

## *Erfahrungen mit einer PCR-gestützten Liquoranalytik in der Diagnostik der zerebralen Toxoplasmose bei AIDS-Patienten*

H. Rinder<sup>1</sup>, Monika Lieb<sup>2</sup>, D. Eichenlaub<sup>2</sup>, Th. Löscher<sup>1</sup>

### **Einleitung**

Die Toxoplasmose ist nach der *Pneumocystis carinii*-Infektion eine der wichtigsten bedrohlichen opportunistischen Infektionen bei AIDS-Patienten und die häufigste, die zu fokalen bzw. multifokalen Läsionen oder disseminierten Enzephalitiden führt (13). Die serologische Diagnostik ist gerade bei immunsupprimierten und neugeborenen Patienten, bei denen eine Diagnosestellung am dringlichsten wäre, wenig hilfreich (7, 14, 17). Die bisher beschriebenen Methoden zum Nachweis zirkulierender Antigene im Liquor oder Blut sind wegen geringer Sensitivität und Spezifität ebenfalls nur beschränkt aussagekräftig (22). Toxoplasmen sind aus Liquor oder Blut auch bei Zuhilfenahme von Kultur und Tierversuch nur in wenigen Fällen nachweisbar, so daß eine definitive parasitologische Diagnose ohne eine risikoreiche Hirnbiopsie nur selten gestellt werden kann (13, 14, 16). In der Praxis stützt sich die Diagnosestellung der Toxoplasma-Enzephalitis bei AIDS-Patienten deshalb vor allem auf das klinische Bild, die Befunde der Computer- und Kernspintomographie (CT/NMR) und auf die empirische Beurteilung des Ansprechens auf eine medikamentöse Therapie (22). Allerdings sind bei einem Teil der Patienten mit bioptisch oder autoptisch gesicherter zerebraler Toxoplasmose keine typischen Herdbefunde im CT oder NMR vorhanden (13, 14, 16, 22). Zudem sind auch Therapieversager unter der Chemotherapie der ersten Wahl mit Sulfadiazin/Pyrimethamin beschrieben worden, bei denen aufgrund einer zutreffenden Diagnose teilweise ein Behandlungsversuch mit Clindamycin/Dapsone wirksam war (11). Daneben ist die empirische Behandlung mit Sulfadiazin/Pyrimethamin aufgrund einer hohen Inzidenz toxischer Wirkungen nicht unumstritten (11).

Ein diagnostischer Fortschritt wurde mit dem Nachweis von Toxoplasma-DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) beschrieben. Damit kann theoretisch bereits ein einzelner Erreger nachgewiesen werden (3), und es konnte ferner gezeigt werden, daß der Nachweis von Toxoplasma-DNA im Liquor mit einer zerebralen Toxoplasmose korreliert ist (9). Wäre die Methode validiert, wäre sie preiswerter als der indirekte Nachweis über CT/NMR, risikoärmer als der direkte Nachweis durch Hirnbiopsien und schneller als ein kultureller Nachweis. Die PCR-Analytik an klinischem Material erreicht jedoch nicht die Sensitivität „idealer Laborbedingungen“. Sie erzielt zudem recht unterschiedliche Ergebnisse. Die bisherigen Erfahrungen beruhen lediglich auf einzelnen Kasuistiken und kleinen Untersuchungsserien (1, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, geeignete Methoden zu entwickeln und zu optimieren, um einen Nachweis von Toxoplasma-DNA aus biologischem Material zuverlässig und empfindlich führen zu können. Grundlegende Voraussetzungen dafür waren die im fol-

genden beschriebene Wahl des Zielgens, die Strategie der Primer-Konstruktion, die Optimierung der einzelnen PCR-Parameter, um eine möglichst große Robustheit und damit eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der Methode zu gewährleisten, sowie die Erarbeitung einer möglichst einfachen Isolationsmethode von Toxoplasma-DNA aus biologischem Material, um PCR-Inhibitoren sicher abzutrennen und einen möglichst empfindlichen Nachweis von Toxoplasma-DNA zu erlauben. Nicht zuletzt sollte diese Methode an klinischem Material validiert werden, denn diese extrem sensitive und bei richtiger Wahl der Zielsequenzen und der Primer auch hochspezifische Methode der PCR wird in zunehmendem Maße Ziel berechtigter Kritik, da sie zu oft zu unkritisch und ohne ausreichende Validierung eingesetzt wird.

