

## *Möglichkeiten des Einsatzes der PCR zur Aufdeckung von frischen Infektionen mit Toxoplasma gondii*

A. Haßl<sup>1</sup>, W. Tuma<sup>2</sup>, G. Bünger<sup>2</sup>, Elke Weber<sup>3</sup>, A. Niebecker<sup>3</sup>,  
M. Giesing<sup>3</sup>, G. Maass<sup>3</sup>, H. Aspöck<sup>1</sup>

**Einleitung** Frischinfektionen mit *Toxoplasma gondii* während der Schwangerschaft können zum Tod des Embryos oder zu schweren Organschäden des Fetus führen, wenn nicht rechtzeitig eine Chemotherapie eingeleitet wird (14). Eine frühe, schnelle und sichere Erkennung der akuten Phase einer Toxoplasma-Erstinfektion ist daher entscheidend für den Erfolg einer Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft. Zu diesem Zweck wurde in den letzten Jahren versucht, Verfahren zu entwickeln und auszutesten, die eine Akutinfektion bei einer Schwangeren bereits durch die Testung der ersten Serumprobe erfassen, also früher, als das durch das standardisierte Screeningprogramm möglich ist (1, 9). Zu diesen Verfahren gehören Nachweise von spezifischen IgA-Antikörpern (z. B. 3), von zirkulierendem Antigen (6) und von Aviditätsunterschieden (10). Aus verschiedenen Gründen konnten sich diese Techniken in der Praxis jedoch nicht durchsetzen. Gestützt auf tierexperimentelle Befunde (7, 13) und erste Ergebnisse bei humanen Akutinfektionen (8) wurde nun versucht, Frischinfektionen bei Schwangeren aufzudecken, indem Parasiten-DNS im Blut mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nachgewiesen wird.

**Methoden** Aus dem Probenkollektiv von den Routineuntersuchungen wurden 162 EDTA-Blutproben und zugehörige Serumproben von 160 Schwangeren ausgewählt. Die Auswahl der Proben erfolgte nach der in mehreren Serotests abgesicherten Zugehörigkeit der Frau zu einem Infektionsstadium, die Einteilung der Proben in Gruppen wurde nach ihrem Titer von spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern (Enzygnost Toxoplasmosis IgG bzw. IgM; Behring, Marburg, D) durchgeführt. Gruppe 1 umfaßte 50 Proben (Blut und Serum) von 50 Schwangeren ohne nachweisbare spezifische Antikörper (keine Infektion), Gruppe 2 umfaßte 23 Proben von 21 Frauen mit niedrig positiven IgG-Titern und negativem IgM-Test (latente Infektion) und Gruppe 3 umfaßte 89 Proben von 89 Schwangeren mit Titern von IgG- und IgM-Antikörpern (mögliche Frischinfektionen).

Aus den mittels Gradientenzentrifugation gewonnenen Lymphozyten wurde die DNS freigelegt, und diese diente als Template bei der Durchführung einer „semi-nested“ Genamplifikation (PCR) auf das hochspezifische und repetitive B1-Gen von *Toxoplasma gondii* (2). Als Außenprimer dienten 25er Oligonukleotide in der Startposition 671 (sense) und 886 (antisense),

als Innenprimer ein 20er Oligonukleotid auf Position 855 (antisense) des Gens. Die exakten technischen Bedingungen dieser Polymerase-Ketten-Reaktion sowie die Vorkehrungen zur Verhinderung von Kontaminationen wurden von TUMA et al. (1994) beschrieben. Unter experimentellen Bedingungen kann aus einer einzigen Toxoplasma-Zelle bereits das 204 Basenpaare lange Amplifikat hergestellt werden (12).

Nach der Feststellung einer erfolgreichen Amplifikation in einer Agarose-Gel-Elektrophorese und einer ersten Spezifitätsüberprüfung durch einen Restriktionsenzymsschnitt (AluI, Position: 781) wurden die Amplifikate aus den Blutproben der Schwangeren sowie aus dem als Positivkontrolle dienenden Toxoplasma-Laboratoriumstamm RH zur endgültigen Diagnosestellung und zur Feststellung von eventuell vorhandenen Isolat-spezifischen Unterschieden einer vollständigen Sequenzanalyse unterzogen (MacroGene Workstation, Pharmacia Biotech, Freiburg, D; Cyclersequenzierung mit P<sup>32</sup>-markierten Oligos).

