

*Die Polymerase-Ketten-Reaktion zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in bioptischen und autoptischen Materialien*

Astrid Müller, A. Haßl, H. Aspöck

Einleitung Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein in vitro Verfahren zur selektiven Vermehrung (Amplifikation) von Nukleinsäurestücken bekannter Sequenz. Das Verfahren – es wurde erstmals im Jahre 1985 von MULLIS beschrieben (9) – bietet die Möglichkeit, einen pathogenen Mikroorganismus durch Amplifikation eines für den Erreger spezifischen DNS-Stückes in verschiedenen Materialien von Patienten direkt nachzuweisen. Die Diagnostik der Toxoplasma-Infektion des Menschen basiert zwar im wesentlichen auf dem Nachweis spezifischer Antikörper verschiedener Klassen und Spezifitäten, doch kommt dem direkten Nachweis zunehmend diagnostische Bedeutung zu. Dies gilt vor allem einerseits für die pränatale Diagnostik, wenn der Erreger im Fruchtwasser nachgewiesen werden soll, andererseits für die Diagnostik akuter Toxoplasma-Infektionen von Immungeschwächten, insbesondere von AIDS-Patienten, für die diese Parasitose häufig lebensgefährlich ist. Serologische Methoden zum Nachweis spezifischer Antikörper versagen in diesen Fällen in der Diagnostik häufig (7).

Bis in die jüngste Vergangenheit basierte der direkte Erregernachweis bei der Aufdeckung von Toxoplasma-Infektionen vorwiegend auf der Isolierung und Anzucht der Parasiten einerseits und der Darstellung der ganzen Parasitenzellen andererseits. Neben der Färbung findet vor allem der Direkte Immunfluoreszenztest im Routinebetrieb auf Grund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit verbreitete Anwendung. Die Nachteile dieses Tests – Erfordernis genügend hoher Parasitendichte einerseits und Belastung des Laborpersonals bei Anfall vieler Proben andererseits – waren für uns Anlaß, den Aussagewert der PCR zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in bioptischen und autoptischen Materialien vergleichend zu untersuchen.

Material und Methoden Von Oktober 1992 bis Februar 1993 wurden insgesamt 481 Proben eines Kollektivs von 204 HIV-positiven Patienten verarbeitet. Bei einem Großteil der Proben (76%) handelte es sich um Sedimente von induzierten Sputa nach Schleimlösung mittels 0,4% 1,4-Dithiothreit, bei 15% um Bronchiallavage-Materialien, bei 2,5% um Pleurapunktate, bei 2% um Sedimente von Liquores cerebrospinalis und bei 1,2% um Proben von Lymphknoten. Weiters wurden verarbeitet: Je eine Probe autoptisches und bioptisches Hirnmaterial, zwei Aszitespunktate, zwei Proben bioptisches Hautmaterial, zwei Lymphdrainage-Proben, ein Wundabstrich, ein Leberzysten-, ein Abszeß-, ein Knochenmarks- und ein Lumbalpunktat, eine Trachealsekret-Probe und eine Probe bioptisches Hodenmaterial. Ein Teil der Patienten (36%) befand sich zum Zeitpunkt der Materialentnahme im AIDS-Stadium IV, der andere Teil im Stadium III nach CDC (4), bei einem Patienten wurde die Materialentnahme post mortem durchgeführt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 34 Jahre. Bei 81% der Patienten handelte es sich um Männer, die beiden größten Risikogruppen waren I (= homosexuell; 30%) und II (= i. v. drogenabhängig; 40%).

Jede Probe wurde in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion auf das Vorhandensein von Toxoplasma-DNS überprüft. Der andere Teil wurde in einem Direkten Immunfluoreszenztest (Toxoplasma-Antigen IF-Test, Cellabs PTV LTD., Brookvale, Australien) auf das Vorkommen von Parasitenzellen untersucht.

Die Aufbereitung der DNS der Proben erfolgte nach der Methode nach ERLICH et al. (5). Es handelt sich dabei um eine sehr effiziente und praktikable DNS-Aufbereitungsmethode (10).