## Material und Methoden

### DNA-Isolation aus Liquor

300 µl Liquor wurden mit 100 µl Puffer (200 mM Tris·HCl [pH 8,0]), 100 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1,2% Triton X-100) und 2 µl (20 mg/ml) Proteinase K gemischt. Nach 90-minütiger Inkubation bei 50°C, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation, wurde die DNA aus dem Überstand durch Silikageladsorption („GeneClean“, BIO 101, La Jolla, USA) gereinigt und in 39,5 µl Wasser eluiert.

### PCR-Nachweis von *T. gondii*-DNA

Die Amplifikationen bestanden aus zwei aufeinanderfolgenden, geschachtelten PCR-Reaktionen unter Verwendung des 35fach repetitiven Gens B1 (3) als Zielsequenz. In der ersten PCR-Amplifikation wurde der 0,22 kb vor der *EcoRI*-Schnittstelle liegende Primer TOX-5 (TGC GCA GCC ATC AGC TTA AC) sowie der nach 0,55 kb folgende Primer TOX-8 (TCG TAC GTG ACA GTG AAG AG) verwendet. In der zweiten PCR-Reaktion wurden die Primer TOX-6 (TTG GTG ATG GTT GCC TCG AG) und TOX-7 (GGA AAC AGG TGG TCG ACT TC) eingesetzt, die jeweils 9, bzw. 2 Nukleotide nach den 3'-Enden der Primer TOX-5 und TOX-8 begannen. Bei den einzelnen PCR-Läufen wurde eine sogenannte „Hot Start“-Technik eingesetzt, bei der 39,5 µl der DNA-Lösung (bzw. bei der zweiten, geschachtelten PCR 2 µl des ersten PCR-Ansatzes und 37,5 µl Wasser) mit je 1 µl der beiden Primer (je 50 µM) 2 Minuten bei 96°C denaturiert wurden. Nach Abkühlung auf 80°C wurde eine Mischung von 5 µl Puffer (100 mM Tris·HCl [pH 8,3], 500 mM KCl), 2,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP-Mischung (je 25 mM) und 0,5 µl (5 U/µl) Taq-Polymerase dazu gegeben. Beide PCR-Reaktionen bestanden aus je 50 Zyklen aufeinanderfolgender, 60 Sekunden dauernder Denaturierungen bei 92°C, 60 Sekunden dauernden Hybridisierungsschritten bei 63°C und 90 Sekunden dauernden Extensionen bei 72°C. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 1,3%igen Agarosegel, das 0,2 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, sichtbar gemacht. Sichtbare Banden der erwarteten Größe von 0,5 kb wurden zur Verifizierung ausgeschnitten und mit der bereits genannten Silikageladsorptionsmethode aus dem Gel eluiert und gereinigt. Ein in zwei Produkten der Größen 0,2 kb und 0,3 kb resultierender Endonukleaseverdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* bestätigte das Vorhandensein von *T. gondii*-DNA. Jeder PCR-Lauf schloß eine Positivkontrolle (mit *T. gondii*-DNA) und eine Negativkontrolle (Wasser) ein. Die Bedingungen der zu Vergleichszwecken mit dem „single-copy“-Gen P 30 (2) durchgeführten PCR wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (18).

### Patienten

Es wurden insgesamt 28 Patienten mit AIDS untersucht, von denen aufgrund von neurologischen und/oder Allgemeinsymptomen lumbaler Liquor zur weiteren Diagnostik gewonnen wurde. Alle verfügbaren klinischen Daten (Alter, Geschlecht, Symptomatik, CD4-Zellzahl, vorausgehende Toxoplasmose-wirksame Chemoprophylaxe, Befunde bildgebender Verfahren, klinischer und radiologischer Therapieerfolg, Nachweis von anderen Infektionen oder Tumoren des ZNS) wurden zur Auswertung herangezogen (Tab. 1).

Die Indikation zu einer Toxoplasmose-wirksamen Therapie wurde unabhängig von den Ergebnissen der PCR gestellt. Aufgrund (a) der CT/NMR-Befunde, (b) des klinischen und radiologischen Ansprechens auf eine spezifische Therapie, und (c) ggf. des Nachweises anderer ZNS-Erkrankungen wurde retrospektiv die Diagnose einer zerebralen Toxoplasmose folgendermaßen beurteilt (5, 19):

Tabelle 1:

Basisdaten, Befunde und PCR-Ergebnisse des Patientenkollektivs.

