

## *Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes der PCR in der Diagnostik von Parasitosen*

A. Haßl und H. Aspöck

**Einleitung** In den letzten Jahren wurden zur Diagnose zahlreicher Parasitosen gentechnologische Verfahren entwickelt und beschrieben, meist auf der Basis einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (10). Bei dieser inzwischen weitgehend etablierten Methode wird meist ein Stück genomische DNS im Reagenzglas vielmillionenfach vervielfältigt, bei den von uns als Routinetest verwendeten Protokollen sind es bei 36 Zyklen theoretisch maximal 68,7 Milliarden Kopien (3). Das Produkt wird dann in einem Detektionsverfahren, meist einer Elektrophorese, nachgewiesen. Ziel dieser Technik ist es, die Anwesenheit eines einzigen Genomstücks eines Erregers im Untersuchungsmaterial nachzuweisen und so mit höchster Sensitivität Krankheitserreger aufzuspüren.

Allerdings lassen diese theoretischen Überlegungen breiten Raum für zahlreiche Fallgruben, welche die Einsatzmöglichkeiten der PCR in der Diagnostik von Parasitosen deutlich einschränken. Insbesondere wird häufig übersehen, daß die PCR in den meisten Fällen von Routinediagnostik ein rein qualitativer direkter Erregernachweis ist. Besonders deutlich sind die Beschränkungen in Fällen von Besiedlungen durch solche Mikroorganismen, bei denen erst eine erhöhte Anzahl zu einer klinischen Signifikanz führt und in Fällen, in denen hochwertige indirekte, deutlich billigere Nachweisverfahren – Antikörpertests – erfolgreich eingesetzt werden können. Zudem sind für jeden Erreger oft Dutzende unterschiedlicher Verfahren beschrieben, diese Unübersichtlichkeit wird noch durch eine mangelnde Koordination der Laboratorien untereinander und durch eine fehlende Standardisierung erhöht (5).

Diese Studie an eigenen Erfahrungen mit der PCR und der Vergleich mit Literaturangaben wurde durchgeführt, um den diagnostischen Wert dieses modernen gentechnologischen Verfahrens in der Parasitologie zu bewerten und einen aktuellen Stand des Wissens wiederzugeben.

**Methoden** Im Laufe von drei Monaten wurden 540 Proben von 362 Patienten (290 Proben von HIV-positiven Personen) im Rahmen der Routinediagnostik in direkten Nachweisverfahren (konventionellen Färbungen) und PCRs auf das Vorhandensein von Parasiten getestet. Die Materialien und die gesuchten Parasiten können Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1:

Anzahl der untersuchten Materialien, Häufigkeit der Hemmung der PCR-Reaktionen und Verteilung der Erreger-Nachweise.

Material	n	Davon gehemmt in %	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>	Microsporidia	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Bronchioalveolar-Lavagen	236	0,42	x	x		
Stuhl	204	0,97			x	x
Sputa	66	1,50	x	x		
Liquor cerebrospinalis	15	0,00	x			
Gewebsproben	8	0,00	x			
Harn	5	20,00			x	
Vollblut	3	0,00	x			
Fruchtwasser	3	0,00	x			

Durchgeführte Tests     Direkter Immunfluoreszenztest gegen *Toxoplasma gondii* (Toxo-Cel, Cellabs Diagnostics PTY LTD, Brookvale, Australia)

Direkter Immunfluoreszenztest gegen *Pneumocystis carinii* (*Pneumocystis carinii*-Antigen-IFT, Cellabs Diagnostics PTY LTD, Brookvale, Australia)

Calcofluor-Färbung (Fungi-Fluor Kit, Polysciences, Inc., Warrington, USA) jeweils nach den Angaben der Hersteller sowie Trichrom-Färbung nach WEBER (12) zum Nachweis von Mikrosporidien

Single step-PCR zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* nach Literaturangaben (1, 4)

Single step-PCR zum Nachweis von *Pneumocystis carinii* nach Literaturangaben (2, 11)

Single step-PCR zum Nachweis von Mikrosporidien, im gleichen Ansatz zum Nachweis von *Encephalitozoon cuniculi* und *Enterocytozoon bieneusi*, verändert nach (6, 8)

Single step-PCR zum Nachweis von *Cryptosporidium parvum* nach Literaturangaben (7).

Die Isolierung der DNS aus dem Material erfolgte mittels Adoptionsreinigung (QIAamp Tissue Kit bzw. QIAamp Blood Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) und die Detektion der Amplifikate mittels Flachbett-Gelelektrophorese und Silber-Färbung (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Wien, Österreich). Der Nachweis von PCR-Hemmern im Untersuchungsmaterial erfolgte durch eine kompetitive PCR, d. h. eine PCR mit spezifischer DNS (Positivkontrolle) und Untersuchungsmaterial.

**Ergebnisse**     Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 2 dargestellt.

Eine Berechnung der Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Tests ist auf Grund zu geringer Zahlen positiver Proben und sich deutlich unterscheidender Testcharakteristika nicht möglich. Eine Überprüfung der Übereinstimmung positiver Proben zwischen den konventionellen Färbungen und der PCR wurde durchgeführt.

**Diskussion**     Gentechnologischen diagnostischen Verfahren eilt der Ruf voraus, besonders sensitive Testverfahren zu sein. Theoretisch sollte der Nachweis des Genoms eines einzigen Parasiten, d. h. einer einzigen Parasitenzelle, im Untersuchungsmaterial möglich sein. In der Praxis stellt sich allerdings heraus, daß diese Techniken eine Reihe von Unwägbarkeiten beinhalten, welche bei der Anwendung dieser Verfahren in der Diagnostik unbedingt berücksichtigt werden müssen und zu einer kritischen Diskussion Anlaß geben:

Tabelle 2:

Anzahl der durchgeführten Untersuchungen und ihre Ergebnisse.

Test	Toxo-DIFT	Toxo-PCR	Calco	Pc-PCR	Pc-PCR	Chromo	M-PCR	Ec-PCR	Eb-PCR	Ziehl	Cp-PCR
Gesamt	278	283	338	301	293	208	198	204	205	104	103
auswertbare Tests	278	282	337	287	277	207	194	204	202	103	102
Positive Tests	0	1	1	14	16	1	4	0	3	1	1
Übereinstimmung			1	14	14	1	1			1	1

Eine der häufigsten Fallgruben ist die Verwechslung des theoretischen, errechneten unteren Detektionslimits („Sensitivität“) mit dem praktisch erreichbaren. Während im Idealfall ein einziges Genomstück eines Erregers zum sicheren Nachweis reichen sollte, stellt sich heraus, daß die DNS-Mengenverluste bei der Isolierung der DNS aus dem Untersuchungsmaterial und das stöchiometrische Gleichgewicht in der Amplifikationsreaktion zu so hohen Aktivitätseinbußen führen, daß üblicherweise 30 bis 70 Genomstückkopien das unterste praktische Detektionslimit sind. Viele Erreger, besonders Parasiten, liegen aber in der praktisch aufarbeitbaren Probenmenge (ca. 10 mg) in deutlich geringerer Zahl vor. Dadurch ist der praktisch erreichbare positive Vorhersagewert der gentechnologischen, direkten Erregernachweise stark eingeschränkt.

Ein weiteres praktisches Problem bei der Laboratoriumsdiagnostik mittels PCR ist das Auftreten sogenannter "PCR-Hemmer" im Untersuchungsmaterial. Dies sind biochemische Stoffe meist unbekannter Zusammensetzung, die bereits in geringsten Spuren die Amplifikation teilweise oder vollständig behindern. Das unvorhersehbare und nicht verhinderbare Auftreten dieser Hemmer führt dazu, daß einige Proben nicht befundet werden können und die gesamte Diagnoseprozedur nachträglich umgestellt und neu durchgeführt werden muß. Allerdings ist das Auftreten solcher Hemmer, bedingt durch den Einsatz verbesserter DNS-Isolierungsprotokolle, relativ selten geworden. In unserem - schwierigen - Untersuchungsgut (Stuhl) lag der Prozentsatz gehemmter Proben unter 1 (Tab. 1). Damit kann das Auftreten von PCR-Hemmern zumindest in unserem Untersuchungsgut nicht als erhebliche Behinderung des diagnostischen Procedere gewertet werden.

