



# Diagnostische Probleme bei der Differenzierung von Kryptosporidien und Pilzen mittels optischer und gentechnischer Nachweisverfahren

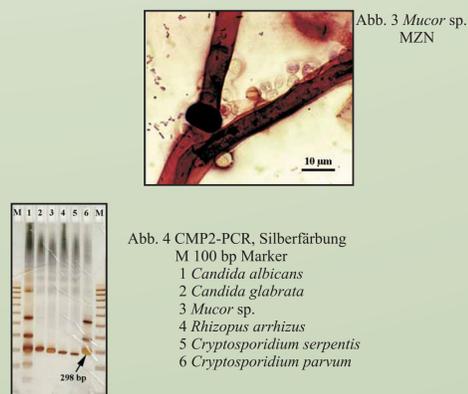
Veits Ilse, Blöschl Ingrid, Hassl Andreas, Willinger Birgit, Aspöck Horst

**Abkürzungen:**  
PCR: polymerase chain reaction  
MZN: modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung  
DIFT: direkter Immunfluoreszenztest  
bp: Basenpaare

## Einleitung:

Kryptosporidien sind obligatorische, einzellige Darmparasiten von Wirbeltieren aus dem Stamm der Apicomplexa. Eine Pathogenität als Durchfallerreger entfalten sie jedoch vorwiegend in immunsupprimierten Wirten. Der Mensch wird von *Cryptosporidium parvum* "human" und "calf" befallen. Der Nachweis der morphologisch nicht unterscheidbaren Erregerformen erfolgt über die im Stuhl ausgeschiedenen, 3 - 5 µm großen Oozysten. Heute haben sich die modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung (Henricksen et al. 1981) und Immunfluoreszenztests gegenüber anderen Färbemethoden (Bundesgesundheitsamt 1986) durchgesetzt. In den letzten Jahren wurden auch mehrere diagnostische Genamplifikationsverfahren (PCR) entwickelt. Das Auffinden von Kryptosporidien in humanen Stuhl- und tierischen Kotproben stellt bei Patienten kaum ein diagnostisches Problem dar. Hingegen erwies sich die Befundung der Sedimente von Trink- und Oberflächenwässern als äußerst schwierig. In diesen Proben können Kontaminationen mit Algen und Pilzen zu falsch positiven Resultaten führen. Diese Studie wurde durchgeführt, um die Treffsicherheit der Standarddiagnoseverfahren und zweier Genamplifikationstechniken zu verifizieren.

## Ergebnisse 2:



In Abbildung 1 ist eine Oozyste von *Cryptosporidium parvum* in einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung dargestellt. Aus Abbildungen 2 und 3 kann man ersehen, dass einige *Candida*-Arten und *Mucor* sp. sehr ähnliche Formen in dieser Färbung ausbilden (siehe Pfeil).

Ein in einer Silberimprägnierung gefärbtes Gel nach einer Elektrophorese der Amplifikate einer gattungsspezifischen PCR ist in Abbildung 4 dargestellt. Das Amplifikat von *C. parvum* hat eine Länge von 298 bp, *C. serpentis* bildet ein Amplifikat bei 289 bp, *Mucor* sp., *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Rhizopus arrhizus* liefern falsch positive Ergebnisse.

Die Ergebnisse der optischen und gentechnologischen Kryptosporidien-Nachweisverfahren bei Testung von Pilzen und Algen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Positiv (+) gibt in den Amplifikationsverfahren eine Bande zwischen 288 und 298 bp an, bei den Färbetechniken das Auftreten mindestens eines Objekts, das in Größe, Farbe und Form mit den gesuchten Kryptosporidien verwechselt werden kann.

Veits Ilse  
Abteilung für Medizinische Parasitologie  
Klinisches Institut für Hygiene  
Kinderspitalgasse 15  
A-1095 WIEN  
Tel: 01 40490 79442  
Fax: 01 403834390  
Email: andreas.hassl@univie.ac.at

## Material und Methoden:

Die in dieser Studie überprüften Keime sind in Tabelle 1 aufgelistet. Alle Keime wurden in folgenden Nachweisverfahren getestet:

- ✍ Ziehl-Neelsen-Färbung modifiziert nach Henricksen et al. (1981).
- ✍ Direkter Immunfluoreszenztest "Merifluor" (Meridian Diagnostics, Inc. Cincinnati, OH, USA); die Färbung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.
- ✍ Weiters wurden zwei Genamplifikationstechniken durchgeführt. Zur Isolierung der DNS wurde die Adsorptionstechnik (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet.
- ✍ Zur immunomagnetischen Separierung wurde ein Zwischenschritt mit Dynabeads (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.
- ✍ Single tube PCR zum Nachweis des Acetyl-CoA Synthetase-Gens von *C. parvum* "human", *C. parvum* "calf" und *C. muris* nach Morgan et al. (1998). Größe der erwarteten Bande: 390 bp.
- ✍ Single tube PCR zum Nachweis des 18S rRNA-Gens von *C. parvum* "human", *C. parvum* "calf", *C. muris* und *C. serpentis* nach Morgan et al. (1997). Größe der erwarteten Bande: 298 bp.

Die Ergebnisse der optischen Nachweisverfahren wurden in Fotografien dokumentiert, die elektrophoretischen Nachweise der Amplifikate wurden zusätzlich mittels eines Scanners ausgemessen. Banden, die nicht an den vorausberechneten Stellen zu finden waren, wurden als unspezifisch angesehen und diese Amplifikationen wurden daher als negativ gewertet.

## Diskussion:

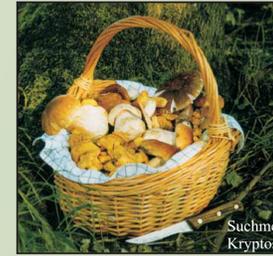
Potentiell humanpathogene Pilze sind eine häufige Beimengung in Stuhlproben von HIV-positiven Personen, und diese sowie auch einige Süßwasser-algen sind Kontaminationen von Oberflächenwässern. Die sichere Erkennung von Kryptosporidien in kontaminierten Proben ist mit vielen Nachweisverfahren sehr schwierig oder gar unmöglich.

Die von uns als Routineverfahren genutzte PCR zum Nachweis aller Kryptosporidium-Arten lieferte falsch positive Resultate mit einer ganzen Reihe von Pilzspezies sowie mit Grünalgen. Allerdings erkennt diese Amplifikationstechnik mehrere Kryptosporidien-Arten und kann, bei Korrektur der in der Ursprungsliteratur vermerkten Angabe der Amplifikatlänge, zur Artbestimmung genutzt werden. Die PCR mit *Cryptosporidium parvum*-spezifischen Primern ergab hingegen nur eine falsch positive Bande mit *Aspergillus terreus*. Mit einem vorgeschalteten immuno-magnetischen Separierungsschritt konnte dieses falsche Resultat korrigiert werden. Dieses Verfahren erhöht zwar die Spezifität der Prozedur, engt aber das erkennbare Erregerspektrum auf eine Art ein.

Die färbetechnischen Nachweisverfahren unterscheiden sich erheblich hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit bei Applikation an unterschiedlichen Materialien: Sowohl die modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung als auch der DIFT sind verlässliche Verfahren bei Stuhl- und Kotproben, hingegen sehr problematisch bei einer Anwendung in Sedimenten von Wässern.

## Resümee:

Diese Vergleichsstudie zeigt, dass für einen sicheren Nachweis von Kryptosporidien in Wasserproben derzeit Amplifikationsverfahren nur in Kombination mit Anreicherungsverfahren wie z.B. einer Magnetseparation verwendet werden können. Das Amplifikationsverfahren des 18S rRNA-Gens dient vorzugsweise als Bestätigungstest auf *Cryptosporidium* sp., im Falle einer Verdachtsdiagnose. Färbeverfahren sind hingegen für den Einsatz zum Nachweis von Kryptosporidien in Kot- und Stuhlproben ausreichend gut geeignet.



## Ergebnisse 1:

Tabelle 1

PILZE	CMP1	CMP2	MZN	DIFT
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	-	+	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	+
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	-	-	+
<i>Mucor</i> sp.	-	+	+	+
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-	+	-	-
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	-
Grünalge	-	+	+	+
Bäckerhefe	-	+	-	-

Tabelle 1  
CMP1 = *Cryptosporidium parvum* PCR;  
CMP2 = allgemeine Kryptosporidien PCR;  
MZN = modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung;  
DIFT = direkter Immunfluoreszenztest;

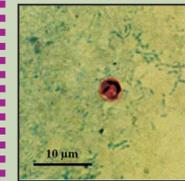


Abb. 1 *Cryptosporidium parvum* MZN

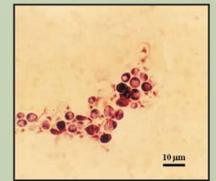


Abb. 2 *Candida albicans* MZN

## Literatur:

- ✍ Aspöck H., Hassl A.: Parasitic Infections in HIV Patients in Austria. Zbl. Bakt., 1990, 272: 540-546.
- ✍ Bundesgesundheitsamt: Empfehlungen zur Laboratoriumsdiagnostik der Amöbiasis, Giardiasis, Kryptosporidiose und weiterer Kokzidiosen. Bundesgesundhbl., 1986, 29:194-198.
- ✍ Hassl A., Vorbeck-Meister I., Sommer R., Rotter M.: Nachweis und Identifikation von Kryptosporidien in Kot-, Stuhl- und Umweltpflanzen - Entwicklung einer Modulteknik. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol., 1999, 21: 45-50.
- ✍ Henricksen S.A., Pohlenz J.F.L.: Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta. Vet. Scand., 1981, 22: 594-596.
- ✍ Morgan U.M., Constantine C.C., Forbes D.A., Thompson R.C.: Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. J. Parasitol., 1997, 83 (5): 825-830.
- ✍ Morgan U.M., Sargent K.D., Deplazes P., Forbes D.A., Spano F., Hertzberg H., Elliot A., Tompson R.C.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. Parasitol., 1998, 117: 31-37.