Patient	Alter, Geschl.	CD4/ $\mu$ l	Chemo- prophy- laxe*	Sympto- matik**	CCT/ NMR- Befund	Sero- logie***	Therapieerfolg		andere Dia- gnose****	Diagnose zerebrale Toxopl. *****	PCR
							klinisch	radiolog.			
11	24, m	n.u.	+	N, F, K	sing.	neg.	ja	ja		++	+
20	29, m	n.u.	-	N, P, F, K	sing.	n.u.	ja	n.u.		+	+
27	40, m	20	-	P	mult.	n.u.	nein	ja		+	+
3	31, m	596	-	N, F, K	mult.	pos.	n.b.	n.b.		+	-
19	38, m	50	-	N, P, F	mult.	n.u.	ja	ja		+	-
24	30, m	48	-	F, K	mult.	n.u.	ja	ja		+	-
14	34, m	84	-	-	0	neg.	n.b.	n.b.	U	(+)	+
4	32, m	0	-	P, F	mult.	neg.	ja	nein	PML	(+)	-
15	43, m	10	-	P, F	sing.	n.u.	(verstorben)			(+)	-
17	37, m	1	-	P	mult.	n.u.	nein	nein	L	(+)	-
12	55, m	195	-	P	0	n.u.	k.Th.	k.Th.		-	+
21	39, m	n.u.	-	N, P	0	n.u.	k.Th.	k.Th.	CE	-	+
1	50, m	n.u.	+	F	mult.	n.u.	(verstorben)		MNHL	-	-
2	42, w	3	-	N	0	n.u.	k.Th.	k.Th.		-	-
5	39, m	81	-	P, F	0	n.u.	k.Th.	k.Th.	HE	-	-
6	38, m	4	+	F, K	0	n.u.	k.Th.	k.Th.		-	-
7	52, m	180	-	P	0	n.u.	k.Th.	k.Th.	HE	-	-
8	47, m	613	-	N, P	0	n.u.	k.Th.	k.Th.	CE	-	-
9	42, m	287	-	N	0	n.u.	k.Th.	k.Th.		-	-
10	42, m	10	-	P, F	0	n.u.	k.Th.	k.Th.	HE	-	-
13	32, w	250	-	N	0	n.u.	k.Th.	k.Th.	PML	-	-
16	30, m	80	-	K	0	n.u.	n.u.	k.Th.	k.Th.	KKM	-
18	50, m	n.u.	-	F	n.u.	neg.	k.Th.	k.Th.		-	-
22	50, m	n.u.	+	P	0	neg.	k.Th.	k.Th.	HE	-	-
23	69, m	90	-	K	0	n.u.	k.Th.	k.Th.	PML	-	-
25	45, m	40	-	N	0	n.u.	(verstorben)			-	-
26	50, m	10	+	N	0	n.u.	k.Th.	k.Th.		-	-
28	37, m	476	-	P, F, K	0	neg.	k.Th.	k.Th.	TBM	-	-

n.u. nicht untersucht

n.b. nicht bekannt

k.Th. keine Toxoplasmose-wirksame Therapie

CCT zerebrale Computertomographie

NMR Kernspintographie (mult.: multifokale Herde; sing.: singulärer Herd; 0: keine Herde)

\* Toxoplasmose-wirksame Chemoprophylaxe zum Zeitpunkt der Liquorgewinnung

\*\* Symptomatik (N: fokalneurologisch; P: psychiatrische Symptomatik; F: Fieber; K: Kopfschmerzen)

\*\*\* Toxoplasmose-Serologie (pos.: IgM-Antikörper; neg.: negativ oder Durchsuchungstiter)

\*\*\*\* andere Diagnosen (MNHL: multifokales Non-Hodgkin-Lymphom; PML: progressive multifokale Leukoenzephalitis; HE: HIV-Enzephalitis;

CE: CMV-Enzephalitis; U: Uveitis; KKM: Kryptokokkenmeningitis; L: ZNS-Lymphom; TBM: tuberkulöse Meningitis)

\*\*\*\*\* Diagnose „zerebrale Toxoplasmose“ (+: gesichert; ++: wahrscheinlich; (+): möglich; -: unwahrscheinlich)

1. gesichert (Nachweis von Toxoplasmen),
2. wahrscheinlich (typischer CT/NMR-Befund mit eindeutigem Ansprechen auf Therapie),
3. möglich (typischer CT/NMR-Befund ohne eindeutiges Ansprechen auf Therapie) und
4. unwahrscheinlich (kein typischer CT/NMR-Befund und/oder Nachweis einer anderen, ursächlichen ZNS-Erkrankung).

