

Nachweis von *Pneumocystis carinii* im Antigen-ELISA und im konventionellen Immunfluoreszenztest

Detection of *Pneumocystis carinii* with Antigen-ELISA and with Conventional Immunofluorescence Assay

H. Daus, J. Sasse, A. Roth*, H. Radtke, G. Schwarze

I. Medizinische Universitätsklinik, Immunlabor, Homburg-Saar

*Robert-Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Berlin, Fachgebiet Klinische Parasitologie

Zusammenfassung:

Die Validität eines Antigen-ELISA zum Nachweis von *Pneumocystis carinii* in provozierten Sputen und Bronchiallavages wurde mit kommerziellen indirekten Immunfluoreszenztests verglichen. *Pneumocystis carinii* konnte in 42 von 129 induzierten Sputen im indirekten Immunfluoreszenztest und in 47 von 129 Sputen im Antigen-ELISA nachgewiesen werden. In 12 von 13 Bronchiallavages konnte mit beiden Techniken die Diagnose einer *Pneumocystis carinii*-Pneumonie bestätigt werden.

Schlüsselwörter:

Pneumocystis carinii – Antigen-ELISA – Immunfluoreszenztest

Summary:

The validity of antigen-ELISA for detecting *Pneumocystis carinii* in induced sputa and bronchoalveolar lavages was compared to commercial indirect fluorescent-antibody assays. *Pneumocystis carinii* was found in 42 of 129 induced sputa by indirect immunofluorescence assay and in 47 of 129 sputa by ELISA. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia was verified in 12 of 13 bronchoalveolar lavages with both detecting procedures.

Keywords:

Pneumocystis carinii – Antigen-ELISA – immunofluorescence assay

Einleitung

Pneumonien durch *Pneumocystis carinii* (PC) sind eine häufige Infektion bei Patienten im Vollbild AIDS. Für die Prognose und zum Ausschluß anderer Infektionen ist entscheidend, daß die Diagnose PC-Pneumonie möglichst frühzeitig gestellt wird (1, 2).

Der Erreger kann derzeit am sichersten im Material einer bronchoalveolären Lavage oder am Biopsiepräparat nachgewiesen werden (3), während nichtinvasive Verfahren, z. B. die Untersuchung von induziertem Sputum mit konventionellen Färbefahren lediglich eine diagnostische Sensitivität von etwa 50% erreichen (4, 5).

Für die Laboratoriumsdiagnostik ist der Nachweis von PC-Zysten entscheidend. In der Regel wird das Untersuchungsmaterial mit Silbermethenamin nach Grocott oder mit Giemsa-Lösung gefärbt (6). Bei geringer PC-Besiedlung kann der zeitliche Aufwand erheblich sein; zudem besteht die Möglichkeit, Zysten mit Pilzen zu verwechseln. Mit immunzytochemischen Nachweisverfahren konnte die diagnostische Treffsicherheit verbessert werden. Die Überlegenheit von indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT) mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegenüber den konventionellen Färbemethoden wurde inzwischen durch mehrere Untersuchungen bestätigt (7, 8, 9). Da gerade die eingeschränkte Fähigkeit der HIV-Infizierten, Antikörper zu bilden, serologische Tests allgemein schwer interpretierbar macht und speziell der

serologische Nachweis von PC-Antikörpern beim HIV-bedingten Immundefekt nur eine geringe Sensitivität erreicht (10), wurde ein Enzymimmunoassay zum Nachweis von PC-Antigen entwickelt und seine Effizienz mit kommerziellen IIFT's verglichen.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 163 Proben untersucht: 129 induzierte Sputen und 13 bronchoalveoläre Lavages von 48 Patienten mit HIV-Infektion, elf induzierte Sputen von Patienten mit Malignomen unter Polychemotherapie sowie zehn Sputen von gesunden Probanden. Sputum wurde durch Verneblung von 3% NaCl-Lösung (15 min, Devilbiss Ultra-neb 99) provoziert (5, 11); die Verflüssigung der Proben erfolgte durch Zugabe von Dithiothreitol (Sputasol, Oxoid Ltd., England) im Verhältnis 1:1 (15 min, 37°C). Die Lavageproben (20 ml) wurden mit 2500 g 10 min zentrifugiert und das „Pellet“ in 2 ml PBS-Tween 20 0,05% suspendiert.

Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Proben (jeweils 200 µl; Cytospin 800 Upm; 5 min) wurden mit kommerziell erhältlichen IIFT's der Firmen Biosigma (München) und Progen (Heidelberg) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Positiv wurde eine Probe bewertet, wenn mindestens vier apfelgrün fluoreszierende Zysten nachgewiesen werden konnten.

Der Nachweis von PC-Antigen erfolgte nach dem konventionellen „Sandwich“-Prinzip. Die verwendeten polyklonalen anti-PC Antiseren von Kaninchen und Maus hatten einen IF-Titer von 1:640; sie sind überwiegend gegen einen für die Zystenwand spezifischen, hitzestabilen Kohlehydratbestandteil gerichtet, welcher durch Glucanase zerstört wird, und zeigen keine Kreuzreaktion mit *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Toxoplasma gondii* (9).

Im Test wurden 100 µl anti-PC-Antiserum vom Kaninchen (Verdünnung 1:1000, in 0,1 M NaHCO₃, pH 9,4) an Mikrotiterplatten bei 4°C 16 h adsorbiert. Nach Waschen mit PBS-Tween 0,05% wurden die Sputen (je 100 µl; unverdünnt, 1:5 und 1:10 mit PBS-Tween 0,05% verdünnt) 2 h bei 37°C inkubiert, erneut gewaschen und Maus-anti-PC-Antiserum (je 100 µl; 1:1500 in PBS-Tween 0,05%) 2 h bei 37°C zugesetzt. Wiederum nach Waschen erfolgte die Inkubation des peroxidasemarkierten Kaninchen-anti-Maus-IgG (100 µl; Verdünnung 1:1000; 2 h bei 37°C; Dako Diagnostika GmbH, Hamburg). Der Substratumsatz wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄ nach 30 min (20°C) gestoppt.

Ergebnisse

Als „cut of line“ des ELISA's wurde der doppelte Extinktionsmittelwert (E) von 10 Sputen gesunder Probanden gewählt; dieser Wert betrug 0,106. Alle Testansätze wurden als Doppelwertbestimmungen durchgeführt; jede Probe wurde mindestens zweimal untersucht, grenzwertige Ergebnisse mit Extinktionswerten < 0,150 wurden dreimal geprüft. Die Resultate waren gut reproduzierbar, die Abweichung vom Meßwert des ersten Testansatzes betrug maximal 20%. Bei zwei induzierten Sputen von HIV-Patienten ergab sich zunächst eine positive, bei Wiederholung jedoch eine negative Reaktion. Diese Sputen wurden als negativ befundet.

Der PC-ELISA war bei zehn von elf Patienten mit Malignomen unter zytostatischer Therapie negativ, während der IIFT bei allen elf Patienten negativ ausfiel.

Bei 39 der 48 Patienten mit HIV-Infektion bestand eine Erniedrigung der zirkulierenden Helfer-T-Zellen unter den kritischen Wert von 200 CD 4+ Zellen/µl. Alle diese Patienten standen unter einer Inhalationsprophylaxe mit 150 mg Pentamidin in 14tägigen Abständen (12).

Bronchiallavages wurden bei 13 Patienten durchgeführt; dabei konnte in zwölf Fällen sowohl im ELISA als auch im IIFT die klinische Verdachtsdiagnose einer PC-Pneumonie bestätigt werden. Bei dem Patienten mit negativem Resultat wurde eine Pneumokokkenpneumonie nachgewiesen; zwei Monate später wurde eine Lungentuberkulose

diagnostiziert. In den Überständen der vorbehandelten Bronchiallavages ist offensichtlich ausreichend PC-Antigen gelöst; zehn dieser Überstände wiesen Extinktionswerte größer als 0,3 auf.

Die Sputumprovokation erfolgte überwiegend als Verlaufskontrolle unter Pentamidininhalation. An einer manifesten PC-Pneumonie waren 17 Patienten erkrankt. In den Sputumproben von HIV-Patienten gelang der PC-Nachweis 42mal im IIFT und 47mal im ELISA. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse im IIFT sowie im ELISA zusammenfassend dargestellt.

Unerwartet konnte durch wiederholte Untersuchungen bei vier von neun Patienten mit T-Helferzellzahlen über 200/µl eine vorübergehende Kolonisation des Sputums nachgewiesen werden; einer dieser Patienten entwickelte eine klinisch milde verlaufende PC-Pneumonie. Von diesen Sputen waren vier im ELISA und drei im IIFT positiv.

Diskussion

Für die Behandlung immundefizienter Patienten mit PC-verdächtigen Lungeninfiltraten ist ein zuverlässiges, nichtinvasives Verfahren zur Diagnosesicherung notwendig, da die Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage oder die Lungenbiopsie (derzeit diagnostischer Standard) mit möglichen Komplikationen, eingeschränkter Patientenakzeptanz und höheren Kosten verbunden sind.

