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

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 14 (1992) 273 - 278

Abteilung für Medizinische Parasitologie (Leiter: Univ. Prof. Dr. H. Aspöck)
des Klinischen Instituts für Hygiene der Universität Wien (Suppl. Vorstand: Univ. Prof. Dr. M. Rotter)
I. Universitäts-Hautklinik (Vorstand: Univ. Prof. Dr. K. Wolff)

Der Antigennachweis zur Diagnose von *Pneumocystis carinii*-Infektionen bei HIV-1-positiven Patienten

A. Haßl[1], Silvia Mayerhofer[2], H. Aspöck[1]

Einleitung

Die Laboratoriumsdiagnostik der *Pneumocystis carinii*-Infektion basiert auf mehreren Methoden des direkten Erregernachweises, die zwar durchaus leistungsfähig, jedoch vergleichsweise aufwendig und für Screening-Untersuchungen nur wenig geeignet sind (1, 6, 8). Gerade solche Screening-Untersuchungen erweisen sich aber zunehmend als notwendig. Durch die in der jüngsten Zeit erheblich verbesserten Möglichkeiten der Chemotherapie und -prophylaxe ist zwar die Zahl der schweren *Pneumocystis carinii*-Pneumonien mit massiver Ausscheidung des Erregers stark zurückgegangen, hingegen hat die Zahl der chronisch infizierten Patienten mit Ausscheidung geringer Parasitenmengen zugenommen. Diese Patienten müssen kontinuierlich diagnostisch überwacht werden, um eine (neuerliche) Exazerbation rechtzeitig erfassen zu können. Es ist daher naheliegend, nach Tests zu suchen, die diesen veränderten Anforderungen genügen, und durch die eine steigende Anzahl von Proben im Screening auf *Pneumocystis carinii* in ökonomischer Weise untersucht werden können (5).

Auf Grund unserer guten Erfahrungen mit dem Antigennachweis bei Toxoplasma-Infektionen (7) haben wir versucht, einen Dot-ELISA zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-Antigenen zu etablieren, mit dem in vergleichsweise kurzer Zeit und mit vertretbarem Aufwand auch eine große Anzahl von Proben (in der Regel handelt es sich dabei um induzierte Sputa) diagnostisch bewältigt werden könnnen.

Material und Methoden

370 Proben — etwa 90% Sedimente von induzierten Sputa nach Schleimlösung, 10% Bronchioalveolarlavagen — von insgesamt 117 HIV-positiven Patienten, zumeist im Stadium IV C oder IV D nach CDC (4), wurden in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde in einem direkten Immunfluoreszenztest (Cellabs PTY LTD, Brookvale, Australien) und mittels einer Calcofluor-Färbung (Polysciences Inc., Warrington, USA) auf das Vorkommen von Trophozoiten und Zysten von *Pneumocystis carinii* untersucht.

Der Dot-ELISA zum Nachweis von Antigen von *Pneumocystis carinii* wurde wie folgt durchgeführt:

Vom anderen Teil der Sedimente wurden die Zellen in Aqua bidestillata lysiert, nach hochtouriger Zentrifugation (10.000 g, 10 min.) wurde der Überstand abpippetiert und bei 56° C 30 min. inaktiviert. Dann wurde das Lysat in einem Biodot-Apparat auf

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

TABELLE 1

Ergebnisse des Vergleichs des Direkten Erregernachweises mit einem Dot-ELISA zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-Infektionen.

		Direkter Erregernachweis		
		positiv	negativ	
Dot-ELISA	positiv	58	38	96
	negativ	51	223	274
		109	261	370

Nitrozellulose aufgebracht. Noch freie Bindungsstellen der Nitrozellulose wurden mit 2% Rinderalbumin in einem physiologischen Puffer (PBS) abgedeckt. Die starken Reaktionen von endogenen Peroxidasen wurden durch eine Inkubation in 0,3%igem H_2O_2 beseitigt. Anschließend wurde ein gegen *Pneumocystis carinii* gerichteter polyklonaler Kaninchen-IgG-Antikörper aufgebracht. Zur Herstellung dieses Antikörpers wurden die spezifischen pathogenfreien Spendertiere mit einem lytischen Antigen aus dem Sediment einer Lungenspülflüssigkeit einer experimentell mit *Pneumocystis carinii* infizierten Ratte mehrfach immunisiert. Die Gebrauchsverdünnung des affinitätsgereinigten und sowohl mit Candida-Zellen als auch mit Seren verschiedener Spezies absorbierten Antikörpers wurde durch Schachbrett-Titration ermittelt (dzt. 1 : 50). Nach einer 2stündigen Inkubation des Antikörpers wurde ein Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG von der Maus (Dianova GmbH, Hamburg, D) aufgebracht und anschließend die Membran mit Substrat (0,01% H_2O_2 + 4-Chloro-1-Naphtol) überschichtet.