### Ergebnisse

Bei der Untersuchung des Liquors wurde ein PCR-Ergebnis beim Vorliegen einer Bande der erwarteten Größe im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel und zusätzlichem Nachweis einer *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle an der erwarteten Position im Amplifikat als „positiv“ eingestuft. Ein „negatives“ Ergebnis lag vor, wenn keine Bande in der Ethidiumbromidfärbung zu sehen war. „Ergebnislos“ wäre eine Untersuchung gewesen, wenn eine Negativkontrolle positiv (Kontaminationsverdacht) oder die Positivkontrolle negativ (methodischer Fehler) gewesen wäre, was jedoch bei keiner der Untersuchungen der Fall war. Als „goldener Standard“ wurde der mikroskopische Nachweis von Toxoplasmen oder ein kultureller Nachweis angesehen.

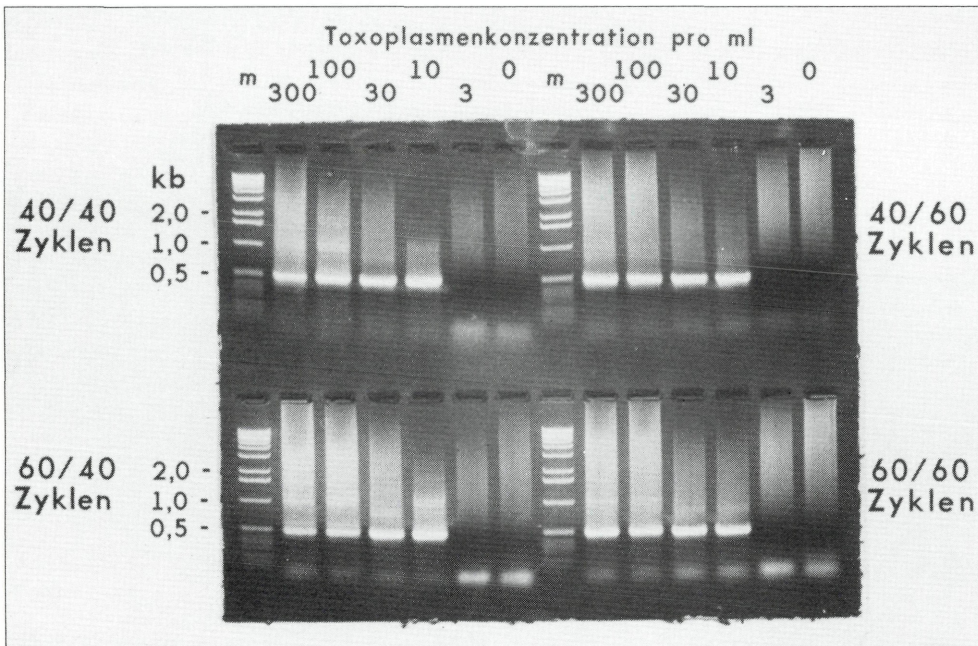


Abbildung 1:

Nachweisgrenzenbestimmung von Toxoplasmen im Blut bei allen 4 Kombinationsmöglichkeiten von 40 und 60 Zyklen für die beiden geschachtelten PCR-Reaktionen. m: DNA-Größenstandard, Produktbände bei 0,5 kb.

war der PCR-Befund positiv (25%). Bei den restlichen 18 Patienten war die Diagnose einer zerebralen Toxoplasmose abschließend als unwahrscheinlich einzustufen. Bei zwei von diesen lag dennoch ein positiver PCR-Befund vor (11%).

## Diskussion

### Sensitivität und Verifizierung der DNA-Amplifikationen

Um eine möglichst große Sensitivität zu erreichen, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Methode der geschachtelten („nested“) PCR gewählt. Gegenüber anderen Methoden der Sensitivitätssteigerung, insbesondere der Hybridisierung mit Sonden, hat die „nested“ PCR den Vorteil, daß keine neuen Methodiken eingeführt werden müssen. Weiterhin wird der Umgang mit radioaktivem Material sowie die Herstellung radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierter Sonden vermieden. Der Vorteil der zusätzlichen Verifizierung des PCR-Produktes durch eine mehr oder weniger „spezifische“ Sonde, wobei jedoch zu beachten ist, daß sich die Spezifität einer Hybridisierung entscheidend mit den jeweiligen Hybridisierungsbedingungen ändern kann und das Beibehalten völlig gleicher Hybridisierungsbedingungen nicht trivial ist, wird bei der hier beschriebenen „nested“ PCR durch die Verifizierungsmöglichkeit mit Hilfe der *EcoRI*-Schnittstelle des Gens B1 egalisiert. Eine weitere Erhöhung der Sensitivität wurde durch die Wahl des 35-fach repetitiven Gens B1 (3) als Zielsequenz erzielt. Pro Genom ist dadurch 35-mal mehr Matrizen-DNA verfügbar als bei der Verwendung eines Einzelkopien-Gens.

