

文章编号: 1000-7423(2007)-06-0511-02

## 微孔板弓形虫染色试验

许慧<sup>1\*</sup>, 倪安平<sup>2</sup>, 崔清涛<sup>2</sup>, 郝英<sup>2</sup>

**【提要】** 以细胞培养的方法传代弓形虫, 建立微孔板弓形虫染色试验。血清与弓形虫虫体经孵育后, 用碱性美蓝染色, 计数 100 个虫体, 记录染色与未染色虫体的比例, 标本中 50% 虫体着色的稀释度为终点稀释度。弓形虫悬液浓度为 10%/ml, 辅助因子中含 1% 枸橼酸钠时, 弓形虫染色效果最好, 微孔板染色试验的稳定性良好。

**【关键词】** 弓形虫; 染色实验; 微孔板

中图分类号: R382.5 文献标识码: B

## A Modified Dye Test for *Toxoplasma gondii* Infection

XU Hui<sup>1\*</sup>, NI An-ping<sup>2</sup>, CUI Qing-tao<sup>2</sup>, HAO Ying<sup>2</sup>

(1 Department of Clinical Laboratory, Meitan General Hospital, Beijing 100028, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100028, China)

**【Abstract】** A modified dye test with microplate was to be established to detect *Toxoplasma* antibodies with cell-cultured *Toxoplasma gondii*. Numbers of stained and unstained tachyzoites were estimated in every 100 tachyzoites in each well after dyeing with methylene blue. The dilution with 50% tachyzoites stained was used as final dilution. Better results of the microplate dye test has been received when the concentration of tachyzoites in suspension reaches 10%/ml with 1% sodium citrate as accessory factor.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; Dye test; Microplate

\* Corresponding author, E-mail: huixu2004@tom.com

1948 年 Sabin 等<sup>[1]</sup>首次应用染色试验(dye test, DT)检测弓形虫感染。该试验是弓形虫病特有的一种免疫反应, 为补体

作者单位: 1 煤炭总医院检验科, 北京 100028  
2 北京协和医院检验科, 北京 100730

\* 通讯作者, E-mail: huixu2004@tom.com

介导的中和试验。染色试验测定总抗体(包括 IgM、IgG、IgA 等)<sup>[2]</sup>, 具有较高的敏感性和特异性, 是弓形虫血清学检测的金标准。传统染色试验使用的弓形虫是通过小鼠腹腔注射的方式获得, 采用试管法, 操作复杂, 且易混杂有鼠源性成份而影响试验结果。微孔板染色试验通过细胞培养法获取弓形虫

至于原文中的“蛇舌形虫”与引起人类鼻咽舌形虫病的锯齿舌形虫 (*Linguatula serrata*) 相比较, 前者大小 3.37 cm×0.26 cm, 体圆柱型, 后者雌虫(8.0~13.0) cm×(1~2) cm, 雄虫(1.8~2) cm×(0.3~0.7) cm<sup>[6]</sup>, 若虫(0.34~0.65) cm×(0.8~1.52) cm<sup>[9]</sup>, 体纺锤形、前宽后窄, 背略隆起、腹扁平。两虫大小和体形迥异, 且至今全球在患者鼻腔中检获成虫仅 2 例, 人是锯齿舌形虫的异常终宿主, 若虫一般不在人体内成熟<sup>[3]</sup>。综上所述分析比较, 原文中的病原, 既非蛇舌状虫又非锯齿舌形虫, 鉴定错误。根据原文记述, 该患者务农, 故本文作者推测患者很可能在稻田喝生水, 病原“蛇舌形虫”应是入侵鼻腔的蚂蝗。

### 参 考 文 献

[1] Xie QG, Liu YZ, Lu YL, et al. A case of porocephalosis[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2002, 15: 34 (in Chinese)  
(谢庆远, 廖远忠, 陆去龙, 等. 蛇舌形虫病 1 例报告[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15: 34.)

[2] Sambon LA. Synopsis of the family Linguatulidae[J]. J Trop Med Hyg, 1922, 188-208, 391-428.

[3] Qiu MH. Pentastomiasis[A]. In: Chen XB, Wu GL, Sun X, et al.

Modern Parasitology[C]. Beijing: People's Military Medical Publisher, 2002. 943-757. (in Chinese)  
(裘明华, 舌形虫病[A]. 见: 陈兴保, 吴观陵, 孙新, 等. 现代寄生虫病学[C]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 943-957.)

[4] Fain A. Les pentastomides de l' Afrique centrale[J]. Ann Mus Roy Afr Centr, Serie 8 Sci Zool, 1961, 92: 1-115.

[5] Fain A, Salvo G. Pentastomose humaine produite par des nymphes d' *Armillifer grandis* (Hett) en Republique Democratique du Congo[J]. Ann Soc Belge Med Trop, 1966, 46: 675-682.

[6] Patton WS, Evans AL. Insects, ticks mites and venomous animals of medical and veterinary importance [M]. Medical London: Grubb, 1929. 664-666.

[7] Prathap K, Lau KS, Bolton LM. Pentastomiasis: a common finding at autopsy among Malaysian aborigines[J]. Am J Trop Med Hyg, 1969, 18: 20-27.

[8] Self JT, Kuntz RE. New pentastomida, *Sambonia parapodum* n.sp. from *Varanus salvator*, and *Armillifer agkistrodontis* n. sp. from *Agkistrodon acutus*[J]. Trans Am Microsc Soc, 1966, 85: 256-260.

[9] Tobie JE, Edgcomb JH, Freirech EJ. Tongue worm (*Linguatula serrata*) infestation in a patient with acute leukemia[J]. Am J Pathol, 1957, 28: 628-633.

(收稿日期: 2007-03-24 编辑: 高石)

体,采用微孔板染色,具有稳定性好等特点。研究结果报告如下。

## 1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂 弓形虫 RH 株、绿猴肾细胞(Vero)购自美国 NCCLS 公司, RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司。细胞培养液(1 000 ml, 含 RPMI 1640 14.3 g, NaHCO<sub>3</sub> 3 g), 过滤除菌, 使用前加入 5%热灭活的胎牛血清及 50%的葡萄糖 1.2 ml。健康人血浆来自健康献血者。弓形虫阳性血清来自 2004 年在协和医院就诊临床确诊的弓形虫急性感染患者(有明确的接触史, ELISA 检测其 IgM 抗体滴度达 1:1 080)。

1.2 碱性美蓝工作液 甲液为 1.6%美蓝(美国 Sigma 公司)和 95%乙醇溶液, 过滤后备用; 乙液为 1.91%硼酸钠 0.3 ml, 0.53%碳酸钠 9.7 ml, pH 11 的缓冲液, 使用当天取 60 μl 甲液与 1 ml 乙液混匀后作为碱性美蓝工作液。

1.3 弓形虫悬液的制备 3 ml 绿猴肾细胞(Vero) 细胞与 1 ml 弓形虫 RH 株混合, 加入 20 ml 培养液悬浮后接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶内, 置于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。4 d 后 Vero 细胞出现明显病变后进行传代培养。感染弓形虫的 Vero 细胞 100% 出现病变时, 释放出密集的弓形虫虫体。将悬液收集至 250 ml 离心管中, 0.22 μm 过滤器过滤收集弓形虫, 900×g 离心 10 min。弃上清, 生理盐水洗 2 次, 将弓形虫悬液浓度调整至 10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup> 和 10<sup>9</sup> 个/ml 备用。

1.4 辅助因子的制备 采健康献血员 3 ml 静脉血, 分离血浆, 血浆中分别加入 0.5%、1.0%和 2.0%枸橼酸钠作为辅助因子。

### 1.5 微孔板弓形虫染色试验

1.5.1 微孔板弓形虫染色试验 采用棋盘法进行染色实验以确定合适的弓形虫悬液及枸橼酸钠浓度。血清于 56 ℃灭活 30 min (以去除血清中非特异性抗弓形虫成份的干扰), 取 25 μl 于微孔板中倍比稀释, 加入 50 μl 辅助因子及 25 μl 弓形虫抗原悬液。分别设阳性对照、辅助因子及生理盐水对照孔。混匀, 37 ℃温箱(REVCO, 美国)孵育 1 h, 每孔加入 25 μl 碱性美蓝工作液, 充分混匀。室温放置 15 min 后观察结果。结果判断标准: 生理盐水对照需 100%着色, 辅助因子对照不低于 90%着色, 阳性对照需 50%着色, 均呈蓝色。计数 100 个虫体, 记录染色与未染色虫体的比例, 以 50%虫体着色的稀释度为终点稀释度。