Durchführung der
Polymerase-Ketten-Reaktion
zum Nachweis von
Toxoplasma gondii

Mit Ausnahme der 2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphate (dNTP's) und des Magnesiumchlorids (MgCl₂) stammten alle für die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion benötigten Reagenzien von der Firma Biomedica Ges. m. b. H., Wien.

Zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde eine 194 bp lange Sequenz des B1-Gens für die Amplifikation ausgewählt (12). Die Anwendung dieser Sequenz wurde bereits öfters in der Literatur beschrieben (2, 3, 8, 11, 13).

Folgende Primer wurden verwendet:

Primer 1 (21 Basen, entspricht den Nukleotiden 694 - 714 des B1-Gens):

5'-GGA-ACT-GCA-TCC-GTT-CAT-GAG-3'.

Primer 2 (20 Basen, komplementär zu den Nukleotiden 887 - 868 des B1-Gens):

5'-TCT-TTA-AAG-CGT-TCG-TGG-TC-3'.

Jeder PCR-Ansatz (100 µl) enthielt 50 pM von jedem dNTP (Promega Ges. m. b. H., Wien), 10 µl 10 × Reaktions-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 1 Unit Taq-Polymerase und je 100 pM von Primer 1 und Primer 2. Dem PCR-Ansatz wurden zusätzlich zu dem im Reaktions-Puffer enthaltenen MgCl₂ 10 µl (0,18 mM) einer MgCl₂-Lösung (Promega) hinzugefügt. Nach Zugabe von 5 µl der DNS-Lösung (siehe oben) wurde die Probe mit Aqua bidestillata auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit 50 µl Paraffin-Öl überschichtet.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde im Thermalreaktor "Hybaid Thermal Reactor" (Biomedica) durchgeführt. Die Anzahl der Reaktionszyklen betrug 30. Jeder Reaktionszyklus bestand aus einem DNS-Denaturierungsschritt (94° C, 1 min.), einem Primer-Anhybridisierungsschritt (56° C, 1,5 min.) und einem Schritt zur Elongation der DNS durch die Taq-Polymerase (72° C, 1,5 min.).

Als Positiv-Kontrolle diente Toxoplasma-DNS, die aus 10⁷ Toxoplasmen (Stamm: RH-Wien) aufbereitet wurde. Die Toxoplasmen wurden intraperitoneal in der Maus gezüchtet (OF 1-Swiss, ca. 20 g, weiblich, Versuchstierzuchtanstalt Humberg, NÖ).

Als Negativ-Kontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit Aqua bidestillata anstelle der DNS-Lösung zubereitet.

Auftrennung des
Amplifikationsproduktes in
der Agarose-Gel-
Elektrophorese

Je 30 µl des Amplifikationsproduktes wurden elektrophoretisch auf einem 1 cm dicken, 3%igem Agarose-Gel (Agarose NA, Pharmacia Ges. m. b. H., Wien) aufgetrennt (Spannung: 195 V; Laufzeit: 2 - 3 Stunden). Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 × konzentrierter TBE-Puffer (5 × Stocklösung: 89 mM Trisbase; 89 mM Natriumborat; 2,5 mM EDTA; pH 8,3; Reagenzien: LKB-Produkte AB, Bromma, Sweden) verwendet. Das Gel wurde vor der Elektrophorese mit 60 µl Ethidiumbromid (Stocklösung: 10 mg/ml Aqua destillata; LKB-Produkte AB) versetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Beurteilung der DNS-Banden im UV-Licht (302 nm).

Die Auswertung der DNS-Banden erfolgte mit Hilfe einer shareware zur Molekulargewichtsbestimmung ("Program for molecular-weight determination of DNA-Fragments after gelelectrophoretic separation", erstellt von GRABNER, M. und HOFBAUER, R., Institut für Molekularbiologie der Universität Wien).