Die Primer TOX-5 bis TOX-8 des Zielgens B1 wurden so konstruiert, daß die PCR-Produkte sich einerseits in ihrer Größe deutlich von Primer-Dimeren und -Oligomeren unterscheiden und nach *EcoRI*-Restriktion noch deutlich erkennbare Produkte liefern sollten, andererseits aber nicht so groß sein sollte, daß die Amplifikation selbst schwierig geworden wäre. Es wurde deshalb eine Amplifikatgröße von 0,5 kb gewählt. Die Primer wurden so positioniert, daß der *EcoRI*-Verdau zwei unterschiedlich große, aber auf einem Agarosegel noch deutlich sichtbare Produkte von 0,2 kb und 0,3 kb Länge ergeben würde.

Während des Untersuchungszeitraumes von 17 Monaten wurden 28 Liquorproben untersucht. Davon lieferten 22 ein negatives PCR-Ergebnis, 6 waren positiv. Nur in einem der 28 Fälle (Patient 11) wurde durch eine Gehirnbioptie mit positivem Toxoplasmennachweis ein „goldener Standard“ bestimmt. Bei diesem Patienten war auch das PCR-Ergebnis positiv. Bei weiteren 5 Patienten wurde die Diagnose einer zerebralen Toxoplasmose als wahrscheinlich eingestuft. Bei zwei dieser Patienten war auch die PCR positiv. Somit lag nur bei 3 von 6 Patienten (50%) mit wahrscheinlicher oder gesicherter zerebraler Toxoplasmose ein positives PCR-Ergebnis vor. Bei weiteren 4 Patienten konnte die Diagnose einer zerebralen Toxoplasmose retrospektiv lediglich als möglich eingestuft werden. In einem dieser Fälle

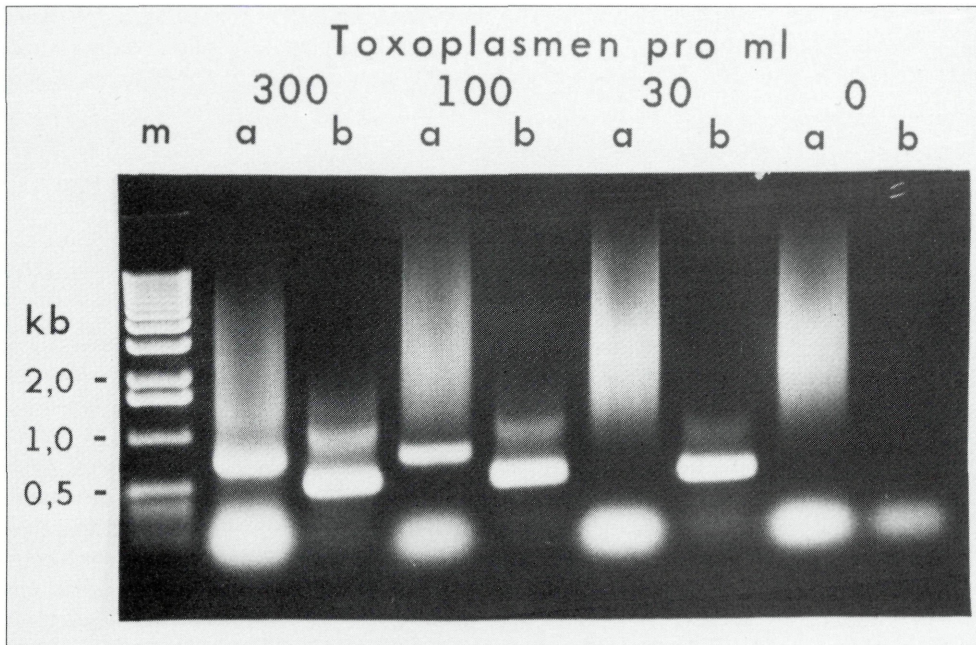


Abbildung 2:

Vergleich der Nachweisgrenzen der Gene P30 und B1 aus Fruchtwasser.

m: DNA-Größenstandard  
a: Zielgen P30  
(Produktbande bei 0,7 kb),  
b: Zielgen B1  
(Produktbande bei 0,5 kb).

