

„Nested PCR“ zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* aus klinischen Materialien

O. Liesenfeld, P. Hoppenworth, H. Hahn

Einleitung *Toxoplasma gondii* stellt einen der hierzulande bedeutendsten humanpathogenen Parasiten dar. Die Seroprävalenz der Toxoplasmose liegt mit dem Alter steigend bei bis zu 75% (7). Aufgrund der Zunahme der Patienten mit HIV-Infektion ist auch die Bedeutung der Toxoplasmose enorm gestiegen. Für *Toxoplasma*-seropositive Patienten mit HIV-Infektion wurde ein Risiko von mehr als 40% zur Entwicklung einer *Toxoplasma*-Enzephalitis errechnet (6).

Eine schnelle spezifische Diagnose ist von extremer Bedeutung, da ein frühes Einsetzen der Therapie zu einer Verminderung der meist zerebralen Läsionen der Patienten führt (6).

Die herkömmliche Diagnostik vertraut meist einer Kombination klinischer Symptome, unspezifischer Veränderungen in bildgebenden Verfahren wie CT oder NMR sowie mikrobiologischen Methoden, die entweder zeitaufwendig (Zellkultur, Tierversuch) oder aber wenig sensitiv (Nachweis von zirkulierendem Antigen, Mikroskopie) sind (6).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde als hoch sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von *T. gondii* in unterschiedlichen klinischen Materialien eingesetzt (2, 3, 4, 10, 11). Die „Nested PCR“, das heißt die zweimalige Amplifikation mit ineinandergeschachtelten Primerpaaren, zeichnet sich durch eine gesteigerte Sensitivität und Spezifität sowie eine schnelle Durchführung durch den Verzicht auf die zeit- und arbeitsaufwendige Hybridisierung aus (5). Innerhalb eines Untersuchungstages können die Ergebnisse der „Nested PCR“ aus klinischen Untersuchungsmaterialien an den behandelnden Kliniker übermittelt werden.

Methode

Klinische Materialien	Liquor- und Serumproben von AIDS-Patienten mit Verdacht auf Enzephalitis wurden routinemäßig zur serologischen Begutachtung eingesandt.
Antikörpertests	<i>Toxoplasma</i> -spezifische IgM- und IgG-Antikörper wurden mit einem ELISA (Freka-Toxo-G/M-ELISA, FRESENIUS, Deutschland) bestimmt.
Extraktion und Präzipitation der DNS	Die Extraktion der DNS wurde nach Proteinase K/SDS-Vorbehandlung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion oder, bei blutigen Materialien, mit Erythrozyten-Lysepuffer und Proteinase K durchgeführt. Die Präzipitation der extrahierten DNS erfolgte mit Äthanol.
Amplifikation der DNS	Mittels zweier externer Primer wurde ein 244 Basenpaare langes DNS-Fragment des B1-Genes (Basen 669 bis 912) von <i>T. gondii</i> amplifiziert; in einem 2. PCR-Schritt wurde anschließend mit zwei internen Primern, die von BURG et al. (1) erstmals beschrieben wurden, ein 193 Basenpaare langes Fragment reamplifiziert.

Der Amplifikationspuffer bestand aus 10 mMol Tris, pH 8.3, 25 mMol MgCl₂, 200 µmol d’NTP (alle SIGMA, Deutschland), 1 U Taq-Polymerase (GIBCO, Deutschland) und 5 µl Proben-DNS. Überlegt mit ein Tropfen Mineralöl wurden 30 Zyklen mit folgenden Schritten durchgeführt:

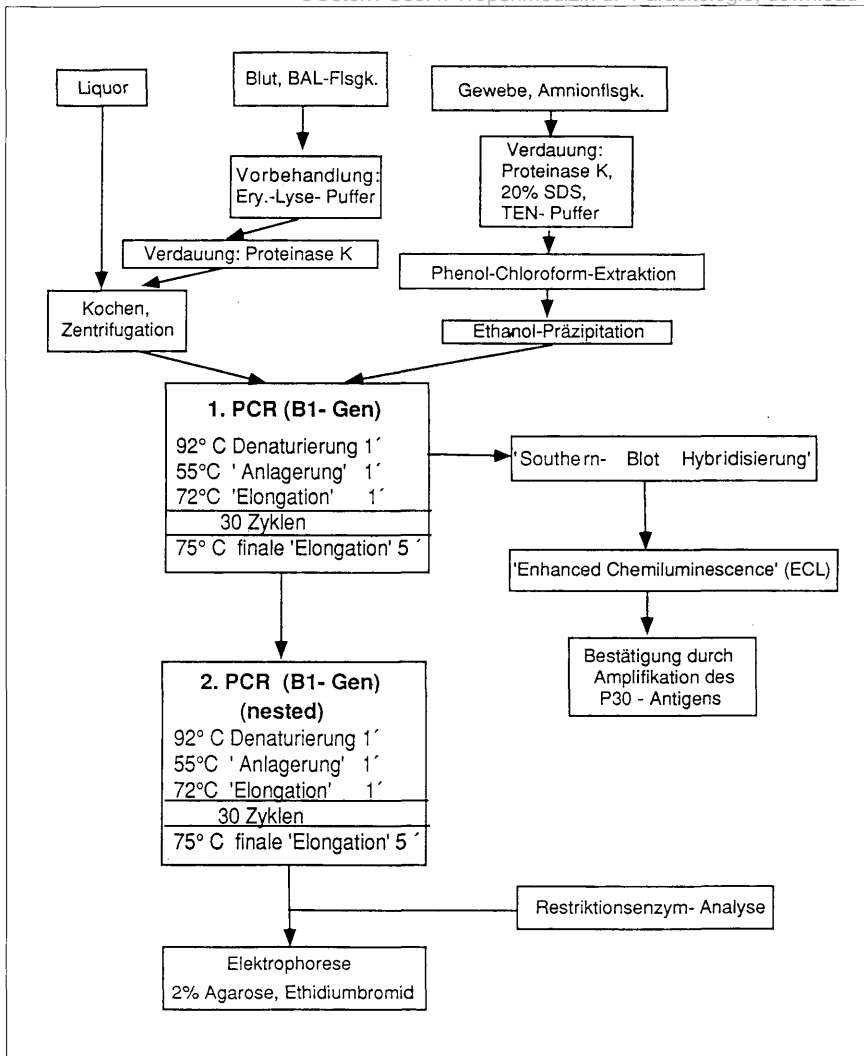


Abbildung 1:
Schematische Darstellung der Verarbeitung klinischer Untersuchungsmaterialien zum Nachweis von *Toxoplasma gondii*-spezifischer DNS.

nationen wie Verwendung von Handschuhen, aerosolresistenten Pipettenspitzen und getrennten Räumen für Aufarbeitung, Amplifikation und Sichtbarmachung der DNS. Die Ergebnisse wurden am gleichen Tag telefonisch übermittelt und zusammen mit dem behandelnden Kliniker interpretiert.

Abbildung 1 zeigt schematisch die Verarbeitung klinischer Untersuchungsmaterialien.

Klinische Daten

Klinische Daten wie Obduktionsergebnisse und das Ansprechen auf eine spezifische antiparasitäre Therapie wurden retrospektiv erhoben.

Ergebnisse

Wir konnten Liquor- und Blutproben von 13 AIDS-Patienten mit gesicherter Toxoplasmose untersuchen. Die Patientenproben wurden vor dem Einsetzen der antiparasitären Therapie gewonnen, Blutproben in einem Fall auch zusätzlich nach Einsetzen der Therapie.

In fünf Fällen (38,5%) gelang dabei der Nachweis von *T. gondii*-spezifischer DNS aus dem Liquor. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die klinischen und mikrobiologischen Befunde

Denaturierung bei 94° für eine Minute, Anlage- rung der Primer bei 55° für eine Minute und Extension bei 72° für eine Minute. Abgeschlos- sen wurde die Amplifikation durch eine finale Extension von 72° über fünf Minuten. Die Re- amplifizierung erfolgte unter den gleichen Re- aktionsbedingungen mit 5 µl der in der ersten PCR amplifizierten DNS. Die Produkte wurden direkt mittels Gelelektrophorese in 2% HGT- Agarose (USB Chem., USA) mit Ethidiumbromid (SIGMA, Deutschland) sichtbar gemacht.