Tabelle 1:

Vergleich der Ergebnisse des Direkten Immunfluoreszenztests (DIFT) und der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

		PCR		
		positiv	negativ	Summe
DIFT	positiv	11	7	18
	negativ	49	414	463
	Summe	60	421	481

Die Durchführung des Direkten Immunfluoreszenztests erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Ergebnisse des Nachweises von *Toxoplasma gondii* mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden mit jenen des Standardverfahrens (Direkter Immunfluoreszenztest) verglichen und die Kennzahlen zur Charakterisierung des Verfahrens berechnet.

Ergebnisse

In 60 der insgesamt 481 Proben (12,5%) konnte *Toxoplasma gondii* mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion nachgewiesen werden, in 18 Proben (3,7%) wurde der Erreger im Direkten Immunfluoreszenztest gefunden. Einzelheiten sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen. In 414 Proben wurde der Erreger weder mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion noch mittels des Direkten Immunfluoreszenztests nachgewiesen.

Für den Vergleich der beiden Diagnoseverfahren ergeben sich folgende Kennzahlen: Die Korrelation der Polymerase-Ketten-Reaktion mit dem Direkten Immunfluoreszenztest beträgt 88,3%; die Sensitivität des Amplifikationsverfahrens 61% und die Spezifität 89,4%.

Die Abbildung 1 zeigt positive und negative PCR-Proben nach der elektrophoretischen Auftrennung, Anfärbung mit Ethidiumbromid und Durchstrahlung mit UV-Licht.

Diskussion

Die Diagnostik einer Toxoplasma-Infektion des Menschen erfolgt beim Immungesunden fast ausschließlich indirekt durch den Nachweis spezifischer Antikörper im Serum. Dem direkten Erregernachweis kommt jedoch steigende Bedeutung zu. Wie eingangs erwähnt, gilt dies besonders für die pränatale Diagnostik und für die Diagnostik einer Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten. In der pränatalen Diagnostik erlaubt der direkte Erregernachweis die Abklärung des Verdachts einer Infektion des Ungeborenen, beim AIDS-Patienten bestätigt der direkte Nachweis des Parasiten häufig – insbesondere bei ZNS-Toxoplasmosen, aber nur mit Vorbehalt bei Toxoplasma-Infektionen der Lunge – die akute Infektion, und bildet damit die Grundlage für eine sofortige, oft lebensrettende Therapie. Rund 12% der AIDS-Patienten mit latenter Toxoplasma-Infektion entwickeln im Laufe ihres Leidens durch Exazerbation der Infektion eine akute Toxoplasmose (1). Diese stellt bei AIDS-Patienten einen schweren opportunistischen Infekt dar, der sich durch eine ungehemmte Vermehrung des Parasiten in fast allen inneren Organen, bevorzugt jedoch im Zentralnervensystem (ZNS) auszeichnet. So entwickelten zum Beispiel 1990 an der I. Universitäts-Hautklinik in Wien 6% der AIDS-Patienten eine ZNS-Toxoplasmose. Neben der Toxoplasmose des ZNS treten auch pulmonale Toxoplasma-Infektionen auf; an der genannten Klinik wurde in 4,5% aller Pneumonie-Fällen bei HIV-Positiven *Toxoplasma gondii* nachgewiesen (14).

Für den direkten Erregernachweis stand bisher eine Anzahl bereits etablierter Verfahren wie zum Beispiel die GIEMSA-Färbung oder der Direkte Immunfluoreszenztest (DIFT), die Isolierung und Anzucht des Erregers in Versuchstieren oder in Gewebekulturen und der Nachweis von zirkulierenden Antigenen in Körperflüssigkeiten des Menschen (6) zur Verfügung. Da der Großteil dieser direkten Nachweismethoden den Nachteil hat, daß die Auswertung der Tests sehr zeitintensiv ist, erlangt die Polymerase-Ketten-Reaktion als rasch durchführbares Verfahren große Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion im Vergleich zum Direkten Immunfluoreszenztest untersucht. Betrachtet man den Direkten Immunfluoreszenztest als Standardverfahren, so errechnet man aus den Ergebnissen der 481

Tabelle 2:

Verarbeitetes Material und Vergleich der positiven Ergebnisse in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und im Direkten Immunfluoreszenztest (DIFT).