#### Validität der PCR-Diagnostik

Insgesamt ergab sich zwar eine deutliche Korrelation zwischen dem Nachweis von *T. gondii*-DNA mittels PCR und der Wahrscheinlichkeit einer zerebralen Toxoplasmose auf der Basis einer retrospektiven Einstufung aufgrund etablierter klinischer Kriterien (5, 19). Jedoch ist die hierbei beobachtete Sensitivität von 50% bei wahrscheinlicher oder gesicherter Erkrankung und die Spezifität von 89% bei Patienten mit als unwahrscheinlich eingestufte Erkrankung für eine Diagnosestellung und Therapieentscheidung im Einzelfall unzureichend. Auch bei den anderen bisher publizierten Studien gelang ein Nachweis von *T. gondii*-DNA mittels PCR aus Liquor nicht bei allen Patienten mit gesicherter oder mit wahrscheinlicher zerebraler Toxoplasmose (6, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19). Es ist daher anzunehmen, daß bei einem Teil der Patienten mit intrazerebralen Entzündungsherden überhaupt keine Toxoplasmen in den Subarachnoidalraum eindringen und daß die diagnostische Sensitivität des Nachweises von *T. gondii*-DNA mittels PCR aus Liquor dadurch grundsätzlich eingeschränkt ist. Andererseits konnte auch in anderen Studien *T. gondii*-DNA mittels PCR im Liquor von AIDS-Patienten nachgewiesen werden, bei denen sich eine zerebrale Toxoplasmose nach den bildgebenden Befunden und dem Verlauf als nicht wahrscheinlich erwies bzw. bei denen sich andere Ursachen der neurologischen Symptomatik ergaben (16). Dies kann dadurch bedingt sein, daß in diesen Fällen zusätzlich zu anderen Infektionen oder Tumoren des ZNS doch eine zerebrale Toxoplasmose vorlag, oder daß einzelne Toxoplasmen im Rahmen einer latenten Infektion oder einer klinisch noch nicht relevanten Reaktivierung im Subarachnoidalraum vorhanden sind. In diese Richtung deuten auch Verlaufsuntersuchungen bei AIDS-Patienten hin, bei denen in Einzelfällen bereits Wochen vor der klinischen Manifestation einer disseminierten oder pulmonalen Toxoplasmose *T. gondii*-DNA im Blut mittels PCR nachgewiesen werden konnte (8).

Die Ergebnisse zeigen, daß der Nachweis von *T. gondii*-DNA mittels PCR aus Liquor als eine zusätzliche diagnostische Information bei der Abklärung des Verdachts einer zerebralen Toxoplasmose eingesetzt werden kann. Da bei einem nicht unwesentlichen Anteil der AIDS-

Die Nachweisgrenze für Toxoplasma-DNA aus Blut, das aufgrund seiner PCR-inhibierenden Bestandteile als besonders „problematisch“ für PCR-Reaktionen angesehen wird, lag bei Verwendung der beschriebenen, geschachtelten PCR mit dem Primern TOX-5/TOX-8 sowie TOX-6/TOX-7 bei 25 Toxoplasmen/ml (Abb. 1). Ein direkter Vergleich der Nachweisgrenze mit einem nur einmal im Genom vorkommenden Zielgen, nämlich dem des Hauptoberflächenantigens P30 (2), ergab für dieses Gen bei Verwendung von Fruchtwasser als biologischem Material eine Nachweisgrenze von 100 Toxoplasmen/ml (17), während bei Verwendung des repetitiven Gens B1 als Zielsequenz der Nachweis bereits bei 30 Toxoplasmen/ml möglich war (Abb.2). Aus Blut liegt die Nachweisgrenze für das Gen P30 zwischen 100 und 300 Toxoplasmen/ml (18).

Patienten mit zerebraler Toxoplasmose keine *T. gondii*-DNA mittels PCR im Liquor nachzuweisen ist, muß die Entscheidung über die Einleitung einer Toxoplasmose-wirksamen Therapie jedoch zusätzlich von den klinischen und bildgebenden Befunden abhängig gemacht werden.

**Zusammenfassung** Die Diagnostik einer zerebralen Toxoplasmose bei Immunkompromittierten ist problematisch, da die Immundiagnostik bei diesen Patienten wenig aussagekräftig ist und der direkte Erregernachweis meist auf invasive Verfahren wie die Hirnbiopsie angewiesen ist. Der Nachweis von *Toxoplasma gondii*-DNA im Liquor mittels PCR wurde hierbei als nichtinvasive diagnostische Methode beschrieben.

Ausgehend von Zielsequenzen des repetitiven B1-Gens von *T. gondii* wurden PCR-Primer konstruiert, die durch eine geschachtelte („nested“) PCR den Nachweis von Toxoplasmen mit einer experimentellen Nachweisgrenze von 10 Organismen in einem Probenvolumen von 300 µl Liquor oder Blut ermöglichen. Mit dieser Methode wurden Liquorproben von 28 AIDS-Patienten untersucht, bei denen der Verdacht auf eine Enzephalitis oder eine andere ZNS-Erkrankung bestand. Die Wahrscheinlichkeit einer zerebralen Toxoplasmose wurde retrospektiv anhand der bildgebenden Befunde, des Ansprechens auf eine spezifische Therapie und des Nachweises anderer ZNS-Erkrankungen beurteilt. Die PCR war positiv bei drei von sechs Patienten (50%) mit gesicherter oder wahrscheinlicher zerebraler Toxoplasmose (davon ein PCR-positiver Patient mit Erregernachweis in der Hirnbiopsie), bei einem von vier Patienten (25%) mit möglicher zerebraler Toxoplasmose und bei 2 von 18 Patienten (11%), bei denen eine zerebrale Toxoplasmose unwahrscheinlich erschien.

Die PCR zum Nachweis von *T. gondii*-DNA im Liquor kann daher als zusätzliche Information bei der Diagnosestellung einer zerebralen Toxoplasmose bei AIDS-Patienten herangezogen werden. Diese Methode ist jedoch nicht in der Lage, eine zerebrale Toxoplasmose definitiv zu bestätigen oder auszuschließen.

**Schlüsselwörter** Toxoplasmose, Diagnostik, geschachtelte PCR.

**Summary** *PCR-based cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients*

The diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS-patients is difficult due to the limited value of immunodiagnostic methods in these patients and to the need of brain biopsy to establish a definitive diagnosis. The detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF by PCR amplification has been suggested as a noninvasive diagnostic procedure.

Based on sequences of the repetitive B1 gene of *T. gondii*, primers have been constructed which enable the detection of toxoplasma with an experimental sensitivity of 10 organisms in a sample volume of 300 µl of CSF or blood. This method was applied to CSF samples of 28 AIDS patients presenting with symptoms of encephalitis or other diseases of the CNS. Suspicion of cerebral toxoplasmosis was determined retrospectively from evidence of brain imaging, response to specific therapy, and detection of other CNS diseases. Positive PCRs were obtained in 3 of 6 patients (50%) with a highly suggestive diagnosis of cerebral toxoplasmosis (including 1 PCR-positive patient with biopsy proven infection), in 1 of 4 patients (25%) with possible cerebral toxoplasmosis, and in 2 of 18 patients (11%) unlikely to have cerebral toxoplasmosis. Therefore, PCR-detection of *T. gondii*-DNA in CSF will provide additional information for the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS-patients. However, this method is not able to definitely confirm or exclude cerebral toxoplasmosis.