**Ergebnisse** In insgesamt 37 Proben von 37 Schwangeren konnte Toxoplasma-DNS nachgewiesen werden. Die erfolgreichen Amplifikationen verteilten sich auf die verschiedenen Gruppen wie folgt:

Gruppe	n =	positive
keine Infektion	50	0
latente Infektion	23	0
mögliche Frischinfektion	89	37

Die Sequenzierung der 204 bp Amplifikate zeigte eine vollständige Übereinstimmung der Nukleotidsequenz in allen Fällen, ausgenommen einem auch bei wiederholtem Ansatz konstanten Austausch einer Base (Position: 754; G → A) zwischen der Originalsequenz (= RH-Stamm; [2]) und allen bisher getesteten PCR-Produkten aus Patienten.

**Diskussion** Obwohl eine definitive Diagnose einer Toxoplasma-Frischinfektion während der Schwangerschaft derzeit nach wie vor den Nachweis einer Serokonversion mittels geeigneter Tests (z. B. IIFT oder SFT) erfordert, wird in der Praxis häufig versucht, bereits mittels einer einzigen Blutprobe eine Entscheidung über den Infektionsstatus zu erreichen (1). Aus grundsätzlichen Erwägungen wäre bei diesem Bemühen einer direkten Detektion der sich vermehrenden Toxoplasma-Tachyzoiten (= akute Phase der Frischinfektion) gegenüber indirekten Nachweisen von Markern für dieses Infektionsstadium der Vorzug zu geben, allerdings haben sich aus Gründen der Praktikabilität weder Nachweise von zirkulierendem Antigen (6) noch in vivo Verimpfungen von Blutproben durchgesetzt. Als Screeningverfahren ist auch der Nachweis von Toxoplasmen in der Amnionflüssigkeit mittels PCR ungeeignet (5). Die Methode der Genamplifikation könnte vielleicht dazu genützt werden, eine „Parasitämie“ nachzuweisen. Diese wird sowohl im experimentellen Tiermodell (7, 13) als auch bei AIDS-Patienten (4) als ein deutlicher und verlässlicher Hinweis auf eine Akutinfektion gesehen, während bei Schwangeren aufgrund der Problematik der Diagnose einer Frischinfektion alleine mittels IgM-Nachweises die erste, eine geringe Probenzahl umfassende Studie nicht so überzeugend ausfiel (8).

In dieser Studie wurde überprüft, ob der DNS-Nachweis in Blutproben von Schwangeren in entsprechend ausgerüsteten Laboratorien routinemäßig durchführbar ist und ob die Ergebnisse mit den serologisch erhobenen Befunden korreliert werden können. Dazu wurden die Schwangeren aus Gründen der Übersichtlichkeit und Reproduzierbarkeit nur nach ihren Serum-Antikörpertitern von IgG- und von IgM-Antikörpern in Gruppen eingeteilt, die Frauen ohne Toxoplasma-Infektion (IgG und IgM negativ), mit latenter Infektion (IgG positiv, IgM negativ) und mit einer möglichen Frischinfektion (IgG und IgM positiv) umfaßten. Zusätzlich wurden allerdings auch nach der individuellen Notwendigkeit noch verschiedene Spezialtests wie auch Bestätigungsuntersuchungen durchgeführt, die zwar ein ordnungsgemäßes serologisches Screening und eine rasche Diagnosestellung ermöglichten, jedoch ein sehr unübersichtliches Bild der Befundkonstellation ergaben und daher hier nicht aufgeführt werden.