Material	Anzahl	positiv		
		PCR	DIFT	PCR + DIFT
Induzierte Sputa	366	38	11	5
BAL-Material	72	15	3	3
Pleura-Pkt.	12	—	—	—
Liquor-Sed.	10	1	—	—
Lymphknoten-Pr.	6	3	1	1
Hirnmaterial	2	2	1	1
Aszites-Pkt.	2	—	—	—
Leberzysten-Pkt.	1	—	—	—
Abszeß-Pkt.	1	—	—	—
Lumbal-Pkt.	1	—	—	—
Knochenmarks-Pkt.	1	—	—	—
Wundabstrich	1	—	—	—
Lymphdrainage-Mat.	1	—	—	—
biopt. Haut-Mat.	2	—	—	—
biopt. Hoden-Mat.	1	1	1	1
Trachealsekret	1	—	1	—
Gesamtanzahl	481	60	18	11

BAL = Bronchoalveolar-lavage

Pkt. = Punktat

Liquor-Sed. = Sediment von

Liquor

cerebrospinalis

P. = Probe

Mat. = Material

ausgetesteten Proben die relativ gute Korrelation der beiden Testverfahren von 88,3%. Die Sensitivität der Polymerase-Ketten-Reaktion von 61% in unserer Studie ist natürlich als niedrig einzustufen. Sie ergibt sich daraus, daß der Direkte Immunfluoreszenztest als Standardverfahren zugrunde gelegt wurde; wir wissen aber, daß dieser Test eine geringe Spezifität zeigt, wodurch eben die Sensitivität des Vergleichsverfahrens gesenkt wird. Momentan steht uns jedoch kein besseres Standardverfahren zur Verfügung.

Die Auswertung der Präparate im Direkten Immunfluoreszenztest ist, wie bereits erwähnt, sehr zeitintensiv, besonders wenn eine große Anzahl von Präparaten mit geringer Parasitendichte zur Beurteilung vorliegt. Die Polymerase-Ketten-Reaktion bietet – auf Grund der Tatsache, daß es sich um ein DNS-Amplifikationsverfahren handelt – den Vorteil, den Erreger auch in Proben, in denen nur einzelne Parasitenzellen enthalten sind, nachweisen zu können. Zudem ist es mittels des Amplifikationsverfahrens möglich, bis zu dreißig Proben auf einmal und in relativ kurzer Zeit (ca. 7 Stunden) aufzuarbeiten. Wichtig ist dabei die Tatsache, daß der Großteil der Zeit vom medizinisch technischen Personal für andere Tätigkeiten im Labor genützt werden kann, da die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion in einem Thermalreaktor abläuft und keiner Beaufsichtigung bedarf.

Die Abbildung 1 zeigt die einfache Beurteilung der Resultate nach Auftrennung der Proben in der Agarose-Gel-Elektrophorese.

Wie wir zeigen konnten, ist die Polymerase-Ketten-Reaktion zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Proben von Patienten sehr gut geeignet. Die Frage, ob bei Vorliegen von positiven PCR-Ergebnissen die Diagnose „Toxoplasmose“ gerechtfertigt ist, kann nur in Zusammenarbeit mit der Klinik und unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik der betroffenen Patienten gelöst werden. So konnte zum Beispiel im Fall der bioptischen und der autoptischen Hirnprobe der klinische bzw. der pathologische Befund „ZNS-Toxoplasmose“ durch ein positives PCR-Ergebnis bestätigt werden. Die Diagnose ist nach unserer Meinung nur durch den therapeutischen Erfolg zu sichern.

Auch der Nachweis von *Toxoplasma*-DNS in Lungensekretan ist kein Beweis für eine akute pulmonale *Toxoplasma*-Infektion. Man muß die Möglichkeit einer symptomlosen Ausscheidung des Erregers bei immunsupprimierten Patienten mit einer latenten *Toxoplasma*-Infektion in Betracht ziehen. Auch in diesem Fall ist es unumgänglich, die Diagnose „pulmonale Toxoplasmose“ anhand des therapeutischen Erfolgs zu sichern.