Die Ergebnisse des Nachweises von *Pneumocystis carinii*-Antigen wurden mit jenen des Standardverfahrens (Direkter Immunfluoreszenztest + Calcofluorfärbung) verglichen und die Kennzahlen zur Charakterisierung des Verfahrens berechnet. Sodann wurden die Ergebnisse der Verfahren mit dem Auftreten von Pneumozystosen korreliert, die mit indirekten, klinischen Verfahren diagnostiziert wurden (11). Die leichte Ablesbarkeit des tests wird in Abbildung 1 demonstriert.

Ergebnisse

In 109 der insgesamt 370 Proben wurde im direkten Erregernachweis *Pneumocystis carinii* nachgewiesen, in 96 Proben konnte das Antigen gefunden werden (siehe Tab. 1). In 223 Proben wurden weder der Erreger noch Antigene des Erregers nachgewiesen. 36 Proben waren zum Zeitpunkt einer klinisch diagnostizierten Pneumozystose gewonnen worden, von diesen waren alle in beiden Testverfahren positiv.

Daraus ergeben sich folgende Kennzahlen für den Vergleich der Diagnoseverfahren und den Vergleich mit klinischen Daten: Die Korrelation des Antigennachweises mit dem direkten Parasitennachweis beträgt 73,3%; die Sensitivität des Verfahrens 52,9% und die Spezifität 85,3%. Der Vorhersagewert (predictive value) eines positiven Ergebnisses beträgt 0,6, der eines negativen Ergebnisses 0,81.

Verglichen mit klinisch diagnostizierten akuten Pneumozystosen beträgt der Vorhersagewert eines positiven Resultats beim Antigentest 12, beim direkten Erregernachweis 8; der Vorhersagewert eines negativen Ergebnisses in beiden Fällen 100.

Diskussion

Die Diagnose einer Infektion eines immunsupprimierten Patienten mit *Pneumocystis carinii* basiert derzeit allgemein auf dem Erregernachweis in induzierten Sputa oder Brocheoalveolarlavagen (10). Der Nachweis der Parsiten wird heute häufig mittels eines direkten Immunfluoreszenztests mit monoklonalen Antikörpern geführt, einem

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

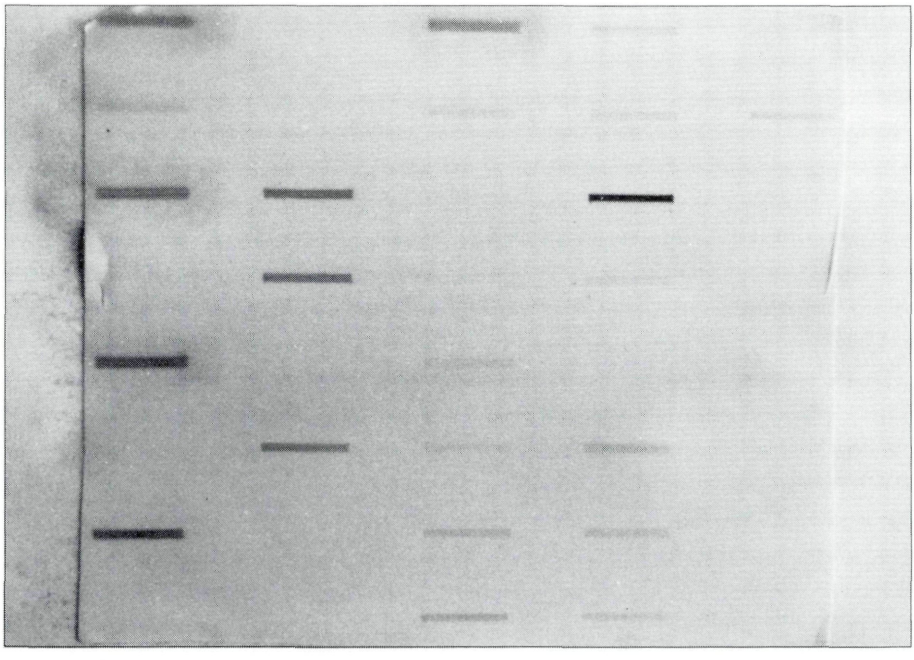

Abb. 1:

Dot-ELISA zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-Antigen

Testverfahren, das auf Grund seiner sehr hohen Sensitivität bereits in den Rang eines Standardverfahrens erhoben worden ist (3, 9). Als Ersatz für die früher als Goldstandard für den Nachweis von *Pneumocystis carinii* angesehene Silberfärbung nach Grocott kann die Calcofluor-Färbung benutzt werden, diese weist jedoch, ebenso wie die Versilberungstechnik, nur eines der Stadien des Erregers, die Zysten, nach (2, 12). Diese Färbetechnik ist daher wesentlich weniger sensitiv als der Immunfluoreszenztest, der beide Stadien von *Pneumocystis carinii* nachweist; in unserem Kollektiv konnte nur eine einzige Probe gefunden werden, in der im Calcofluortest eine Zyste identifiziert wurde, bei der der Immunfluoreszenztest jedoch negativ war. Wir haben die Ergebnisse beider Testverfahren zusammengefaßt und als direkten Nachweis bezeichnet. Dieser direkte Nachweis scheint sehr sensitiv bereits die Ausscheidung sehr geringer Mengen von *Pneumocystis carinii*-Zellen anzuzeigen; dies ist zwar ein erheblicher Vorteil für die Differentialdiagnose pulmonaler Infektionen (Vorhersagewert negativer Ergebnisse 1,0!), der Preis dieser hohen Sensitivität ist jedoch eine schlechte Korrelation mit dem Auftreten von pulmonalen Pneumozystosen mit klinisch relevanten Symptomen (Vorhersagewert eines positiven Ergebnisses: 0,08).

Ein gravierender Nachteil aller Färbemethoden ist allerdings, daß zur Beurteilung der Präparate eine erhebliche Zeitmenge benötigt wird. Dies läßt insbesondere ein Durchmustern von größeren Mengen an geringgradig kontaminierten Proben ineffizient erscheinen. Ein rasch durchführbarer und im Routinebetrieb praktikabler Suchtest wird daher dringend benötigt. Wir haben uns beim Aufbau eines derartigen Tests für die Technik eines Enzymimmuntests mit auf einer Membran fixiertem Antigen (Dot-ELISA) entschieden, da wir zum einen über erhebliche Erfahrung mit dieser Technik verfügen (7), und zum anderen dieses Verfahren einen guten Kompromiß zwischen ausreichender Sensitivität und rascher Ergebnisermittlung darstellt.

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

Betrachtet man den direkten Erregernachweis als Standardverfahren, so errechnet man aus den Ergebnissen der 370 ausgetesteten Proben die relativ schlechte Korrelation der beiden Testverfahren von 73,3%. Es muß allerdings angemerkt werden, daß der direkte Erregernachweis mittels Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern keinesfalls als eine definitive Testmethode angesehen werden kann, insbesondere bei der Verarbeitung von Sputumproben sind falsch positive Resultate nicht ausschließbar. Der wesentlich treffsicherere Test, die Versilberung nach Grocott, hat neben dem Nachteil ihrer fraglichen klinischen Relevanz auf Grund der Unmöglichkeit, Trophozoiten von *Pneumocystis carinii* nachzuweisen, in unserem Testvergleich auch den Mangel, nicht mit dem Antigentest vergleichbar zu sein. Dies deshalb, weil die Spendertiere für die Antikörper gegen *Pneumocystis carinii* mit beiden Formen des Erregers immunisiert wurden, der Antigennachweis daher auch auf die Anwesenheit von beiden Formen im Untersuchungsmaterial reagiert.

Beim Vergleich der Resultate des direkten Erregernachweises mit dem Antigentest fällt auf, daß insbesondere die Sensitivität des Antigennachweises sehr viel geringer ist als die des direkten Nachweises. Dies muß jedoch nicht unbedingt ein Nachteil des Verfahrens sein, ist doch für die sichere Abschätzung der klinischen Relevanz eines Ergebnisses die zu hohe Sensitivität des Immunfluoreszenztests ein erheblicher Nachteil. Wir haben daher die Testergebnisse mit klinischen Diagnosen, das heißt mit dem Auftreten von Symptomen einer Pneumozystose, korreliert. Der Vorhersagewert eines positiven Resultats im Antigentest ist unter diesen Bedingungen deutlich besser als jener des direkten Nachweises.

Der Dot-ELISA zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-Antigen ist in besonderer Weise für die Bearbeitung einer größeren Anzahl an Proben mit einer geringen Parasitendichte geeignet. Die geringere Sensitivität im Vergleich zum Immunfluoreszenztest erweist sich in der Praxis als Vorteil. Die beschriebene Methode läßt sich zukünftig vermutlich als Screening-Verfahren zur kontinuierlichen Überwachung von gefährdeten Patienten nutzen, während zur Differentialdiagnose bei Verdacht auf eine *Pneumocystis carinii*-Pneumonie der Immunfluoreszenztest derzeit auf Grund der raschen Ergebnisermittlung im Einzelpräparat das beste Verfahren zu sein scheint.