Der Fall einer erfolgreichen Gen-Amplifikation aus dem Blut wird in der Literatur als Parasitämie bezeichnet (4, 7, 13). Im vorliegenden Fall kann nicht entschieden werden, ob es sich dabei um den Nachweis einer echten Parasitämie mit intakten, lebenden Erregern in den Leukozyten handelt, oder von Trophozoenrümern, oder gar von freien DNS-Bruchstücken. Die Beantwortung dieser Frage ist von entscheidender Bedeutung für die Abschätzung der Phase der Frischinfektion. Zum Nachweis intakter Trophozoen sind zeitaufwendige Techniken der Verimpfung in vivo oder in vitro notwendig, diese können aber aufgrund der Bedeutung einer raschen Therapieeinleitung im Falle einer Frischinfektion nicht zu diagnostischen Zwecken verwendet werden. In dieser Studie haben wir aus organisatorischen Gründen auf diese Kontrollverfahren verzichtet.

In der Gruppe der seronegativen Frauen konnte in keinem Fall Toxoplasma-DNS im Blut gefunden werden. Aufgrund der viel zu geringen Anzahl an untersuchten Proben (50 untersuchte gegenüber 2600 statistisch notwendigen) kann aus diesem Ergebnis nicht beurteilt werden, ob die Gen-Amplifikation in der Lage ist, das ca. 10tägige diagnostische Fenster zwischen Infektion und Auftauchen der Frühantikörper zu schließen.

Ebenso konnte in den Seren von Schwangeren mit latenter Infektion kein Fall einer Parasitämie gefunden werden. Hingegen wurden mehrere Fälle von positiven PCR-Ergebnissen in der Gruppe der Frauen mit möglicher Frischinfektion beobachtet. In 15 Fällen konnte eine sichere Diagnose einer Akutinfektion alleine mittels serologischer Verfahren gewonnen werden (hohe IgG- und IgM-Titer und schlüssige Zusatztests). In diesen Fällen konnte ausnahmslos eine „Parasitämie“ durch die Genamplifikation nachgewiesen werden. In der Restgruppe, jenen Frauen mit niedrigen bis mittleren IgG- und IgM-Titern wurde in ca. einem Drittel der Fälle (22/74) eine „Parasitämie“ gefunden. Da diese Befundkonstellation als Ausdruck einer therapiepflichtigen Frischinfektion interpretiert wurde, konnten keine beweisenden serologischen Folgeuntersuchungen durchgeführt werden. In den PCR-negativen Fällen wurde hingegen mindestens eine Folgeuntersuchung entsprechend dem Screening-Schema (1) durchgeführt, dabei konnte kein einziger Fall einer (in der Genamplifikation falsch negativen) Frischinfektion gefunden werden.

Soweit aufgrund der geringen Probenzahl eine Aussage über die Signifikanz der Genamplifikation aus dem Blut zulässig ist, scheint diese Technik einen hohen positiven Vorhersagewert für die akute Infektionsphase zu besitzen. Entscheidend für ihre Eignung als neues, besseres Testverfahren zum Nachweis von Frischinfektionen wird jedoch ihr negativer Vorhersagewert sowie ihre Sensitivität sein, zu beiden Werten kann derzeit noch keine Aussage gemacht werden. Weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven von nicht ausgewählten Seren und zudem – soweit wie möglich – mit Kontrollen in vivo oder in vitro sind notwendig, um den endgültigen Stellenwert der Methode bei der raschen Aufdeckung von Frischinfektionen abschätzen zu können.

Ein interessanter Nebenbefund ist der konstant auftretende Nukleotidaustausch an Position 754 des B1-Gens. Obwohl das B1-Gen bisher in allen untersuchten Toxoplasma-Isolaten aufzufinden war und eine bemerkenswerte Konstanz aufweist, unterstreicht dieser Befund einmal mehr die Sonderstellung, die die „virulenten“ und wahrscheinlich klonal entstandenen Laborstämme gegenüber von Wildstämmen haben (11).

**Zusammenfassung** Insgesamt 162 Serumproben von 160 ausgewählten Schwangeren wurden in einem IgG- und einem IgM-ELISA auf spezifische Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* und zugehörige EDTA-Blutproben in einer semi-nested PCR auf das B1-Gen auf das Auftreten von Toxoplasma-DNS in der Leukozytenfraktion getestet. In allen Fällen einer mutmaßlichen Akutinfektion mit signifikanten Serotitern konnte auch eine „Parasitämie“ in der PCR nachgewiesen werden, hinge-

gen niemals bei serologisch gesicherten Latentinfektionen und bei Proben von nicht-infizierten Schwangeren. Die Genamplifikation könnte sich auch beim Nachweis von Frischinfektionen von Schwangeren als rasches Verfahren mit einem hohen positiven Vorhersagewert erweisen.

