

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

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



Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien



Suchmesser für Mikrosporidien

Einleitung:

Mikrosporidien sind sehr kleine, einzellige, potentiell pathogene Parasiten von Wirbeltieren und Arthropoden. Im Rahmen des AIDS spielen vor allem die den Darmtrakt infizierenden Mikrosporidien (*Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis*) eine medizinisch wichtige Rolle. Standardverfahren zum Nachweis von Mikrosporidien sind nicht beschrieben, als Routinenachweisverfahren werden weithin eine Chromotrop-Färbung, eine Calcofluor-Färbung und Genamplifikationstechniken verwendet. Bei der Differentialdiagnose stellen insbesondere in den optischen Nachweisverfahren Verwechslungen mit anderen opportunistischen Darmkeimen, speziell Pilzen, ein großes Problem dar (Armbruster et al. 1992). In dieser Studie wurde die Tauglichkeit unserer Routineverfahren zur Unterscheidung von wichtigen darmbewohnenden Mikrosporidienarten und von humanpathogenen Pilzen überprüft.

Material und Methoden:

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

- Chromotrop-Färbung nach Anleitung des Bundesgesundheitsamts (1996).
- Calcofluor-Färbung (Fungi Fluor Kit, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA); die Färbung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.
- Weiters wurden vier Genamplifikationstechniken durchgeführt. Zur Isolierung der DNS wurde die Adsorptionstechnik (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet.
- Single tube PCR zum Nachweis des *ssr* RNA-Gens von BM, verändert nach Katzwinkel-Wladarsch et al. (1997). Größe der erwarteten Bande: 305bp.
- Single tube PCR zum Nachweis des *ssr* RNA-Gens von CM verändert nach Katzwinkel-Wladarsch et al. (1997). Größe der erwarteten Bande: 275bp.
- Single tube PCR zum Nachweis des *ssr* RNA-Gens von IM, verändert nach Katzwinkel-Wladarsch et al. (1997). Größe der erwarteten Bande: 310bp.
- Single tube PCR zum Nachweis des *SSU* rRNA-Gens der meisten bekannten Mikrosporidienarten nach Kock et al. (1997). Größen der erwarteten Banden: BM: 410bp, CM: 419bp, IM: 421bp, HM: 433bp.

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 vorausgerechneten Stellen zu finden waren, wurden als unspezifisch angesehen und diese Amplifikationen wurden daher als negativ gewertet.

Abkürzungen:

PCR: polymerase chain reaction
 BM: *Enterocytozoon bienersi*
 CM: *Encephalitozoon cuniculi*
 IM: *Encephalitozoon intestinalis*
 HM: *Encephalitozoon hellem*
 AIDS: acquired immunodeficiency syndrome
 bp: Basenpaare

Ergebnisse 1:

Tabelle 1

PILZE	B-P	C-P	I-P	Mg-P	CH	Calco
<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>	-	-	-	-	-	-

Tabelle 1

B-P = *Enterocytozoon bienersi*-PCR;
 C-P = *Encephalitozoon cuniculi*-PCR;
 I-P = *Encephalitozoon intestinalis*-PCR;
 Mg-P = PCR auf die meisten Mikrosporidienarten;
 CH = Chromotrop-Färbung;
 Calco = Calcofluor-Färbung;

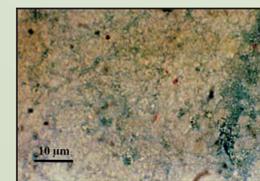


Abb. 1 *Enterocytozoon bienersi* Chromotrop-Färbung

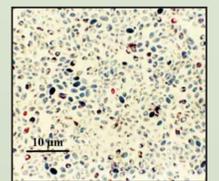


Abb. 2 *Candida glabrata* Chromotrop-Färbung

Ergebnisse 2:

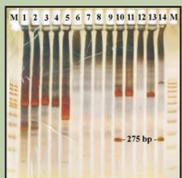


Abb. 3 CM-PCR, Silberfärbung
 M 100 bp Marker
 1 *Candida albicans*
 2 *Candida glabrata*
 3 *Candida tropicalis*
 4 *Candida krusei*
 5 *Candida lusitanae*
 6 *Aspergillus fumigatus*
 7 *Aspergillus flavus*
 8 *Aspergillus niger*
 9 *Aspergillus terreus*
 10 *Mucor* sp.
 11 *Rhizopus arrhizus*
 12 *Alternaria* sp.
 13 *Fusarium solani*
 14 *Encephalitozoon cuniculi*

Abbildung 1 und 2 zeigen gleichartig durchgeführte Chromotrop-Färbungen von *Enterocytozoon bienersi* und *Candida glabrata*.