Zusammenfassung

Es wird ein Dot-ELISA zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-Antigenen in induzierten Sputa oder Broncheoalveolarlavagen beschrieben. Auf der Basis von 370 Proben werden die Ergebnisse dieses Testverfahrens mit jenen eines direkten Nachweises, bestehend aus einer Kombination von direktem Immunfluoreszenztest und Calcofluorfärbung, verglichen. Der Antigentest erzielt eine deutlich geringere Sensitivität, ein Charakteristikum, das im Routinebetrieb von Vorteil sein kann. Dies und die Einfachheit der Durchführung machen den Test besonders zur Langzeitüberwachung von immunsupprimierten Patienten geeignet, die durch eine chronische Infektion mit dem Erreger gefährdet sind.

Schlüsselwörter

Pneumocystis carinii, Dot-ELISA, Antigennachweis, Langzeitüberwachung.

Summary

An antigen-dot-ELISA for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* infections in HIV-infected patients

A dot-ELISA for the detection of antigen of *Pneumocystis carinii* in samples of induced sputum or of broncheoalveolar lavage is described. Basing upon 370 samples the results of this test are compared with those obtained by a direct detection system consisting of a direct immunofluorescent test on one hand and a calcofluor stain on the

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

other. The antigen-dot-ELISA shows a distinctly lower sensitivity which has to be regarded as an advantage with respect to the clinical relevance of the detection of the parasite. Thus, the test seems to be siutable particularly for the surveillance of immunodeficient patients who are at risk of pneumocystis pneumonia.

Key words

Pneumocystis carinii, dot-ELISA, antigen detection, long-term screening.

Literatur

1. ASPÖCK, H., HASSL, A. (1990):
Parasitic infections in HIV-patients in Austria: First results of a long-term study.
Zbl. Bakt. 272, 540-546.

2. BASELSKI, V. S., ROBINSON, M. K., PIFER, L. W., WOODS, D. R. (1990):
Rapid Detection of Pneumocystis carinii in Broncheoalveolar Lavage Samples by Using Cellufluor Staining.
J. Clinical Microbiol. 28, 393-394.

3. BAUGHMAN, R. P., STROHOFER, S. S., CLINTON, B. A., NICKOL, A. D., FRAME, P. T. (1989):
The Use of an Indirect Fluorescent Antibody Test for Detecting Pneumocystis carinii.
Arch. Pathol. Lab. Med. 113, 1062-1065.

4. CDC (1986):
Classification system for Human T-lymphotropic virus type III/Lymphadenopathy-associated virus infections.
Morb. Mort. Weekly Rep. 35, 334-339.

5. FARRAM, E., GARCIA, M., WALKER, J., SMITHYMAN, A. M. (1989):
Novel Diagnostic Tests for Pneumocystis carinii Pneumonia (PCP).
Transplantation Proceedings 21, 2100-2102.

6. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1990):
Diagnosis of Pneumocystis carinii infections in Austrian AIDS patients — results of a long-term study.
Zbl. Bakt. Hyg. A abstracts 317, 52.

7. HASSL, A., ASPÖCK, H., FLAMM, H. (1988):
Circulating antigens of Toxoplasma gondii in patients with AIDS: Significance of detection and structural properties.
Zbl. Bakt. Hyg. A 270, 302-309.

8. KOVACS, J. A., MASUR, H. (1988):
Pneumocystis carinii Pneumonia: Therapy and Prophylaxis.
J. Infec. Dis. 158, 254-259.

9. MAGEE, J. G., MCDADE, K. J., CUNNINGHAM, J., HARRISON, V. (1991):
Pneumocystis carinii pneumonia: detection of parasites by immunofluorescence based on a monoclonal antibody.
Medical Laboratory Sciences 48, 235-237.

10. MILLER, R. F., KOCJAN, G., BUCKLAND, J., HOLTON, J., MALIN, A., SEMPLE, S. J. (1991):
Sputum induction for the diagnosis of pulmonary disease in HIV positive patients.
J. Infection 23, 5-15.

11. O'BRIAN, R. F. (1989):
In Search of Shortcuts: Definitive and Indirect Tests in the Diagnosis of Pneumocystis carinii Pneumonia in AIDS.
Am. Rev. Respir. Dis. 139, 1324-1327.

12. STRATTON, N., HRYNIEWICKI, J., AARNAES, S. L., TAN, G., DE LA MAZA, L. M., PETERSON, E. M. (1991):
Comparison of Monoclonal Antibody and Calcofluor White Stains for the Detection of Pneumocystis carinii from Respiratory Specimens.
J. Clinical Microbiol. 29, 645-647.

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

KORRESPONDENZADRESSE:

Univ.-Doz. Dr. A. Haßl
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

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: 1992

Band/Volume: 14

Autor(en)/Author(s): Hassl Andreas R., Mayerhofer Silvia, Aspöck Horst

Artikel/Article: Der Antigennachweis zur Diagnose von Pneumocystis carinii-Infektionen bei HIV-1 -positiven Patienten. 273-278