Zusammenfassung

Der Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in autoptischen und bioptischen Materialien wird beschrieben. Insgesamt wurden 481 Proben (hauptsächlich induzierte Sputa und Bronchiallavage-Materialien, jedoch auch Hirn- und Lymphknoten-Proben und andere) von 204 HIV-1-positiven Personen verarbeitet. Die Proben wurden sowohl in der PCR (Zielsequenz: 194 bp des B1-Gens) als auch im Direkten Immunfluoreszenztest, der als Standardverfahren festgelegt wurde, ausgetestet. Die geringe Sensitivität der PCR ergibt sich aus der Tatsache, daß das Standardverfahren relativ unspezifisch ist; ein besseres steht allerdings nicht zur Verfügung. Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion ist es möglich, eine große Anzahl von Proben in kurzer Zeit und auch bei geringer Parasiten-

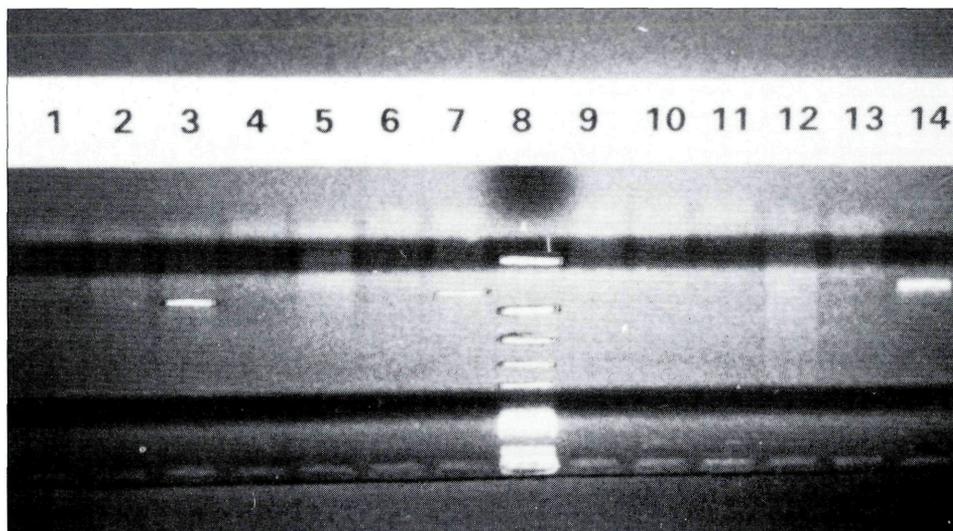


Abbildung 1:

Beispiel für den Nachweis von Toxoplasma-DNS nach Auftrennung der PCR-Proben in der Agarose-Gel-Elektrophorese. Anfärbung durch Ethidiumbromid und Durchstrahlung mit UV-Licht. Die DNS-Banden der positiven Proben liegen bei 194 Basenpaaren (bp).

Patientenproben:

- Nr. 1 - 12 exklusive 3 und 7
= negative induzierte Sputa
- Nr. 3 = positives induziertes Sputum
- Nr. 7 = positives Bronchiallavage-Material

Kontrollen:

- Nr. 8 = DNS-Marker
- Nr. 13 = Negativ-Kontrolle
- Nr. 14 = Positiv-Kontrolle

dichte effizient aufzuarbeiten. Der Nachweis von Toxoplasma-DNS in Proben von Patienten ist nicht gleichbedeutend mit der Diagnose „Toxoplasmose“. Diese kann nur in Zusammenarbeit mit der Klinik gestellt werden.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, bioptische und autoptische Materialien, Polymerase-Ketten-Reaktion, Direkter Immunfluoreszenztest.

