©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 12 (1990) 313 - 320

Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Helmut Hahn)

Schnellfärbemethoden und Immunfluoreszenzfärbungen in der Labordiagnose von *Pneumocystis carinii* — Alternativen zur GROCOTT-Färbung?

G. Daeschlein

Einleitung

Pneumocystis carinii ist als Erreger opportunistischer Pneumonien bei immunsupprimierten Patienten seit längerem bekannt und tritt in jüngster Zeit im Rahmen der AIDS-Erkrankung zunehmend in Erscheinung (8, 14, 16, 17). 50-80% aller AIDS-Patienten erkranken an einer unbehandelt lebensbedrohlichen *Pneumocystis carinii*-Pneumonie (11, 12, 15). Bei bisher unbefriedigender Anzuchtmöglichkeit und wenig aussagekräftigen Antigentests stützt sich die Labordiagnostik auf den färberischen Nachweis der Zysten und der Sporozoiten des Erregers in Bronchiallavagematerial, Biopsien, und in jüngster Zeit auch im Sputum (10). Die Referenzmethode zur Darstellung der Zysten ist die mehr als drei Stunden dauernde Versilberungsfärbung nach GROCOTT (6). In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich bei höher gewählten Färbetemperaturen, z. B. bei Verwendung von Mikrowellengeräten, deutlich geringere Färbezeiten erreichen lassen (4, 12). Als spezifische Nachweismethoden für die Zysten und Trophozoiten des Erregers werden seit neuerem Immunfluoreszenzfärbungen, meist unter Verwendung monoklonaler Antikörper, entwickelt (5, 8, 9).

In der vorliegenden Studie werden vier Methoden zur Darstellung von *Pneumocystis carinii*-Zysten, eine Kurzform der GROCOTT-Färbung, die Kresylechtviolettfärbung und zwei Immunfluoreszenztechniken mit mono- und polyklonalen Primärantikörpern der herkömmlichen Versilberungstechnik nach GROCOTT gegenübergestellt.

Material und Methoden

109 bronchoalveoläre Lavageproben von insgesamt 84 AIDS-Patienten verschiedener Berliner Kliniken mit Verdacht auf atypische Pneumonie wurden jeweils mit fünf verschiedenen Färbetechniken auf *Pneumocystis carinii*-Zysten untersucht. Für jede Färbung wurden 0,1 ml Zentrifugat des Lavagematerials (10 min bei 4000 U/min) auf Objektträger verbracht. Nach Lufttrocknung folgte eine 15minütige Methanolfixierung.

Versilberungsfärbung (GROCOTT)

- 60 min Chromsäurebad (5%)
- 10 min Spülen mit Leitungswasser
- 1 min Natriumdisulfitbad zur Entfernung der Chromsäure
- 5 min Spülen mit Aqua dest.
- 60 min Methenaminsilberbad (50° C im Wasserbad)
- 5 min Tönung mit Goldchlorid
- 2 min Natriumthiosulfatbad zur Entfernung unreduziertern Silbers
- 2 min Gegenfärben mit Lichtgrün

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Die *Pneumocystis carinii*-Zysten erscheinen bei Betrachtung im Lichtmikroskop bei 1200facher Vergrößerung (Ölimmersion) in ihrer typischen Morphologie braunschwarz versilbert vor grün gegengefärbten Lungenepitel- und anderen Gewebszellen.

Verkürzte GROCOTT-Färbung

Der Färbeablauf entspricht dem der Original-GROCOTT-Methode. Bei variierter Temperatur (95° C im Wasserbad) dauerte die Versilberung 15 Minuten, das Chromsäurebad fünf Minuten. Die Spülschritte sowie der Tönungsschritt mit Goldchlorid wurden auf jeweils eine Minute verkürzt durchgeführt.

Kresylechtviolettfärbung (KEV)

- 10 min Essigsäure/Schwefelsäuregemisch
- kurzes Spülen unter fließendem Wasser
- 10 min Färbung in einer sauren (pH 1,5) Kresylechtviolettlösung
- kurzes Spülen unter fließendem Wasser
- 30 sec Gegenfärbung mit Naphtholgelb
- kurzes Spülen unter fließendem Wasser

Die Pneumozysten erscheinen im Lichtmikroskop bei 1200facher Vergrößerung in typischer Morphologie rosa gefärbt.

Immunfluoreszenz (IFT)

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach den üblichen immunhistologischen Färbeprinzipien durchgeführt. Als monoklonale Primärantikörper wurden kommerziell erhältliche Anti-*Pneumocystis carinii*-Antikörper (Bios, München, Bundesrepublik Deutschland) verwendet. Das humane polyklonale Antiserum (lyophilisiert) wurde uns freundlicherweise von Frau Shirley E. Maddison (Centers for Disease Control, Atlanta) zur Verfügung gestellt. Zur Gewinnung der IgG-Fraktion wurde das Serum nach pH-Erniedrigung über eine Protein G-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) geschickt, die gebundene IgG-Fraktion anschließend bei pH 2,4 eluiert, membrandialysiert (Instrumed, Dayton, USA) und bis zu einer Proteinkonzentration von 19 mg/ml im Amicon-Centriprepsystem (Amicon, Witten, Bundesrepublik Deutschland) eingeengt. Die Antikörperaktivität wurde an pneumozystenreichen histologischen Lungenschnitten getestet.

Nach einem 20minütigen Blockierungsschritt wurden die Präparate mit den jeweiligen Primärantikörpern (in Tris-Puffer mit 1% Rinderserumalbumin und 1% Gelatine) in optimaler Verdünnung (in vorherigen Verdünnungsstufentests ermittelt) über zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Einem Waschschritt folgte eine 30minütige Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Amersham, Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland) in 1/500facher Verdünnung. Einem weiteren Waschschritt folgte die Fluoreszenzmarkierung mit FITC-Streptavidin (Amersham) in 1/1000facher Verdünnung über 30 Minuten. Bei Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Pneumozysten in typischer Form und Lagerung hellgrünleuchtend.

Ergebnisse

Bei den 109 untersuchten Fällen wurden zwei Schnellfärbemethoden und zwei Immunfluoreszenzfärbetechniken mit der herkömmlichen Versilberungsfärbung nach GROCOTT verglichen. In 26 der 109 untersuchten Proben wurden färberisch Pneumozysten festgestellt. Die vergleichsweise niedrige Prävalenz erklärt sich zum Teil aus der Einbeziehung auch nicht *Pneumocystis carinii*-Pneumonie-typischer klinischer Verdachtsfälle in diese Untersuchung.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Die Färbeergebnisse der verschiedenen Methoden zeigt Tabelle 1: Von den 26 mit der Original-GROCOTT-Methode diagnostizierten Fällen waren mit der verkürzten Version alle 26, mit der KEV 21, mit den beiden Immunfärbetechniken 22 (monoklonale Antikörper) bzw. 21 (polyklonale Antikörper) Fälle darstellbar.

Die positiven Fälle wurden in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe I: reichlich Pneumozysten, meist in Clusterform (mehr als 20 Zysten pro Cluster)

Gruppe II: wenige Pneumozysten, vereinzelte Cluster (pro Blickfeld bei 400facher Vergrößerung höchstens zehn Zysten)

Gruppe III: vereinzelte Zysten, ohne Cluster (in zehn untersuchten Blickfeldern bei 400facher Vergrößerung bis zu zehn Zysten)

Das typische Vorliegen der Zysten in Clusterform war mit allen Methoden demonstrierbar. Die einzelnen Zysten waren mit den Immunfärbungen und der Kresylechtviolettfärbung im Gegensatz zu den beiden GROCOTT-Färbeversionen nicht sicher darstellbar. Der Zeitaufwand der einzelnen Färbemethoden differierte folgendermaßen:

Die reine Färbezeit lag bei der KEV bei 20 Minunten, bei der verkürzten GROCOTT-Methode bei 26 Minuten. Die beiden Immunfärbungen benötigten jeweils drei Stunden, der Zeitaufwand der Original-GROCOTT-Färbung betrug mindestens drei Stunden.

Technisch mit dem geringsten Aufwand verbunden zeigt sich die Kresylechtviolettfärbung, problematisch ist der Umgang mit konzentrierten Säuren.

TABELLE 1
Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen von 26 mit der Original GROCOTT-Methode positiven Proben.

Färbung	Aufw. (techn.)	Mindestfärbedauer (min)	pos. insges.	Gruppe I	II	III
KEV	+	22	21	16	5	0
GROCOTT orig.	++	200	26	16	8	2
GROCOTT mod.	++	26	26	16	8	2
IFT mono.	+++	190	22	16	6	0
IFT poly.	+++	190	21	16	5	0

KEV: Kresylechtviolettfärbung
GROCOTT orig.: GROCOTT-Färbung, Originalmethode
GROCOTT mod.: Modifizierte GROCOTT-Färbung
IFT mono.: Immunfluoreszenztest mikt monoklonalen Primärantikrörpern
IFT poly.: Immunfluoreszenztest mit polyklonalen Primärantikörpern
Aufwand +: Technik einfach durchzuführen
Aufwand ++: zum Teil komplizierte Arbeitsschritte
Aufwand +++: Arbeiten mit immunologischen Reagenzien
Gruppe I: reichlich Pneumozysten, meist in Clusterform (mehr als 2 Zysten pro Cluster)
Gruppe II: wenige Pneumozysten, vereinzelte Cluster (pro Blickfeld bei 400afcher Vergrößerung höchstens 10 Pneumozysten)
Gruppe III: einzelne Zysten, ohne Clusterbildung (bis zu 10 Zysten in 10 untersuchten Blickfeldern bei 400facher Vergrößerung)

Diskussion

Die Bedeutung einer schnellen und zuverlässigen *Pneumocystis carinii*-Diagnostik liegt in der raschen Einleitung einer spezifischen Therapie. Da auch das Auftreten vereinzelter *Pneumocystis carinii*-Zysten mit schweren Pneumonien einhergehen kann, ist eine

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

hohe Sensitivität der Nachweistechniken erforderlich. Aufgrund der zuverlässigen Darstellbarkeit der Pneumozysten mit ihren charakteristischen Dellen und Pseudoinnenkörperchen hat sich in der Routinediagnostik die Silberfärbung nach GROCOTT weitgehend durchgesetzt (13). Die Nachteile ihrer Unspezifität — z. B. werden Pilze ebenfalls angefärbt (1, 13) — sowie der vergleichsweise langen Färbedauer geben Anlaß zur Entwicklung spezifischer Nachweismethoden unter Verwendung von Immunfluoreszenztechniken mit mono- und polyklonalen Antikörpern. Zusätzlich wurde nach Möglichkeiten gesucht, die lange Färbedauer der GROCOTT-Methode durch Benutzung höherer Färbetemperaturen (Mikrowellengeräte) zu verringern. MAHAN und SALE (12) färbten die Pneumocystispräparate insgesamt zehn Minuten bei „höchster Stufe" im Mikrowellenherd, CHURUKIAN et al (4) bei 58° C im Wasserbad bei konstanter Färbedauer von 37 Minuten. Für die modifizierte GROCOTT-Färbung mit 95° C Färbetemperatur stellten wir fest, daß zur sicheren Anfärbung der Pneumozysten bei konstanter Dauer des Chromsäurebades (fünf Minuten) für die Versilberungsdauer hingegen keine einheitliche Zeit vorgegeben werden konnte, d. h. jedes Material eine individuelle Versilberungszeit in Anspruch nahm. Diese Beobachtung, die am ehesten auf die in sowohl quantitativer als auch qualitativer Hinsicht unterschiedliche zelluläre Beschaffenheit des jeweiligen Lavagematerials zurückzuführen wäre, spielt bei der mit vergleichsweise niedrigen Temperaturen versilbernden GROCOTT-Methode mit Versilberungszeiten von über einer Stunde eine untergeordnete Rolle und ist bei der Kurzfärbung insofern ein Nachteil, als diese unterschiedlichen Versilberungsintervalle vom Untersucher die ständige Kontrolle des Färbeprozesses verlangen. Bleiben die Präparate wenige Sekunden zu lang in der Lösung, bildet sich ein Silberspiegel und das Präparat ist unbrauchbar. Daher erscheint uns der Färbevorgang in Geräten mit konstanter Färbetemperatur (z. B. Mikrowellengeräte) mit Patientenmaterial im Routinebetrieb als nicht zweckmäßig.

Im Gegensatz zur kurzen GROCOTT-Methode stellt die KEV eine Färbung mit konstanter, d. h. weitgehend materialunhabhängiger etwa 20minütiger Färbedauer dar, die durch Fortlassen der Gegenfärbung noch weiter verkürzbar ist. Da die KEV Mängel bei der Darstellung einzelner Zysten aufweist, die Clusterform jedoch zuverlässig erkennt, ist sie als orientierende Schnellfärbung für die Routinediagnostik interessant.

Die beiden Immunfluoreszenzfärbungen ließen keinen Unterschied bei der Verwendung mono- bzw. polyklonaler Antikörpertechniken hinsichtlich des Färbeergebnisses erkennen. Mit beiden Antikörpern sind die Pneumozysten in Clusterform beim Durchmustern der Präparate schnell erkennbar, was bei den einzelnen Zysten mit beiden Methoden nicht sicher gelingt. Ursächlich hierfür ist eine auch bei der monoklonale Antikörper als Primärantikörper verwendenden Variante nicht sichere Abgrenzbarkeit der einzelnen Pneumozysten von mit den üblichen Mitteln nicht unterdrückbar mitfluoreszierenden anderen Zellen, z. B. Lymphozyten und besonders Candidaelementen. Die Erkennung einzelner Pneumozysten gelingt ohne gleichzeitiges Vorhandensein von Clustern dann, wenn ausnahmsweise alle typischen Kriterien der Pneumozystenmorphologie bei der fraglichen Zelle zusammentreffen. Zur Darstellung dieser verschiedenen Kriterien (Form, „Dellen", Doppelkonturierung, Innenkörperchen) erweist sich von den untersuchten Färbetechniken die GROCOTT-Färbung sowohl in Original- als auch in modifizierter Form (bei Berücksichtigung individueller Versilberungszeiten) als zuverlässigste Methode.

Zusammenfassung

Bei 109 AIDS-Patienten mit Verdacht auf atypische Pneumonie wurde bronchoalveoläres Lavagematerial mit fünf verschiedenen Färbemethoden auf *Pneumocystis carinii*-Zysten untersucht: Eine Kurzform der GROCOTT-Färbung, die Kresylechtviolettfär-

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

bung und zwei Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung mono- bzw. polyklonaler Antikörper wurden mit der Versilberungsfärbung nach GROCOTT verglichen.

Bei deutlich kürzeren Färbezeiten und Darstellung auch der vereinzelt liegenden Zysten erscheint die Kurzversion der GROCOTT-Färbung als Alternative zur zeitaufwendigen Originalmethode geeignet. Die Kresylechtviolettmethode ist technisch am einfachsten durchführbar, sie ist jedoch bei der Darstellung vereinzelter Zysten der Versilberungsfärbung unterlegen. Die beiden untersuchten Immunfluoreszenztechniken sowohl mit monoklonalen als auch mit polyklonalen Antikörpern sind vergleichsweise aufwendig und zur Darstellung von Einzelzysten wenig zuverlässig.

Schlüsselwörter

Pneumocystis carinii, AIDS, Schnellfärbung, GROCOTT-Färbung, Kresylechtviolettfärbung, Immunfluoreszenz.

Summary

Rapid staining methods and immunofluorescence staining in the laboratory diagnosis of *Pneumocystis carinii*: alternatives to GROCOTT staining?

Five different staining methods were applied to visualize cysts of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid of 109 cases with AIDS under suspicion of *Pneumocystis carinii* pneumonia.

— Methenamim silverstaining, original method by GROCOTT

— short version of GROCOTT's method

— Cresylechtviolett staining (CEV)

— Immunofluorescence with monoclonal antibodies

— Immunofluorescence with polyclonal antibodies

The short version of the GROCOTT-silverstaining method appears as an alternative to the time consuming original method. Technically, the CFV staining is easy to perform, however, it failed in demonstration of single cysts. The immunofluorescence antibody staining methods with monoclonal and polyclonal antibodies are as time consuming as the original GROCOTT staining and were not able to visualize single cysts reliably.

