

Neue Verfahren in der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasma-Infektionen

A. Haßl, H. Aspöck

Einleitung Die Laboratoriumsdiagnostik, speziell die Serodiagnostik der Toxoplasmose hat ihre Wurzeln im wesentlichen im Jahre 1948, als SABIN und FELDMAN einen heute noch aktuellen und anerkannten Farbttest zur Bestimmung spezifischer Antikörper entwickelten (11). Allerdings unterliegt sie derzeit einem zusehends rascher werdenden Wandel und einer zunehmenden Diversifikation. Dies betrifft insbesondere die in der Praxis verwendeten Methoden und Tests, zudem werden laufend neue Testverfahren entwickelt. Diese Entwicklung führte zur Existenz einer selbst für Fachleute unübersichtlichen Palette verschiedener Laboratoriumsverfahren und Modifikationen dieser Verfahren.

Der Grund für diese Vielfältigkeit liegt in der Problematik der Serodiagnostik der akuten Toxoplasma-Infektion: Es treten erhebliche grundsätzliche Schwierigkeiten beim Versuch auf, mit Hilfe eines indirekten Verfahrens, wie es alle Antikörperrnachweise sind, die in der überwiegenden Anzahl der Fälle symptomlosen und zeitlich kurzen, akuten Phasen der Infektion mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erkennen. Neben dieser Problematik haben sich allerdings in den letzten Jahren zunehmend mehr Fragestellungen herauskristallisiert, in denen die traditionellen Nachweistechiken, wie der Sabin-Feldman-Test, der indirekte Immunfluoreszenztest, die klassische ELISA-Technik, sowie der direkte Erregernachweis (Tab. 1), weitgehend oder vollständig versagen und bei deren Lösung vollkommen neue Ansätze gesucht werden müssen. Durch das vermehrte Auftreten von Immunsuppressionen, speziell des Acquired Immundeficiency Syndroms (AIDS), hat sich die Gefährlichkeit der Toxoplasmose erheblich gesteigert und damit die Bedeutung der Infektion für die menschliche Gesundheit dramatisch verändert. Dadurch besteht die Notwendigkeit, die Ziele der Diagnostik neu zu definieren und die verwendeten Methoden entsprechend anzupassen (5). Nach einem derartigen Umbruch muß der diagnostische Aussagewert der einzelnen Verfahren neu bewertet und kritisch gewichtet und eine jeweils aktuelle Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Laboratoriumsdiagnostik insgesamt vorgenommen werden. Zusammenfassende Darstellungen der Situation der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasma-Infektion sind daher nur kurzfristig aktuell und spiegeln jeweils den aktuellen Stand des Wissens wider.

Problematik Drei Problemkreise sind derzeit auszumachen, in denen sich grundlegende Änderungen in der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasmose abzeichnen:

Erstens sind da die lebensbedrohenden Exazerbationen latenter Toxoplasma-Infektionen bei Immunsupprimierten, insbesondere bei AIDS-Patienten. Derzeit können nur komplexe

Tabelle 1:

Klassische Testverfahren in der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasma-Infektionen.

Serologie:

Sabin-Feldman-Farbttest („Goldstandard“)

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von spezifischen Antikörpern

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern

ELISA zum Nachweis von spezifischen Antikörpern

Mehrschicht-ELISA zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern

Immunosorbent-Agglutinationstest zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern

Direkter Erregernachweis:

Maus-Isolierungsverfahren

Direkter Immunfluoreszenztest

Histologische Färbeverfahren

Veraltete Verfahren:

Komplementbindungsreaktion

Indirekter Hämagglutinationstest

Latex-Agglutinationsverfahren

Intradermaltest

Kombinationen von neuentwickelten, direkten Nachweisverfahren (z. B. zirkulierende Antigene, DNS-Nachweise) und speziellen Serotests zum Erkennen diskreter Verschiebungen der Menge und Affinität spezifischer Antikörper erfolgreich für eine Bestätigung klinischer Verdachtsdiagnosen eingesetzt werden (8). Der gegenüber serologischen Verfahren zuverlässigere direkte Erregernachweis aus Gewebe, auch der Parasiten-DNS-Nachweis, kann derzeit kaum zwischen akuten und latenten, vielleicht sogar chronischen Infektionen unterscheiden. Die baldige Einführung von Stadiendifferenzierenden Nachweistechiken, etwa durch monoklonale Antikörper, könnte dieses Problem lösen. Hingegen sind die Ergebnisse von Studien über die Zuverlässigkeit des Parasiten-DNS-Nachweises aus Blutproben sehr widersprüchlich (4, 9) und damit von einem praktischen Einsatz in der Routinediagnostik weit entfernt.