Als Nebenbefund wurde beim Sequenzieren der PCR-Produkte ein konstant auftretender Nukleotidaustausch (G → A) auf Position 754 des B1-Gens zwischen dem Referenzstamm (RH) und den humanen Amplifikaten beobachtet.

**Schlüsselwörter** *Toxoplasma gondii*, PCR, Frischinfektion, Schwangere, DNS-Sequenz, B1-Gen.

**Summary** *Application of PCR for detection of primary infections with Toxoplasma gondii*

Altogether 162 sera of 160 selected pregnant women were tested for Toxoplasma specific IgG- and IgM-antibodies by ELISA technique. Additionally, matching EDTA-bloodsamples were tested for Toxoplasma-DNA in a semi-nested PCR detecting the B1-gene. In all cases of presumably acute infections with significant serological antibody titers a "parasitemia" could be detected, but not in a single case of serologically proven latent infection or in samples of uninfected women. The gene amplification may prove as an useful technique with a high positive predictive value for rapid detection of primary infections in pregnant women.

Additionally, when sequencing the PCR-products, a constant exchange of one nucleotide (G → A) in position 754 of the B1-gene of all investigated human amplicates compared with the reference strain (RH) could be detected.

**Key words** *Toxoplasma gondii*, PCR, primary infection, pregnant women, DNA sequence, B1-gene.

### Literatur

1. ASPÖCK, H., POLLAK, A. (1992):  
Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria.  
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 84, 32-37.
2. 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 (8), 1787-1792.
3. DECOSTER, A. et al. (1992):  
Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection.  
Clin. Exp. Immunol 87 (2), 310-315.
4. FILICE, G. A., HITT, J. A., MITCHELL, C. D., BLACKSTAD, M., SORENSEN, S. W. (1993):  
Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction.  
J. Clin. Microbiol. 31 (9), 2327-2331.
5. GROVER, C. M., THULLIEZ, P., REMINGTON, J. S., BOOTHROYD, J. C. (1990):  
Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid.  
J. Clin. Microbiol. 28 (10), 2297-2301.
6. HASSL, A., PICHER, O., ASPÖCK, H. (1987):  
Untersuchungen über die Bedeutung des Nachweises von zirkulierendem Antigen für die Aufdeckung einer Erstinfektion mit *Toxoplasma gondii* während der Schwangerschaft.  
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 9, 91-94.

7. HITT, J. A., FILICE, G. A. (1992):  
Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation.  
*J. Clin. Microbiol.* 30 (12), 3181-3184.
8. HO YEN, D. O., JOSS, A. W., BALFOUR, A. H., SMYTH, E. T., BAIRD, D., CHATTERTON, J. M. (1992):  
Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples.  
*J. Clin. Pathol.* 45 (10), 910-913.
9. JANITSCHKE, K. (1994):  
Toxoplasma.  
In: Hahn, H., Falke, D., Klein, P. (Hrsg.):  
*Medizinische Mikrobiologie*, 906-911.  
2. Aufl., Springer Verlag, Berlin.
10. LAPPALAINEN, M. et al. (1993):  
Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG.  
*J. Infect. Dis.* 167 (3), 691-697.
11. SIBLEY, L. D., BOOTHROYD, J. C. (1992):  
Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage.  
*Nature* 359 (6390), 82-85.
12. TUMA, W. et al. (1994):  
Nukleinsäurenachweis von *Toxoplasma gondii* in der Schwangerenvorsorge.  
*Lab. Med.* 18, 1-5.
13. WASTLING, J. M., NICOLL, S., BUXTON, D. (1993):  
Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally  
infected sheep.  
*J. Med. Microbiol.* 38 (5), 360-365.
14. WOLF, A., COWEN, D., PAIGE, B. H. (1939):  
Toxoplasmic encephalomyelitis.  
*Trans. Am. Neurol. Assoc.* 65, 76-79.

**Korrespondenzadresse:** Univ. Doz. Dr. Andreas Haßl  
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien  
Kinderspitalgasse 15  
A-1095 Wien · Austria