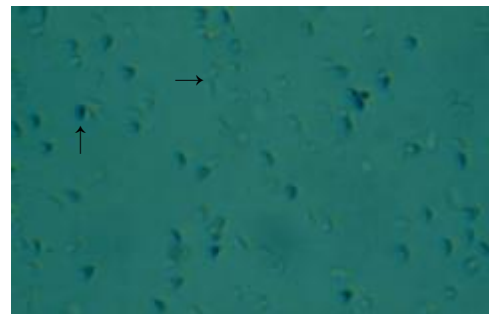
1.5.2 微孔板染色试验稳定性的检测 连续检测已调整好浓度的阳性血清(1:256) 20 次, 观察滴度的变化以检查该试验的稳定性。

1.5.3 微孔板染色试验检测范围的确定 用微孔板染色试验检测不同稀释度的弓形虫阳性血清(分别为 1:8、1:64、1:512 和 1:1 080), 以确定其检测范围(检测步骤同 1.5.1)。

## 2 结 果

2.1 弓形虫悬液浓度及辅助因子浓度的确定 镜下观察发现当弓形虫悬液浓度在 10<sup>9</sup> 个/ml, 辅助因子中枸橼酸钠浓度为 1%时弓形虫染色效果最好, 50%的弓形虫着色呈蓝色, 数量也最合适(图 1)。

2.2 微孔板染色试验稳定性检测 1:256 的阳性血清经 20 次



注:“↑”着色,呈蓝色,“→”未着色。

图 1 微孔板弓形虫染色试验(50%弓形虫着色)

检测,滴度波动在 1 个稀释度之间,说明该方法具有良好的稳定性。

2.3 微孔板染色试验检测范围的确定 稀释的阳性血清(1:8、1:64、1:512 和 1:1 080)标本进行检测,稀释至 1:1 080 仍为阳性,说明其检测范围可以达到 1:1 080 稀释度。

## 3 讨 论

新鲜弓形虫滋养体与正常血清及补体混合后,用碱性美蓝染色时着色很深。但新鲜弓形虫和免疫血清及补体混合后,着色很浅或不着色。可能由于弓形虫受到特异性抗体和补体的协同作用,虫体细胞变性,使虫体对碱性美蓝不易着色,血清稀释度在 1:4 以上为阳性,1:512 及以上被认为是急性感染<sup>[3]</sup>。

1948 年 Sabin 等<sup>[1]</sup>建立的弓形虫染色的标准方法是使用动物腹腔培养弓形虫虫体,收获腹水作为弓形虫抗原,此方法沿用至 20 世纪 90 年代末。该方法局限性较多,需要动物进行弓形虫的传代,收获的腹水可能因含有动物源性的成份而影响结果。参照 Ashburn 等<sup>[4]</sup>及 Harry 等<sup>[5]</sup>文献,作者等建立了改良的微孔板染色试验,用细胞培养法收获虫体作为抗原。但由于细胞培养液中含有镁离子,会激活补体的旁路途径,产生非抗体介导的杀伤作用,因此需加入合适浓度的枸橼酸钠以去除镁离子的干扰;辅助因子含 1%枸橼酸钠时染色效果最好,改良的微孔板弓形虫染色试验具有良好的稳定性,该方法节约人力、物力,可用于大规模试验检测。

## 参 考 文 献

- [1] Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*)[J]. Science, 1948, 108: 660-663.
- [2] Schreiber RD, Feldman HA. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway [J]. J Infect Dis, 1980, 141: 366-369.
- [3] Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, et al. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35 940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36: 2900-2906.
- [4] Ashburn D, Evans R, Chatterton JM, et al. *Toxoplasma* dye test using cell culture derived tachyzoites[J]. J Clin Pathol, 2000, 53: 630-633.
- [5] Harry A, Feldman HA, George A, et al. A micromodification of the *Toxoplasma* dye test[J]. J Parasitol, 1966, 52: 415.

(收稿日期:2007-06-25 编辑:盛慧锋)