In der Literatur wird beklagt, daß zahllose unterschiedliche Arbeitsvorschriften (Protokolle) für die Durchführung diagnostischer PCRs veröffentlicht wurden und die internationale Vergleichbarkeit der Verfahren nicht gewährleistet ist (9). Diese Feststellungen treffen zwar zweifelsohne derzeit zu, die beklagten Umstände sind allerdings als „Kinderkrankheiten“ jedes und daher auch dieses relativ jungen Diagnoseverfahrens zu sehen und können den Wert des Verfahrens bei sinnvollem Einsatz nicht beeinträchtigen. Da es sich im Prinzip um ein qualitatives Verfahren mit hoher Sensitivität handelt, die klinische Relevanz vieler diagnostisch schwieriger Parasitosen aber von der Quantität des Befalls abhängt, erscheinen derzeit Investitionen in Bemühungen um eine weitere Erhöhung der Sensitivität von diagnostischen PCRs nicht sinnvoll. Daß die PCR auch als Routinetechnik eine weitaus höhere Sensitivität als konventionelle Verfahren erreicht, ist am Beispiel der Calcofluorfärbung von *Pneumocystis carinii* nachvollziehbar. Diese Fluoreszenzfärbung der „Zysten“ wurde lange Zeit als eines der Standardverfahren zum Nachweis eines Befalls angesehen, kann aber die offensichtlich viel häufigere Form einer „Trophozoiten“-Ausscheidung nicht erkennen. Die weitgehende Vereinheitlichung der PCR-Protokolle wird zukünftig durch den Rationalisierungsdruck in den Laboratorien, die Notwendigkeit von Akkreditierungen und die zunehmende Marktreife von gebrauchsfertigen Reagenzmischungen und preiswerten Verbrauchsmaterialien zwanglos von selbst erfolgen.

Neben den in dieser Arbeit besprochenen Parasitosen sind weitere sinnvolle Einsatzgebiete diagnostischer PCRs der Nachweis von Leishmanien in der Haut und in Punkttaten, die Speziesunterscheidung von darmbewohnenden Entamoeba-Arten, sowie der Nachweis von Malaria-Erregern und Trypanosomen in Blutproben, sofern diese Verfahren als Screening-Tests verwendet

werden. Auch zum Nachweis von Cyclospora und Lamblien wurden in jüngster Zeit PCRs eingesetzt. Es muß aber in jedem Laboratorium entschieden werden, ob der relativ große Aufwand der Etablierung einer PCR im Einzelfall lohnt oder andere Verfahren effizienter sind.

**Zusammenfassung** Das Ziel der Untersuchung war die Feststellung der Eignung von Polymerase-Ketten-Reaktionen für die Diagnose von sonst schwierig diagnostizierbaren Parasitosen des Menschen. Neben einigen technischen Problemen der Probenaufarbeitung setzen vor allem die mangelnde internationale Vergleichbarkeit der Testergebnisse der weiteren Verbreitung dieses gentechnologischen Verfahrens Grenzen.

Die zunehmende Verwendung von modernen, verbesserten Arbeitsvorschriften für die Aufarbeitung der Untersuchungsmaterialien und von käuflichen, standardisierten Reagenzien für den Reaktionsansatz führt zu einer erhöhten Sensitivität des Verfahrens und einer besseren Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Laboratorien. Der Einsatz der PCR in der Diagnostik von Parasitosen ist immer dann sinnvoll, wenn direkte Erregernachweise wegen zu geringer Parasitendichte oder Antikörpernachweise nicht zu schlüssigen Interpretationen führen.