Als zweiter Problemkreis ist die Frischinfektion mit dem Parasiten während der Schwangerschaft auszumachen. Eine frühe, schnelle und sichere Erkennung der akuten Phase einer Toxoplasma-Erstinfection ist entscheidend für den Erfolg einer Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft. Daher wurde in den letzten Jahren versucht, Systeme zu entwickeln, die eine Akutinfektion bei einer Schwangeren bereits durch die Testung von nur einer Serumprobe erfassen. Dies wäre ein erheblich rascheres Verfahren als jenes des standardisierten Screeningprogramms (1). Kandidaten für eine derartige Verbesserung waren jeweils Nachweise von spezifischen IgA-Antikörpern (z. B. 3), von zirkulierendem Antigen (7), von Aviditätsunterschieden von IgG-Antikörpern (10), von Antikörpern gegen Akutphasen-Antigene (13) und der Nachweis einer Parasitämie mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (12), (siehe Tab. 2). Dabei haben sich die Nachweise von zirkulierendem Antigen und von IgA-Antikörpern rasch als zu unsensitiv herausgestellt. Tests mit Azeton-fixierten Trophozoiten (Akutphasen-Antigen) konnten niemals eine weitere Verbreitung erreichen, während gentechnologische Verfahren aufgrund ihrer Neuheit noch nicht validiert wurden. Der Aviditätstest – genauer: ein ELISA-Verfahren zur Messung der Avidität von IgG-Antikörpern zu einem gegebenen Antigen – könnte tatsächlich eine erhebliche Veränderung in der Schwangerendiagnostik herbeiführen: dieses Testsystem kann sowohl sämtliche IgM-Bestimmungen ersetzen als auch eine Einschätzung des Infektionszeitpunkts ermöglichen. Während die technische Durchführung des Tests sehr einfach ist, ist die weitere Verarbeitung der Meßwerte noch im Fluß und nicht standardisiert. Dadurch ergeben sich von Labor zu Labor unterschiedliche Ergebnisse, die nicht vergleichbar sind und häufig zur Verwirrung der Anwender beitragen. Diese Probleme werden allerdings sicherlich in den nächsten Jahren gelöst werden, ob allerdings die erheblichen Kosten dieses Systems zukünftig bis zur finanziellen Konkurrenzfähigkeit vermindert werden können, erscheint derzeit zweifelhaft.

Die gentechnologischen Verfahren zum Nachweis von Toxoplasma-DNS in Amnionflüssigkeit (6) haben zwar sehr rasch eine weite Verbreitung gefunden, zeigen aber erst die Infektion des Ungeborenen und damit den möglicherweise bereits gesetzten Schaden an, sie können daher die serologische Schwangerenüberwachung nicht ersetzen, bestenfalls können sie die Auswirkungen von Fehlern im Überwachungssystem minimieren.

Diese Einschränkung gilt ebenso für die dritte Aufgabenstellung, die Diagnostik der pränatalen Toxoplasma-Infektion von Neugeborenen. Verfahren mit überzeugenden Charakteri-

Tabelle 2:

Neue Verfahren in der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasma-Infektionen.

Serologie:

Direkter Agglutinationstest mit Formalin- und Azeton-fixierten Trophozoiten
(IgG-)ELISA mit gentechnologisch hergestellten Antigenen
ELISA zur Messung der Avidität von IgG-Antikörpern
Immunoblotting zum Nachweis von IgG, IgM und IgA-Antikörpern

Direkter Erregernachweis:

Direkter Immunfluoreszenztest mit stadienspezifischen monoklonalen Antikörpern

Antigennachweis:

ELISA-Verfahren zum Nachweis von zirkulierenden Antigenen

Gentechnologische Verfahren:

PCR zum Infektionsnachweis
(Amnionflüssigkeit, Liquor, Kammerwasser, Bronchoalveolarlavage, Gewebe)
PCR zum Akutinfektionsnachweis (Vollblut)
in-situ Hybridisierung

stika – speziell hochsensitive IgM-Nachweise und differenzierende IgG-Tests – stehen nach wie vor nur in sehr beschränktem Umfang zur Verfügung. Immunoblotting-Verfahren waren zwar vielversprechend (2), konnten sich jedoch aufgrund der großen Unsicherheiten bei der Ergebnisinterpretation nie durchsetzen.

Ausblick

Das Ziel zukünftiger Verbesserungen in der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasma-Infektion und der Toxoplasmose kann daher nicht die Diskussion um den Einsatz neuartiger, teilweise modischer Techniken

sein, sondern sollte sich gezielt auf die Entwicklung von Verfahren konzentrieren, die helfen, Lücken im Wissen über diese Parasitose zu schließen oder zumindest zu verkleinern.

Zusammenfassung

Innerhalb der letzten Jahrzehnte ist eine große Vielfalt an Methoden für die Laboratoriumsdiagnostik von Toxoplasma-Infektionen und Toxoplasmosen entwickelt worden. Allerdings hat sich die Situation betreffend die Standardisierung von Testsystemen und des „Goldstandards“ in der Diagnostik durch diese Vervielfältigung der Methoden kaum verbessert. Neu entwickelte Testsysteme müssen anhand ihrer Möglichkeiten, zu einer raschen Entscheidungsfindung in problematischen Fällen zu führen, beurteilt werden. Wachsende Felder mit unbefriedigendem Zustand sind die Diagnostik von Reaktivierungen bei Immunsupprimierten, die Ein-Punkt-Bestimmung der asymptomatischen Frischinfektion und die Schnelldiagnostik von pränatalen Infektionen bei Neugeborenen. Obwohl die Technik des Direkten Erregernachweises mittels Genamplifikation, meist PCR, die diagnostische Situation in Fällen von transplazentalen Infektionen und Reaktivierungen entscheidend verbessert hat, bleibt die Verwendung einfacher, serologischer Verfahren unbefriedigend. Ein signifikanter Durchbruch in den Gebieten schlechter diagnostischer Effizienz ist derzeit leider nicht in Sicht.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, Laboratoriumsdiagnostik, Immunsuppression, Frischinfektion, Neugeborene.

Summary *New tools in the laboratory diagnosis of Toxoplasma infections*

Within the last decades a great variety of methods for a laboratory diagnosis of Toxoplasma infections and of toxoplasmosis has been developed. Nevertheless, the situation concerning “golden” standards or standardised tests has not improved nor consolidated due to a multiplication of the number of test systems in use. Thus, newly developed test methods have to be judged by their suitability to improve diagnosis in problematical cases of toxoplasmosis diagnosis. Such increasing areas of unsatisfactory conditions are the diagnosis of reactivations in immunosuppressed patients, the onepoint diagnosis of asymptomatic primary infections, and the rapid diagnosis of prenatal infections in newborns. Although techniques of parasite DNA-detection, mostly PCR, have improved the diagnostic procedure especially in cases of transplacental infections and of reactivations; the use of simple, serological methods remains unsatisfactorily. Unfortunately, a significant breakthrough in the fields of poor diagnostic efficiency is not forthcoming at present.

Key words

Toxoplasma gondii, laboratory diagnosis, immunosuppression, primary infections, newborne.

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. CHUMPITAZI, B. F. F., BOUSSAID, A., PELLOUX, H., RACINET, C., BOST, M., GOULLIERFLEURET, A. (1995):
Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods.
J. Clin. Microbiol. 33 (6), 1479-1485.
3. DECOSTER, A., DARCY, F., CARON, A., VINATIER, D., HOUZE DE L'AULNOIT, D., VITTU, G., NIEL, G., HEYLER, F., LECOLIER, B., DELCROIX, M., MONNIER, J. C., DUHAMEL, M., CAPRON, A. (1992):
Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection.
Clin. Exp. Immunol. 87 (2), 310-315.
4. DUPON, M., CAZENAVE, J., PELLEGRIN, J. L., RAGNAUD, J. M., CHEYROU, A., FISCHER, I., LENG, B., LACUT, J. Y. (1995):
Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients.
J. Clin. Microbiol. 33 (9), 2421-2426.
5. FUCCILLO, D. A., MADDEN, D. L., TZAN, N., SEVER, J. L. (1987):
Difficulties associated with serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections.
Diagn. Clin. Immunol. 5 (1), 8-13.
6. 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.
7. 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.
8. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1990):
Antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by sera of AIDS-patients before, during and after clinically important infections.
Zbl. Bakt. 272, 514-525.
9. LAMORIL, J., MOLINA, J. M., DEGOUVELLO, A., GARIN, Y. J., DEYBACH, J. C., MODAI, J., DEROUIN, F. (1996):
Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS.
J. Clin. Pathol. 49 (1), 89-92.
10. LAPPALAINEN, M., KOSKELA, P., KOSKINIEMI, M., AMMALA, P., HIILESMAA, V., TERAMO, K., RAIVIO, K. O., REMINGTON, J., HEDMAN, K. (1993):
Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG.
J. Infect. Dis. 167 (3), 691-697.
11. SABIN, A. B., FELDMAN, H. A. (1949):
Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*).
Science 108, 660.
12. TUMA, W., WEBER, E., HASSL, A., BÜNGER, G., NIEBECKER, A., MAASS, G., GIESING, M. (1994):
Nukleinsäurenachweis von *Toxoplasma gondii* in der Schwangerenvorsorge.
Lab. Med. 18, 1-5.
13. SUZUKI, Y., THULLIEZ, P., REMINGTON, J. S. (1990):
Use of acute-stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of acute toxoplasmosis.
J. Clin. Microbiol. 28 (8), 1734-1738.

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