Ein mit Silber gefärbtes Gel von einer Elektrophorese der Amplifikate von einer *Encephalitozoon cuniculi*-PCR ist in Abbildung 3 dargestellt. Das spezifische Amplifikat hat eine Länge von 275 bp. Die Testung von *Mucor* sp. ergibt ein Amplifikat gleicher Länge und muss daher als positiv gewertet werden.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der verschiedenen Nachweisverfahren mit den untersuchten Proben zeigt Tabelle 1. Positiv (+) gibt bei den Amplifikationsverfahren eine Bande an der erwarteten Stelle an, bei den Färbetechniken das Auftreten mindestens eines Objekts, das in Größe, Farbe und Form mit den gesuchten Mikrosporidien verwechselt werden kann.

Diskussion:

In der Umwelt auftretende, potentiell pathogene Pilze sind eine häufige Kontamination von Proben, die auf ihren Gehalt von humanpathogenen Mikrosporidien untersucht werden. Viele Nachweisverfahren für Mikrosporidien, die eine häufige Komplikation bei HIV-Positiven darstellen, liefern falsch positive Ergebnisse bei Pilzkontaminationen.

Die von uns für die Routinediagnostik von immunsupprimierten Patienten verwendete Amplifikationstechnik auf das *ssr* RNA-Gen von *Enterocytozoon bienersi* erwies sich als spezifisch und wenig fehleranfällig hinsichtlich einer Pilzkontamination. Die beiden anderen artspezifischen PCRs lieferten hingegen falsch positive Resultate mit *Mucor* sp. bzw. *Aspergillus terreus*. Die die Artgrenze überschreitende PCR erwies sich hinsichtlich einer Pilzkontamination als erstaunlich stabil.

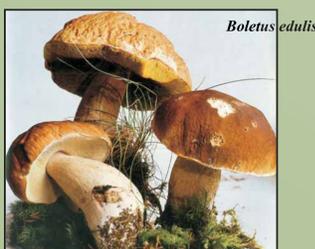
Aus Abbildung 1 und 2 ist ersichtlich, wie ähnlich bestimmte Keime in der Chromotrop-Färbung erscheinen. Die Unterscheidung von Mikrosporidien und kleinen, ovalen Pilzzellen, wie z.B. *Candida glabrata*, ist mit einfachen optischen Mitteln in dieser Färbung kaum möglich.

Resümee:

Diese Vergleichsstudie zeigt, dass derzeit sowohl die gentechnischen Nachweisverfahren als auch die Färbungen für eine sichere Diagnose von opportunistischen Darmkeimen aus der Gruppe der Microsporida unersetzbar sind. An die Amplifikation anschließende Hybridisierungstechniken erwiesen sich als sehr vorteilhaft, da es zu einer erheblichen Steigerung der Spezifität kommt. Die Amplifikationstechniken sind bei entsprechendem Einsatz gut geeignet, um eine Kontamination von Stuhlproben mit Mikrosporidien zu erkennen, und auch um die Parasitenart sicher zu bestimmen. Die Färbeverfahren erfordern jedoch eine Auswertung durch geschultes Personal und sind nur subjektiv beurteilbar.

Literatur:

- Armbruster C., Hassl A., Vetter N.: Differential diagnosis of ascites and hepatitis in AIDS patients - the first case of microsporidiosis in Austria. Wien Klin Wochenschr., 1992, 753-755.
- Bundesgesundheitsamt: Empfehlungen zur Laboratoriumsdiagnostik von Infektionen mit Mikrosporidien. Bundesgesundheitsblatt, 39. Jahrgang, 1996, 9, 363-366.
- Katzwinkel-Wladarsch S., Deplazes P., Weber R., Löscher T., Rinder H.: Comparison of Polymerase Chain Reaction with Light Microscopy for Detection of Microsporidia in Clinical Specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1997, 16: 7-10.
- Kock N.P., Petersen H., Fenner T., Sobottka I., Schmetz C., Deplazes P., Pieniazek N.J., Albrecht H., Schottelius J.: Species-Specific Identification of Microsporidia in Stool and Intestinal Biopsy Specimens by the Polymerase Chain Reaction. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1997, 16: 369-376.
- Weber R., Bryan RT., Owen RL., Wilcox CM., Gorelkin L., Visvesvara GS.: Improved light-microscopical detection of Microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. New Eng. J. Med., 1992, 326(3): 161-166.



Boletus edulis

Blöschl Ingrid
 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