**Key words** Toxoplasmosis, diagnostics, nested PCR.

## Literatur

1. BREZIN, A. P., EQWUAGU, C. E., SILVEIRA, C., THULLIEZ, P., MARTINS, M. C., MAHDI, R. M., BELFORT, R., NUSSENBLATT, R. B. (1991):  
Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis.  
*N. Engl. J. Med.* 324, 699.
2. BURG, J. L., PERELMAN, D., KASPER, L. H., WARE, P. L., BOOTHROYD, J. C. (1988):  
Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*.  
*J. Immunol.* 141, 3584-3591.
3. BURG, J. L., GROVER, C. M., POULETTI, 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.
4. CAZENAVE, J., FORESTIER, F., BESSIERES, M. H., BROUSSIN, B., BEGUERET, J. (1992):  
Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis.  
*Prenat. Diagn.* 12, 119-127.
5. CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1987):  
Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrom.  
*MMWR* 36 (suppl 15) 1s-15s
6. CHRISTINA, N., PELLOUX, H., GOULHOT, C., BRION, J. P., LECLERCQ, P., AMBROISE-THOMAS, P. (1993):  
Detection of *Toxoplasma gondii* in AIDS patients by the polymerase chain reaction.  
*Infection* 21, 150-153
7. DESMONTS, G., DAFFOS, F., FORESTIER, F., CAPELLA-PAVLOVSKY, M., THULLIEZ, P., CHARTIER, M. (1985):  
Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis.  
*Lancet* 1985-1, 500-504.
8. DUPOUY-CAMET, J., DE-SOUZA, S. L., MASLO, C., PAUGAM, A., SAIMOT, A. G., BENAROUS, R.,  
TOURTE-SCHAEFER, C., DEROUIN, F. (1993):  
Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction.  
*J. Clin. Microbiol.* 31, 1866-1869
9. 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 specimens.  
*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 33-39.
10. HOLLIMAN, R. E., JOHNSON, J. D., SAVVA, D. (1990):  
Diagnosis of toxoplasmosis in association with AIDS using the polymerase chain reaction.  
*Scand. J. Infect. Dis.* 22, 234-244.
11. HOLLIMAN, R. E. (1991):  
Clinical and diagnostic findings in 20 patients with toxoplasmosis and the acquired immune deficiency  
syndrome.  
*J. Med. Microbiol.* 35, 1-4.
12. LEBECH, M., LEBECH, A. M., NELSING, S., VUUST, J., MATHIESEN, L., PETERSEN, E. (1992):  
Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from AIDS patients  
with cerebral toxoplasmosis.  
*J. Inf. Dis.* 165, 982-983.
13. LUFT, B. J., HAFNER, R. (1990):  
Toxoplasmic encephalitis.  
*AIDS* 4, 593-595.
14. NAVIA, B. A., PETITO, R. E., GOLD, J. W. M., CHO, E. S., JORDAN, B. D., PRICE, R. W. (1986):  
Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immuno-deficiency syndrome: clinical and  
neuropathologic findings in 27 patients.  
*Ann. Neurol.* 19, 224-238.
15. NOVATI, R., CASTAGNA, A., MORSICA, G., VAGO, L., TAMBUSI, G., GHEZZI, S., GERVASONI, C., BISSON, C.,  
D'ARMINIO-MONFORTE, A., LAZZARIN, A. (1994):  
Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal  
brain lesions.  
*AIDS* 8, 1691-1694.
16. OSTERGAARD, 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 disease.  
*Scand. J. Infect. Dis.* 25, 227-237.
17. PARMLEY, S. F., GOEBEL, F. D., REMINGTON, J. S. (1992):  
Detection of *T. gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction.  
*J. Clin. Microbiol.* 30, 3000-3002.

18. RINDER, H. (1995):  
Molekulare Charakterisierung und diagnostischer Einsatz der Gene B1 und P30 von *Toxoplasma gondii*.  
Dissertation, Universität München.
19. SCHOONDERMARK-VAN DE VEN, E., GALAMA, J., KRAAIJEVELD, C., VAN DRUTEN, J., MEUWISSEN, J.,  
MELCHERS, W. (1993):  
Value of the Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Cerebrospinal Fluid from  
Patients with AIDS.  
*Clin. Inf.* 16, 661-666.
20. VAN DE VEN, E., MELCHERS, W., GALAMA, J., CAMPS, W., MEUWISSEN, J. (1991):  
Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification.  
*J. Clin. Microbiol.* 29, 2120-2124.
21. VERHOFSTEDE, C., VAN RENTERGHEM, L., PLUM, J., VANDERSCHUEREN, S., VANHAESEBROUCK, P. (1990):  
Letter to the editor.  
*Lancet* 336, 622-623.
22. WANKE, C., TUAZON, C. U., KOVACS, A., DINA, T., DAVIS, D. O., BARTON, N., KATZ, D., LUNDE, M., LEVY, C.,  
CONLEY, F. K., LANE, H. C., FAUCI, A. S., MASUR, H. (1987):  
*Toxoplasma* encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis and response  
to therapy.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 509-516.
23. WEISS, L. M., UDEM, S. A., SALGO, M., TANOWITZ, H. B., WITTNER, M. (1991):  
Sensitive and specific detection of *toxoplasma* DNA in an experimental murine model:  
use of *T. gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaktion.  
*J. Inf. Dis.* 163, 180-186.

**Korrespondenzadresse:** Dr. rer. nat. Dr. med. Heinz Rinder  
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin  
Universität München  
  
Leopoldstraße 5  
D-80802 München · Bundesrepublik Deutschland



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://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: 1996

Band/Volume: [18](#)

Autor(en)/Author(s): Rinder Heinz, Lieb Monika, Eichenlaub Dieter, Löscher Th.

Artikel/Article: [Erfahrungen mit einer PCR-gestützten Liquoranalytik in der Diagnostik der zerebralen Toxoplasmose bei AIDS-Patienten. 71-78](#)