Key words

Pneumocystis carinii, rapid staining, GROCOTT's staining, Cresylechtviolettstaining, Immunofluorescence.

Danksagung

Meine besondere Danksagung gilt Frau Petra Droege, die bei allen praktischen und theoretischen Ausarbeitungen zum Gelingen dieser Arbeit Entscheidendes beigetragen hat.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

1. BODY, B., SCHWARTZMAN, J., BROWN, H., GRÖSCHEL, D. (1987):
Possible confusion of aspergillus fumigatus and Pneumocystis carinii.
Eur. J. Clin. Microbiol. 6, 603-604.

2. BOWLING, M., SMITH, I., WESCOTT, S. (1973):
A rapid staining procedure for Pneumocystis carinii.
Am. J. Med. Technol. 39, 267-268.

3. BRENNER, M., OGNIBENE, F., LACK, E. (1987):
Prognostic factors and life expectancy of patients with acquired immunodeficiency syndrome and Pneumocistis carinii-pneumonia.
Am. Rev. Respir. Dis. 136, 1199-1206.

4. CHURUKIAN, C., SCHENK, E. (1977):
Rapid GROCOTT's methenamin silver nitrate method for fungi and Pneumocystis carinii.
Am. J. Clin. Pathol. 68, 427-428.

5. GILL, V., EVANS, G., STOCK, F., PARILLO, J., MASUR, H., KOVACS, J. (1987):
Detection of Pneumocystis carinii by fluorescent-antibody-stain using a combination of three monoclonal antibodies.
J. Clin. Microbiol. 19, 1837-1840.

6. GROCOTT, R. (1955):
A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamin silver nitrate technique.
Am. J. Clin. Pathol. 25, 975-979.

7. HUGHES, W. (1973):
Pneumocystis carinii pneumonitis in children with malignancies.
J. Pediatr. 82, 404-415.

8. KIM, H., HUGHES, W., FELDMAN, S. (1972):
Studies of morphology and immunfluorescence of Pneumocystis carinii.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141, 304-309.

9. KOVACS, J., GILL, V., SWAN, J., OGNIBENE, F., SHELHAMER, J., PARILLO, J., MASUR, H. (1986):
Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia.
Lancet ii, 1-4.

10. KOVACS, J., VALERIE, L., MASUR, H., LEOUNG, G., HADLEY, K. (1988):
Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia: Improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies.
N. Eng. J. Med. 318, 589-593.

11. MAC FARLANE, J., FINCH, R. (1985):
Pneumocystis carinii pneumonia.
Thorax 40, 561-570.

12. MAHAN, C., SALE, G. (1978):
Rapid methenamin silver stain for Pneumocystis and fungi.
Pathol. Lab. Med. 102, 351-352.

13. MILDER, J., WALZER, P., COONROD, J., RUTLEDGE, M. (1980):
Comparison of histological and immunological techniques for detection of Pneumocystis carinii in rat bronchial lavage fluid.
J. Clin. Microbiol. 4, 409-417.

14. PIFER, L. (1978):
Pneumocystis carinii infection: Evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children.
Pedriatrics 61, 35-41.

15. PIFER, L. (1984):
Pneumocystis carinii antigenemia in adults with malignancy, infection or pulmonary disease.
J. Clin. Microbiol. 20, 887-890.

16. ROSNER, D., KAHN, F. (1987):
Respiratory infections in AIDS: A comprehensive care approach.
J. Respir. Dis. 8, 83-94.

17. STAGNO, S. (1980):
Pneumocystis carinii pneumonitis in young immunocompetent infants.
Pediatrics 66, 56-62.

18. WALZER, P. (1974):
Pneumocystis carinii pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic and clinical features.
Ann. Intern. Med. 80, 83-93.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Georg Daeschlein
Institut für Mikrobiologie der Freien Universität Berlin

Hindenburgdamm 27
D-1000 Berlin 45 · Bundesrepublik Deutschland

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: 12

Autor(en)/Author(s): Daeschlein Georg

Artikel/Article: Schnellfärbemethoden und Immunfluoreszenzfärbungen in der Labordiagnose von Pneumocystis carinii - Alternativen zur GROCOTT-Färbung? 313-320