In einigen Fällen wurden klinische Materia- lien mit der PCR amplifiziert und durch Sou- thern-Blot-Hybridisierung und Enhanced Che- miluminescence dargestellt, in Sonderfällen auch anhand der Amplifikation des P30-Anti- gens bestätigt (Abteilung Klinische Parasitolo- gie des Robert Koch-Instituts, Berlin) (10).

Die Sensitivität der „Nested PCR“ wurde anhand der Amplifikation von Peritonealexsudat infizierter Mäuse in logarithmischen Ver- dünnungen mit umgerechnet weniger als ein- em Parasiten bestimmt; die Spezifität wurde in Vorversuchen mit Liquorproben von AIDS- Patienten mit Enzephalitiden anderer Genese (Mykobakterien, Kryptokokken, Zytomegalievi- rus) überprüft.

Positiv- und Negativkontrollen wurden sys- tematisch in die PCR integriert. Inhibitorische Effekte der Patientenprobe wurden durch Hin- zufügen eines Kontrollfragments in eine ge- sonderte Patientenprobe und Amplifikation unter gleichen Bedingungen ausgeschlossen. Des weiteren verwendeten wir die üblichen Empfehlungen zur Vermeidung von Kontami-

Tabelle 1:

Klinische, anamnestische und mikrobiologische Daten der Patienten.

Patient	Klinik	Unter- suchungs- material	Serologie ELISA	Nested PCR	antiparas. Therapie	Autopsie- Ergebnis	Anmerkung
1	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	+	+	n. d.	
2	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	+	+	n. d.	
3	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	-	+ / -	Toxo	
4	AIDS, Toxo	Liquor, Blut	IgG	Liq.+ / Blut-	+	n. d.	
5	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	-	+	n. d.	
6	AIDS, Toxo	Liquor, Blut	IgG	Liq.- / Blut-	+	n. d.	
7	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	+	+	n. d.	
8	AIDS, diss. Toxo	Blut, BAL, Serum	IgG IgM	Blut+ / BAL+ Ser.+ / Liq.-	+	n. d.	PCR pos. unter Therapie
9	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	-	-	Toxo	
10	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	-	+	n. d.	
11	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	-	+	n. d.	
12	AIDS, Toxo	Liquor, Blut	IgG	Liq.+ / Blut-	+	Toxo	
13	AIDS, Toxo	Liquor	IgG	-	+	n. d.	

aller Patienten. Bei zwölf Patienten stellte sich die Infektion typischerweise als zerebrale Toxoplasmose dar, ein Patient erkrankte an einer disseminierten Toxoplasmose. Der Nachweis von *T. gondii*-spezifischer DNS aus dem Blut konnte in keinem der Fälle von zerebraler Toxoplasmose, bei denen entsprechende Proben vorlagen, erbracht werden.

T. gondii-spezifische DNS ließ sich dagegen in Blut, Serum und Bronchioalveolarflüssigkeit (BAL) des Patienten mit disseminierter Toxoplasmose nachweisen.

Serologisch zeigten alle Patienten IgG-Antikörper gegen *T. gondii* im Sinne einer latenten Infektion; bei dem Patienten mit disseminierter Toxoplasmose ließen sich auch spezifische Antikörper vom IgM-Typ nachweisen.

Die Diagnose der Toxoplasmose konnte bei allen Patienten entweder durch das Ansprechen auf eine spezifische antiparasitäre Therapie oder durch das Autopsieergebnis bestätigt werden.

Diskussion

Die Sicherung der Diagnose einer zerebralen Toxoplasmose, der häufigsten ZNS-Erkrankung bei AIDS-Patienten, ist durch das Versagen der herkömmlichen Serodiagnostik sowie der wenig sensitiven oder zeitaufwendigen direkten Nachweisverfahren erschwert (6).

Wir untersuchten routinemäßig eingesandte Liquorproben von Patienten mit Toxoplasmose auf das Vorhandensein von *T. gondii*-spezifischer DNS. In fünf von 13 Liquorproben (38,5%) wurde erregerspezifische DNS nachgewiesen. Dies spiegelt Ergebnisse von PARMLEY und Mitarbeitern wieder, die bei 44% der an zerebraler Toxoplasmose erkrankten Patienten erregerspezifische DNS nachweisen konnten (9). Höhere Nachweisraten von bis zu 100% konnten nur bei ausgewählten kleinen Patientengruppen erzielt werden (8). Aufgrund der zwar meist multifokalen, jedoch nicht immer die Meningen betreffenden Läsionen erscheinen solch hohe Nachweisraten unserer Meinung nach nicht realistisch.

Bei einem Patienten mit disseminierter Toxoplasmose konnte erregerspezifische DNS auch in Serum, Blut und BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden. Auf die Bedeutung von BAL-Flüssigkeit zum Nachweis von *T. gondii* wurde auch von ROTH et al. hingewiesen (10). Der Nachweis von *T. gondii*-spezifischer DNS aus dem Serum wurde unseres Wissens nach in der Literatur bisher nicht beschrieben, könnte jedoch Ausdruck der massiven Parasitämie des Patienten sein.

Bei dem gleichen Patienten konnte interessanterweise auch mehrere Tage nach dem Einsetzen der antiparasitären Therapie noch erregerspezifische DNS im Blut nachgewiesen werden. Dies stellt einen weiteren Vorteil der PCR gegenüber alternativen Methoden zum direkten Erregernachweis, bei denen intakte oder vermehrungsfähige Parasiten Voraussetzung für den Erregernachweis sind, dar (13).

Alle untersuchten Patienten zeigten, in Einklang mit der internationalen Literatur, *Toxoplasma*-spezifische IgG-Antikörper als Ausdruck einer latenten Infektion (6). ZUFFEREY et al. konnten alleinig für eine negative *Toxoplasma*-Serologie einen hohen prädiktiven Wert zum Ausschluß einer akuten Toxoplasmose nachweisen (12). In unserer Untersuchung konnten nur bei einem Patienten mit disseminierter Toxoplasmose IgM-Antikörper gegen *T. gondii* nachgewiesen werden.

Methodisch haben wir uns für die Anwendung der „Nested PCR“ entschieden, die sensitiver und spezifischer als die herkömmliche PCR ist. Zudem können mit der „Nested PCR“ durch den Verzicht auf die zeit- und arbeitsaufwendige Hybridisierung die Ergebnisse deutlich schneller erzielt werden (5). Der Gefahr von Kontaminationen konnte durch strikte Anwendung etablierter Vorsichtsmaßnahmen vorgebeugt werden. Falsch positive Ergebnisse wurden durch die Mitführung von internen Kontrollen ausgeschlossen.

Ein Vergleich der „Nested PCR“ mit anderen direkten Nachweisverfahren wurde von uns nicht durchgeführt, da die herkömmlichen Untersuchungsmethoden auf dem Nachweis intakter oder vermehrungsfähiger Parasiten beruhen und somit eine geringere Sensitivität zeigen (13).

Unsere Untersuchung unterstreicht, daß die PCR eine wichtige Bereicherung der Diagnostik der Toxoplasmose des Immunsupprimierten darstellt. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität bei schneller Durchführung aus. Weitere Untersuchungen an großen Patientengruppen werden Aussagen über die Wertigkeit unterschiedlicher Untersuchungsmaterialien zum Nachweis von *T. gondii* möglich machen.

Zusammenfassung

Aufgrund methodischer Probleme herkömmlicher Nachweisverfahren stellt die spezifische Diagnose einer zerebralen Toxoplasmose bei AIDS-Patienten ein großes Problem dar. Mittels „Nested PCR“ konnten wir bei fünf von 13 Patienten (38,5%) mit gesicherter Toxoplasmose erregerspezifische DNS im Liquor nachweisen. Der Nachweis von *Toxoplasma gondii*-spezifischer DNS aus dem Blut, der Bronchioalveolarflüssigkeit und dem Serum gelang bei einem Patienten mit disseminierter, extrazerebraler Toxoplasmose. *Toxoplasma gondii*-spezifische Antikörper vom IgM-Typ ließen sich nur bei diesem Patienten nachweisen, die übrigen Patienten zeigten lediglich IgG-Antikörper als Ausdruck einer latenten Infektion.

Die „Nested PCR“ als schnelle, sensitive und spezifische Methode stellt eine wichtige Bereicherung der Diagnostik der Toxoplasmose bei AIDS-Patienten dar.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, Toxoplasmose, AIDS, PCR.