Summary

The Polymerase chain reaction for the detection of Toxoplasma gondii in bioptic and autoptic materials

The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Toxoplasma gondii* in bioptic and autoptic materials is described. Altogether 481 samples (mainly induced sputa, materials from bronchoalveolar lavages, but also samples of brain and lymph node and others) of 204 HIV-1 positive persons were tested in a polymerase chain reaction (target sequence: 194 bp of the B1-gene) as well as in a direct immunofluorescent test (standard method). The low sensitivity of the PCR is traced back to the fact that the standard's specificity is not high; a better method is, however, not available. Using the polymerase-chain-reaction it is possible to work off a great number of samples within a short time even if the parasite's quantity is small. The detection of Toxoplasma-DNA in samples of patients is not identical with the diagnosis of toxoplasmosis. This diagnosis is only possible in cooperation with the clinicians.

Key words

Toxoplasma gondii, bioptic and autoptic materials, polymerase chain reaction, direct immunofluorescent test.

Literatur

1. ASPÖCK, H., HASSL, A. (1990): Parasitic infections in HIV-patients in Austria: First results of a long-term study. Zbl. Bakt. 272, 540-546.
2. BREZIN, A. P., EGWUAGU, C. E., BURNIER, M., SILVEIRA, C., MAHADI, R., GAZZINELLI, R. T., BELFORT, R., NUSSENBLATT, R. B. (1990): Identification of *Toxoplasma gondii* in paraffin-embedded sections by the Polymerase Chain Reaction. Am. J. Ophthalmol. 110, 599-604.
3. BURG, J. L., GROVER, C. M., POULETTY, P., BOOTHROYD, J. C. (1989): Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 27, 1787-1792.

4. CDC (1986):
Classification system for Human T-lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus infections.
Morb. Mort. Weekly Rep. 35, 334-339.
5. ERLICH, H. (1989):
PCR Technolgy. Principles and applications for DNA amplification.
Stockton Press, New York.
6. HASSL, A., ASPÖCK, H., FLAMM, H. (1988):
Circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in patients with AIDS: Significance of detection and structural properties.
Zbl. Bakt. Hyg. A 270, 302-309.
7. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1989):
Die Bedeutung der quantitativen IgG-Bestimmung in der Serodiagnostik von *Toxoplasma*-Infektionen bei HIV-Infizierten.
Mitt. Österr. Tropenmed. Parasitol. 11, 311-314.
8. LEBECH, M., LEBECH, A. M., NELSING, S., VUUST, J., MATHIESEN, L., PETERSEN, E. (1992):
Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by Polymerase Chain Reaction in cerebrospinal fluid from AIDS patients with cerebral toxoplasmosis.
J. Infec. Dis. 165, 982-983.
9. MULLIS, K. B., FALOONA, F., SCHARF, S. J., SAIKI, R. K., HORN, G. T., ERLICH, H. A. (1986):
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 51, 263-273.
10. MÜLLER, A., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1992):
Vergleichende Versuche zur DNS-Gewinnung aus den Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*.
Mitt. Österr. Tropenmed. Parasitol. 14, 181-185.
11. ROTH, A., ROTH, B., HÖFFKEN, G., STEUBER, S., KHALIFA, K. I., JANITSCHKE, K. (1992):
Applications of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Pulmonary Toxoplasmosis in Immunocompromised Patients.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11, 1177-1180.
12. VAN DE VEN, E., MELCHERS, W., GALAMA, J., CAMPS, W., MEUWISSEN, J. (1991):
Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1-gene amplification.
J. Clin. Microbiol. 29, 2120-2124.
13. WEISS, L. M., CHEN, Y. Y., BERRY, G. J., STRICKLER, J. G., DORFMAN, R. F., WARNKE, R. A. (1992):
Infrequent detection of *Toxoplasma gondii* genome in toxoplasmic lymphadenitis – a Polymerase Chain Reaction study.
Hum. Pathol. 23, 154-158.
14. ZIELINSKI, C. (1990):
Internistischer Aspekt des erworbenen Immundefizienzsyndroms.
Wr. Klin. Wochenschrift 2, 36-45.

Korrespondenzadresse: Mag. Astrid Müller
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria