中任一条。

5.2 弓形虫病

5.2.1 疑似病例

同时符合 3.1 和 3.2。

5.2.2 临床诊断病例

疑似病例并同时符合 3.3.1、3.3.2、3.3.3 中任一条。

5.2.3 确诊病例

临床诊断病例并同时符合 3.3.4、3.3.5 中任一条。

6 鉴别诊断(参见附录 E)

6.1 先天性弓形虫感染

应与巨细胞病毒感染、疱疹病毒感染、风疹病毒感染等疾病进行鉴别。

6.2 获得性弓形虫感染

应与传染性单核细胞增多症、淋巴结结核、视网膜脉络膜炎等疾病进行鉴别。

附录 A
(资料性附录)
病原学

A.1 概况

弓形虫最早发现于刚地梳趾鼠(*Ctenodactylus gondii*)体内单核细胞中,是一种能寄生于人体几乎所有有核细胞内的原虫,猫科动物为其唯一终末宿主,其他哺乳动物、鸟类和人类都可为其中间宿主。其发育全过程有滋养体(包括速殖子和缓殖子)、包囊、裂殖体、配子体和卵囊等5种生活史阶段,临幊上有诊断价值的为速殖子(假包囊)和包囊。

A.2 形态

A.2.1 速殖子(假包囊)

速殖子(tachyzoite)呈香蕉形或半月形,前端较尖,后端较钝。长 $3\text{ }\mu\text{m}\sim7\text{ }\mu\text{m}$,最宽处 $2\text{ }\mu\text{m}\sim4\text{ }\mu\text{m}$ 。经Giemsa法染色后胞浆呈蓝色,胞核呈紫红色,位于虫体中央稍偏后。

细胞内寄生的速殖子不断增殖,一般含数个至十多个,其被宿主细胞膜包绕的虫体集合体没有真正的囊壁,称为假包囊(pseudocyst)。

A.2.2 包囊

包囊(cyst)呈圆形,具有由虫体分泌的一层富有弹性的坚韧囊壁,内含数十个至数千个缓殖子(bradyzoite)。缓殖子直径范围为 $5\text{ }\mu\text{m}\sim100\text{ }\mu\text{m}$,多见于脑、骨骼肌、视网膜及其他组织内,可长期在组织内生存。

A.3 生活史

在终宿主体内的发育过程:猫科动物吞食卵囊、包囊或假包囊后,在小肠内逸出子孢子、缓殖子或速殖子,侵入小肠上皮细胞发育增殖,形成裂殖体。裂殖体成熟后释出裂殖子,再侵入其他肠上皮细胞形成下一代裂殖体。经过数代后,部分裂殖子发育为雌、雄配子体,再继续发育为雌、雄配子。雌、雄配子受精成为合子,继续发育形成卵囊,从上皮细胞内逸出进入肠腔,随粪便排出体外。在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度和适宜湿度环境条件下,经 $2\text{ d}\sim4\text{ d}$ 发育为具有感染性的成熟卵囊。同时,弓形虫也可在猫科动物的肠外组织中进行无性增殖。

在中间宿主体内的发育过程:当猫粪内的卵囊或动物肉类中的包囊或假包囊被人、羊、猪、牛等中间宿主吞食后,在肠内逸出子孢子、缓殖子或速殖子,侵入肠壁经血或淋巴液进入单核巨噬细胞内寄生,并扩散到全身各组织器官,如脑、眼、肝、心、肺、肌肉等,进入细胞内以二分裂或内芽生增殖形成假包囊,当细胞破裂后,速殖子侵入其他组织细胞。当机体免疫功能正常时,部分速殖子侵入宿主细胞,特别是脑、眼、骨骼肌等组织,虫体增殖速度减慢并分泌囊性物质形成包囊。包囊在宿主体内可存活数月、数年或更长时间。当机体免疫功能低下或缺陷时,可诱发包囊发育而破裂,释出缓殖子,进入血流并侵入其他组织细胞形成假包囊,继续发育增殖。

附录 B
(资料性附录)
流行病学

B.1 流行概况

弓形虫是重要的机会性致病寄生虫,呈世界性分布,人群感染相当普遍,多属隐性感染。全国人畜弓形虫病调查研究协作组(1983年~1986年)采用IHA方法调查19个省(直辖市、自治区)141个县的81 968名居民,结果血清弓形虫抗体阳性率为0.33%~11.79%,平均阳性率为5.16%。全国人体重要寄生虫病现状调查(2001年~2004年)报告,采用ELSA方法在15个省(直辖市、自治区)检测47 444人,结果血清抗体阳性率为0.79%~16.81%,平均阳性率为7.88%,抗体阳性率随年龄增加呈上升趋势。

B.2 传染源

随粪便排出弓形虫卵囊的猫科动物是最重要传染源,其次为感染弓形虫的其他哺乳动物、鸟类等温血动物。弓形虫可通过胎盘感染胎儿,故受感染的母亲也是传染源。

B.3 传播途径

先天性弓形虫感染是指经母体胎盘感染胎儿;获得性弓形虫感染是指经人体消化道黏膜、损伤皮肤、输血、器官移植等途径传播。

B.4 易感人群

人类对弓形虫普遍易感,尤其是胎儿、婴幼儿、饲养或接触猫犬等宠物者、动物饲养员、屠宰工以及各种免疫功能低下或缺陷者。

B.5 流行因素

弓形虫卵囊在外界具有较强的抵抗力,寒带、温带、热带地区均有分布,没有严格的地理分布界线。人群感染弓形虫与饲养宠物、饮食习惯等有关。在食品加工过程中,如生熟不分造成交叉污染可增加弓形虫感染机会。

附录 C
(资料性附录)
临床表现

C.1 弓形虫感染

免疫功能正常者感染弓形虫后,包囊可长期寄生于中枢神经系统或横纹肌内,临幊上多无明显症状和体征,仅弓形虫病原学检测阳性。

C.2 弓形虫脑病

临幊上表现为脑炎、脑膜炎、脑膜脑炎、癫痫、精神异常等,可出现头痛、眩晕、谵妄、肌痛、淋巴结肿大等,脑脊液中可查见弓形虫速殖子。

C.3 弓形虫眼病

主要为复发性、局限性、坏死性视网膜脉络膜炎,临幊上表现为视力模糊、眼痛、畏光、盲点和流泪等。眼底表现为后极部视网膜水肿,黄斑渗出性病灶。新鲜病灶边界模糊,青灰色,轻度隆起,周围有视网膜出血;陈旧性病灶为卫星状散在白色圆形斑块及色素斑,或黄斑部色素上皮脱落。

C.4 弓形虫肝病

弓形虫破坏肝细胞引起肝实质炎症浸润和局部坏死,临幊上表现为食欲减退、肝区疼痛、腹水、轻度黄疸、肝硬化、脾肿大等,病程长易复发。

C.5 弓形虫心肌心包炎

临幊上可出现发热、腹痛、扁桃体炎、眼睑浮肿等,常无明显心脏异常症状,也可出现心悸、颈静脉怒张、胸痛、呼吸困难等,偶可闻及心包摩擦音。重者可出现胸前或胸骨后钝痛、锐痛,疼痛向颈部和肩部放射,如不及时治疗可出现心力衰竭。

C.6 弓形虫肺炎

临幊上表现有咳嗽、咳痰、胸痛、气短、肺部啰音等,X线检查有炎症浸润灶。肺部病变多合并巨细胞病毒和细菌感染,呈间质性和小叶性肺炎表现。

C.7 其他

妇女妊娠初期感染弓形虫可通过胎盘屏障,常使胎儿发生广泛病变而导致流产、早产、死产等,可见无脑儿、脑积水、小头畸形、小眼畸形、智力发育不全等,成为人类先天性感染中最为严重的疾病之一。

附录 D
(规范性附录)
实验室检查

D.1 弓形虫 IgG 抗体检测**D.1.1 方法**

采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)法,检测人血清、血浆或其他体液样品中弓形虫 IgG 抗体。

D.1.2 试剂组成

由弓形虫抗原包被的 96 微孔板、人葡萄球菌蛋白 A(SPA)或抗人 IgG 酶标记物液、样本稀释液(含 0.9% 氯化钠的生理盐水)、洗涤液(含有 Tween-20 缓冲液)、终止液(主要成分为 1 mol/L 硫酸溶液)、阳性对照、阴性对照、底物 A 液(主要成分为过氧化脲)、底物 B 液(主要成分为四甲基联苯胺)组成。

D.1.3 操作步骤

在洁净试管中加入 1 mL 稀释液,然后加 10 μ L 待检样品液,混匀。每孔中加入稀释的待检样品 100 μ L,设阳性对照 1 孔,阴性对照 2 孔(每孔分别加阳性对照、阴性对照 2 滴),并设空白对照 1 孔,置 37 °C 孵育 30 min。随后弃去孔中液体,用洗涤液洗涤 5 次,每次间隔 1 min,甩干。除空白对照孔外,每孔加入 1 : 50 稀释的酶标记物液 50 μ L(即 1 mL 稀释液中加入酶结合物 20 μ L),37 °C 孵育 30 min。随后弃去孔中液体,用洗涤液洗涤 5 次,每次间隔 1 min,甩干。每孔先后加底物 A 液、底物 B 液各 1 滴,轻叩反应板使之混匀,室温避光放置 5 min ~ 10 min。每孔加终止液 1 滴。

D.1.4 结果判定

采用比色计数法,以空白孔调零,用酶标仪测定各孔 450 nm 波长 OD 值。如 S/N(样品孔 OD 值 / 阴性对照孔 OD 均值) ≥ 2.1 ,结果判为阳性。

D.2 弓形虫 IgM 抗体检测**D.2.1 方法**

采用抗体捕捉 ELISA 法,检测人血清、血浆或其他体液样品中弓形虫 IgM 抗体。

D.2.2 试剂组成

由抗人 IgM- μ 链抗体包被的 96 微孔板、弓形虫抗原液、抗弓形虫抗体酶标记物液、样本稀释液、洗涤液、终止液、阳性对照、阴性对照、底物 A 液、底物 B 液组成。

D.2.3 操作步骤

每孔中加稀释液 90 μ L,然后加待检样品液 10 μ L,充分混匀,设阳性对照 1 孔,阴性对照 2 孔(每孔分别加阳性对照、阴性对照 2 滴),并设空白对照 1 孔,置 37 °C 孵育 30 min。随后弃去孔中之液体,用洗涤液洗涤 5 次,每次间隔 1 min,甩干。除空白对照孔外,每孔先加入抗原液 1 滴,随后加 1 : 50 稀释的酶标记物液 50 μ L(即 1 mL 稀释液中加入酶结合物 20 μ L),轻叩反应板使之混匀,37 °C 孵育 30 min。随后弃去孔中之液体,用洗涤液洗涤 5 次,每次间隔 1 min,甩干。每孔先后加底物 A 液、底物 B 液各 1 滴,轻叩反应板使之混匀,室温避光放置 5 min ~ 10 min。每孔加终止液 1 滴。

1滴,轻叩反应板,室温避光放置10 min~20 min。每孔加终止液1滴。

D.2.4 结果判定

采用比色计数法,以空白孔调零,用酶标仪测定各孔450 nm波长OD值。如S/N(样品孔OD值/阴性对照孔OD均值)≥2.1,结果判为阳性。

D.3 弓形虫IgG抗体和IgM抗体的临床意义与处理方法

弓形虫抗体检测是目前最主要的辅助检查方法,通常需联合进行IgG和IgM抗体平行检测,弓形虫血清学抗体检测结果的临床意义见表D.1。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 D.1 弓形虫 IgG 抗体和 IgM 抗体的临床意义与处理方法

IgG结果	IgM结果	临床意义	处理方法
阴性	阴性	无弓形虫感染的血清学证据	如果临床症状和体征持续存在,3周后重新采集标本复查
阴性	可疑阳性	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,患者可能未感染弓形虫
阴性	阳性	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
可疑阳性	阴性	不确定	重新采集标本检测IgG
可疑阳性	可疑阳性	不确定	重新采集标本检测IgG和IgM
可疑阳性	阳性	可能近期急性弓形虫感染	3周后重新采集标本检测IgG和IgM
阳性	阴性	通常弓形虫感染超过6个月	—
阳性	可疑阳性	弓形虫感染,但IgM结果可疑可能由于近期感染或IgM假阳性	3周后重新采集标本检测
阳性	阳性	可能近期弓形虫感染	—

D.4 弓形虫CAg检测

D.4.1 方法

采用ELISA双夹心一步法,检测人血清样品中弓形虫CAg。

D.4.2 试剂组成

由纯化抗弓形虫特异性抗体(多抗)包被的96微孔板、抗弓形虫特异性抗体酶标记物液、样本稀释液、洗涤液、终止液、阳性对照、阴性对照、底物A液、底物B液组成。

D.4.3 操作步骤

每孔中加稀释液40 μL,然后加待测样品液10 μL,充分混匀,并设阳性对照1孔,阴性对照1孔、空白对照1孔(每孔分别加阳性对照、阴性对照、稀释液各1滴)。除空白对照外,各孔随后加稀释的酶

标记物液 50 μL , 轻叩反应板使之混匀, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。随后弃去孔中之液体, 用稀释液洗涤 5 次, 每次间隔 1 min, 甩干。每孔先后加底物 A 液、底物 B 液各 1 滴, 室温避光放置 10 min~20 min。每孔加终止液 1 滴。

D.4.4 结果判定

采用比色计数法, 以空白孔调零, 用酶标仪测定各孔 450 nm 波长 OD 值。如 S/N(样品孔 OD 值/阴性对照孔 OD 均值) $\geqslant 2.1$, 结果判为阳性。

D.5 弓形虫核酸检测

D.5.1 方法

采用聚合酶链式反应(PCR)技术, 从 B1 基因和 AF146527 序列等选取靶基因, 对弓形虫特异性 DNA 核酸片段进行荧光 PCR 检测。

D.5.2 试剂组成

由核酸抽提液、弓形虫核酸荧光 PCR 检测混合液、酶(Taq+UNG)、水(H_2O)、内部对照品、阳性对照品组成。

D.5.3 操作步骤

首先进行标本、对照品的核酸裂解处理。如为血液或体液, 取 50 μL 样本, 加 50 μL 核酸提取液, 振荡 10 s, 99 $^{\circ}\text{C}$ 干浴或水浴 10 min, 2 500 g 离心 10 min, 保留上清备用。如为粪便, 挑取米粒大小粪便放置于含 0.5 mL 生理盐水的离心管中, 振荡混匀, 2 500 g 离心 2 min, 去尽上清, 沉淀中直接加入 100 μL DNA 提取液充分混匀, 沸水浴 10 min, 2 500 g 离心 5 min, 取上清 4 μL 进行 PCR 反应, 取水(H_2O)作为阴性对照。然后进行试剂配制, 取 35 μL 弓形虫核酸荧光 PCR 检测混合液与 1 μL 内部对照品, 以及 0.4 μL 酶(Taq+UNG), 振荡混匀数秒, 1 358 g 离心数秒。取上述混合液 36 μL 置于 PCR 反应管, 然后将已处理标本、阳性对照品、水(H_2O)各 4 μL 分别加入 PCR 反应管, 盖好管盖, 置于定量荧光 PCR 仪上, 分别设置循环参数为 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min、93 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 四个参数循环 40 次。单点荧光检测在 60 $^{\circ}\text{C}$, 反应体系为 40 μL 。荧光检测选用羧基荧光素(FAM)和六氯荧光素(HEX)通道, 基线调整取 6~15 个循环的荧光信号, 阈值设定原则以阈值线刚好超过水(H_2O)检测荧光曲线的最高点。

D.5.4 结果判定

在 FAM 通道, 当 $\text{Ct}(\text{Crossing point})$ 值 $\leqslant 38$ 时, 结果判为阳性。

D.6 病原学检查

D.6.1 直接镜检

取外周血或脑脊液、视网膜下渗出液、房水、胸水、腹水、羊水等待检血液或体液, 500 g 离心 10 min, 取沉淀液进行涂片, 经干燥、固定和 Giemsa 法染色, 光镜下如查到弓形虫速殖子(假包囊)则判为病原学阳性。

取活检组织, 病理切片后经 Giemsa 法染色, 光镜下如检测到弓形虫包囊或速殖子(假包囊)则判为病原学阳性。

D.6.2 动物接种

取外周血或脑脊液、视网膜下渗液、房水、胸水、腹水、羊水等待检血液或体液,无菌接种于6周~8周龄清洁级健康小鼠腹腔内,每只接种1mL。逐日观察,如接种2周~3周后如小鼠出现皮毛松竖、不活泼、弓背、闭目、腹部膨大、颤动或呼吸急促等症状,应立即剖杀。取小鼠腹腔液以及肝、脾、脑等组织,经研磨过滤500g离心10min后制成涂片,Giemsa法染色后镜检,如查到弓形虫速殖子(假包囊)或包囊则判为病原学阳性。

如首次接种结果为阴性或小鼠未发生死亡,无菌取其脑、肝、心、肺、淋巴结等组织各2g,放入组织研钵中研磨成匀浆,加0.9%生理盐水配制10%~20%的组织悬浮液,再次接种6周~8周龄清洁级健康小鼠腹腔内。小鼠盲传至少3代,每2周1次,如查到弓形虫则判为病原学阳性。

附录 E
(资料性附录)
鉴别诊断

E.1 巨细胞病毒感染

婴儿感染巨细胞病毒后,可以出现肝脾肿大、血小板减少、小头畸形等临床表现,尿中可查到巨细胞病毒包涵体,鼻咽部、血或尿中可分离出巨细胞病毒,血清巨细胞病毒特异性抗体检测阳性等。

E.2 疱疹病毒感染

婴儿感染疱疹病毒后,可以出现高热、热退疹出或疹出热退、颈周淋巴结肿大等临床表现,脑脊液呈病毒感染改变,外周血白细胞总数减少,淋巴细胞增多,血清疱疹病毒特异性抗体检测阳性等。

E.3 风疹病毒感染

婴儿感染风疹病毒后,可以出现发热、黏膜玫瑰色或出血点、肌张力低下等临床表现。出生前诊断主要依据从羊水中分离到风疹病毒,出生后诊断则主要依据从喉、尿液、脑脊液和其他组织中分离到风疹病毒,血清风疹病毒特异性抗体检测阳性等。

E.4 传染性单核细胞增多症

约有 10% 获得性弓形虫病误诊为传染性单核细胞增多症。传染性单核细胞增多症的异型淋巴细胞常占白细胞总数 10% 以上,无嗜酸粒细胞增多,血清嗜异性凝集抗体滴度 $\geq 1: 64$;而弓形虫病的异型淋巴细胞常占白细胞总数 10% 以下,可有轻度嗜酸粒细胞增多,血清嗜异性凝集抗体阴性等。

E.5 淋巴结结核

以颈部淋巴结结核最常见,主要侵犯颌下、颈前区沿胸锁乳突肌前缘等部位的淋巴结,常为一侧性,可以软化后变为冷性脓肿,向外穿破而遗留瘘管,结核菌素试验常呈阳性反应;而弓形虫性淋巴结炎也以颈部多见,但炎症发展缓慢,肿大程度常不出现压迫症状,血清弓形虫特异性抗体或抗原试验阳性等。

E.6 视网膜脉络膜炎

巨细胞病毒感染、结核病、梅毒、钩端螺旋体病、布鲁氏菌病、组织胞浆菌病、类肉瘤病等均可引起视网膜脉络膜炎,但弓形虫引起的视网膜脉络膜炎特征性损伤为眼底局灶坏死性脉络膜炎,表现为视力模糊、盲点、怕光、疼痛、泪溢、中心性视力缺失等。

参 考 文 献

- [1] 吴观陵.人体寄生虫学.4版.北京:人民卫生出版社,2013
 - [2] 闻礼永.儿童寄生虫病学.北京:人民卫生出版社,2010
 - [3] 甘绍伯.有关弓形虫病诊断的思考.中国热带医学,2001,1(2):121-123
 - [4] 周晓农.人体寄生虫病基层预防控制丛书.北京:人民卫生出版社,2009
 - [5] 马亦林.传染病学.4版.上海:上海科学技术出版社,2005
 - [6] 薛纯良.孕期弓形虫感染的诊断、治疗和预防.中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2000,18(1):55-57
 - [7] 于恩庶.弓形虫病学.福州:福建科学技术出版社,1992
-