Summary

“Nested PCR” for the detection of Toxoplasma gondii from clinical samples

Diagnosis of acute toxoplasmosis in AIDS-patients is hindered by the low sensitivity or time-consuming performance of common diagnostic procedures. We investigated the value of a nested PCR-assay for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific DNA in clinical samples. Specific DNA was detected from cerebrospinal fluid in 5 out of 13 patients (38.5%) with proven cerebral toxoplasmosis. *Toxoplasma gondii*-specific DNA was also found in blood, broncho-

alveolar fluid and serum of one patient with disseminated extracerebral toxoplasmosis. IgM-antibodies against *Toxoplasma gondii* were only detectable in this patient. The other patients showed specific IgG-antibodies reflecting latent disease.

In conclusion, our investigation underlines the value of nested PCR as a rapid, sensitive, and specific tool for establishing the diagnosis of toxoplasmosis in AIDS-patients.

Key words *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, AIDS, PCR.

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, 1787-1792.
2. GROSS, U., ROGGENKAMP, A., JANITSCHKE, K., HEESEMANN, J. (1992):
Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimen.
Eur. J. clin. Microbiol. infect. Dis. 11, 33-39.
3. HOLLIMAN, R. E., JOHNSON, J. D., SAVVA, D. (1990):
Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in association with AIDS using the polymerase chain reaction.
Scan. J. infect. Dis. 22, 240-244.
4. JOHNSON, J. D., BUTCHER, P. D., SAVVA, D., HOLLIMAN, R. E. (1993):
Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis.
J. Inf. 26, 147-158.
5. LAZIZI, Y., ELFASSI, E., PILLOT, J. (1992):
Detection of Hepatitis C virus sequences in sera with controversial serology by nested polymerase chain reaction.
J. clin. Microbiol. 30, 931-934.
6. LUFT, B. J., REMINGTON, J. S. (1992):
Toxoplasmic encephalitis in AIDS.
Clin. Inf. Dis. 15, 211-222.
7. McCABE, R. E., REMINGTON, J. S. (1990):
Toxoplasma gondii.
In: Mandell, R., Douglas, G., Bennett, J. E.: Principles and practise of infectious diseases, 3rd edition, Churchill Livingstone, New York.
8. OSTERGARD, L., NIELSEN, A. K., BLACK, F. T. (1993):
DNA amplification on cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis among HIV-positive patients with signs or symptoms of neurological diseases.
Scand. J. infect. Dis. 25, 227-237.
9. PARMLEY, S. F., GOEBEL, F. D., REMINGTON, J. S. (1992):
Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction.
J. clin. Microbiol. 30, 3000-3002.
10. ROTH, A., ROTH, B., HÖFFKEN, G., STEUBER, S., KHALIFA, K. I., JANITSCHKE, K. (1992):
Application of the polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients.
Eur. J. clin. Microbiol. infect. Dis. 11, 1177-1181.
11. VAN DE VEN, E., MELCHERS, W., GALAMA, J., CAMPS, W., MEUWISSEN, J. (1991):
Identification of *Toxoplasma gondii* infections by BI gene amplification.
J. clin. Microbiol. 29, 2120-2124.
12. ZUFFEREY, J., SUGAR, A., RUDA, P., BILLE, J., GLAUSER, M. P., CHAVE, J. P. (1993):
Prevalence of latent toxoplasmosis and serological diagnosis of active infection in HIV-positive patients.
Eur. J. clin. Microbiol. infect. Dis. 12, 591-595.
13. WASTLING, J. M., NICOLL, S., BUXTON, D. (1993):
Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep.
J. Med. Microbiol. 38, 360-365.

Korrespondenzadresse: Dr. med. Oliver Liesenfeld
c/o Dr. J. S. Remington
Palo Alto Medical Foundation
Research Institute

860 Bryant Street
Palo Alto, CA 94301 · USA

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: 1994

Band/Volume: [16](#)

Autor(en)/Author(s): Liesenfeld Oliver, Hoppenworth P., Hahn H.

Artikel/Article: ["Nested PCR" zum Nachweis von Toxoplasma gondii aus klinischen Materialien. 147-152](#)