**Schlüsselwörter** Polymerase-Ketten-Reaktion, Diagnostik, Parasitologie.

**Summary** *Chances and limits of the use of PCRs in the diagnosis of parasitic diseases*

The aim of the investigation was the assessment of the suitability of the polymerase-chain-reaction for the diagnosis of parasitic diseases of man which are difficult to be diagnosed with standard methods. Apart from some technical problems of sample processing, above all the lack of international comparability of the test results is setting boundaries to the further spread of this method. The increasing use of modern, improved protocols for the sample processing and of commercially available, standardized reagents for the reaction leads to an increased sensitivity of the procedure and a better correspondence of the results between the different laboratories. The application of the PCR in the diagnostics of parasitic diseases is meaningful whenever direct detection techniques cannot be applied because of too low parasite density or when antibody detection methods do not promise conclusive results.

**Key words** polymerase-chain-reaction, diagnosis, parasitology.

**Danksagung** Die Autoren danken Frau Ingrid Blöschl und Frau Ilse Veits für die ausgezeichnete technische Arbeit und ihr Engagement.

#### Literatur

1. 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.
2. CARTWRIGHT, C. P., NELSON, N. A., GILL, V. J. (1994): Development and Evaluation of a Rapid and Simple Procedure for Detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32 (7), 1634-1638.
3. DIMITROV, D. S., APOSTOLOVA, M. (1996): The limit of PCR amplification. *Journal of Theoretical Biology* 178 (4), 425-426.

4. 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.
5. GUY, E. C., PELLOUX, H., LAPPALAINEN, M., ASPOCK, H., HASSL, A., MELBY, K. K., HOLBERGPETTERSEN, M., PETERSEN, E., SIMON, J., AMBROISETHOMAS, P. (1996):  
Interlaboratory comparison of polymerase chain reaction for the detection of Toxoplasma gondii DNA added to samples of amniotic fluid.  
*European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 15 (10), 436-439.
6. KATZWINKEL-WLADARSCH, S., DEPLAZES, P., WEBER, R., LÖSCHER, T., RINDER, H. (1997):  
Comparison of Polymerase Chain Reaction with Light Microscopy for Detection of Microsporidia in Clinical Specimens  
*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 7-10.
7. LENG, X.; MOSIER, D. A.; OBERST R. D. (1996):  
Simplified Method for Recovery and PCR Detection of Crptosporidium DNA from Bovine Feces.  
*Applied and Environmental Microbiologie*, 62, 643-647.
8. RINDER, H., JANITSCHKE, K., ASPOCK, H., DASILVA, A. J., DEPLAZES, P., FEDORKO, D. P., FRANZEN, C., FUTH, U., HUNGER, F., LEHMACHER, A., MEYER, C. G., MOLINA, J. M., SANDFORT, J., WEBER, R., LOSCHER, T. (1998):  
Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of microsporidia in stool specimens.  
*Journal of Clinical Microbiology* 36 (6), 1814-1818.
9. RINDER, R. (1998):  
PCR - Sinn, Unsinn, Qualitätssicherung.  
Abstracts 18. Parasitologische Tagung Dresden, V95.
10. SMITS, H. L., HARTSKEERL, R. A. (1995):  
PCR amplification reactions in parasitology.  
*Journal of Microbiological Methods* 23 (1), 41-54.
11. WAKEFIELD, A. E., PIXLEY, F.J., BANERJI, S., SINCLAIR, K. (1990):  
Detection of Pneumocystis carinii with DNA amplification.  
*The Lancet* 336, 451-454.
12. WEBER, R., BRYAN, R.T., OWEN, R.L., WILCOX, C.M., GORELKIN, L., VISVESVARA, G.S.,  
and the Enteric Opportunistic Infections Working Group (1993):  
Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates.  
*New Engl. J. Med.* 326, 161-166.

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