Etablierten Färbeverfahren, wie die Grocott- oder Giemsa-Färbung, haben sich als nicht sensitiv erwiesen; zudem besteht die Möglichkeit der Verwechslung des Erregers mit Pilzen. Auch den immunfluoreszenzoptischen Verfahren mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern sind sie unterlegen (7, 9). Da bei unseren Untersuchungen die Toluidinblau- und Silberfärbung in einem Teil der Fälle im Vergleich zu den leichter interpretierbaren IIFT's negativ ausfielen (nur 55,1% der IIFT-positiven Sputen waren auch in der Grocott-Färbung positiv), wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen lediglich die Ergebnisse des IIFT's als Standard zugrunde gelegt. Bei Festlegung der doppelten Extinktionswerte von Sputen gesunder Probanden als „cut of line“ erwies sich der leicht durchführbare „Sandwich-ELISA“ ähnlich sensitiv wie die kommerziellen IIFT's. Vorteile des ELISA's sind der Kostenfaktor und die Automatisierbarkeit zur Bewältigung von großen Probenzahlen, während die Möglichkeit unspezifischer bzw. grenzwertiger Resultate als Nachteile zu werten sind. Diese können im IIFT durch Darstellung der Zysten im Phasenkontrast oder durch Gegenfärbung mit Evansblau vermieden werden (Unterdrückung einer möglichen unspezifischen Eigenfluoreszenz der Probe).

Problematisch erwies sich auch die Tatsache, daß falsch positive Ergebnisse nur nach vollständiger Lyse der Sputen mit Sicherheit ausgeschlossen werden können. Durch unsere wiederholte Untersuchung von Risikopatienten haben wir auch die Erfahrung gemacht, daß die Grenzen zwischen Kolonisation und manifester Pneumozytose fließend sind; die Höhe der Extinktionswerte korrelierte nicht mit der klinischen Symptomatik. Lediglich bei Extinktionswerten > 1,0 der unverdünnten Sputen bestand eine manifeste Pneumonie. Hieraus ergibt sich die Frage, wie sinnvoll eine hohe diagnostische Sensitivität (d. h. wenige Zysten in der IIFT und grenzwertige Extinktionen im ELISA bei Verlust klinischer Relevanz) neuer Verfahren ist. Dies dürfte in noch höherem Maße für den in letzter Zeit beschriebenen PC-Nachweis durch DNS-Amplifizierung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion zutreffen (13).

Tab. 1: Häufigkeit des Nachweises von *Pneumocystis carinii* im provozierten Sputum von HIV-Patienten mit Hilfe des IIFT und des Antigen ELISA

Sputumprovokationen pro Patient	Patienten	positiver Nachweis	
		IIFT/ Probenzahl	ELISA/ Probenzahl
1	19	8/19	9/19
2	8	6/16	7/16
3	10	12/30	13/30
4	1	2/4	2/4
5	4	3/20	2/20
6	4	6/24	7/24
7	2	5/14	7/14
	48	42/129	47/129

Schrifttum:

1. PHAIR, J., MUNOZ, A., DETELS, R., KASLOW, R., RINALDO, C., SAAH, A., and MULTI-CENTER AIDS COHORT STUDY GROUP: The risk of Pneumocystis carinii pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus typ 1. N. Engl. J. Med. 322, 161-165 (1990).
2. LEIBOVITZ, E., RIGAND, M., POLLACK, H., LAWRENCE, R., CHANDWANI, S., KRASINSKI, K., BORKOWSKY, W.: Pneumocystis carinii pneumonia in infants infected with the human immuno-deficiency virus with more than 450 CD 4 T-lymphocytes per cubic millimeter. N. Engl. J. Med. 323, 531-533 (1990).
3. MILLER, R. T., LEIGH, T. R., COLLINS, J. V., MITCHELL, D. M.: Tests giving an aetiological diagnosis in pulmonary disease in patients infected with the human immunodeficiency virus. AIDS and the lung. Thorax 45, 62-65 (1990).
4. PITCHENIK, A. E., GANGEI, R., TORRES, A., EVANS, D. A., RUBIN, E., BAIER, H.: Sputum examination for the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in the aquired immunodeficiency syndrome. Am. Rev. Resp. Dis. 133, 326-329 (1986).
5. BIGBY, T. D., MARGOLSKEE, D., CURTIS, J. L., MICHAEL, P. F., SHEPPARD, J., HADLEY, W. K., HOPEWELL, P. C.: The usefulness of induced sputum in the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with the aquired immunodeficiency syndrome. Am. Rev. Resp. Dis. 133, 515-518 (1986).
6. SAVOIA, D., CARAMELLO, P.: The microscopic identification of Pneumocystis carinii. J. Protozool 36, 72-74 (1989).
7. KOVACS, J. A., NG, V. L. H., et al.: Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. N. Engl. J. Med. 318, 589-593 (1988).
8. BAUGHMANN, R. P., STROHOFER, S. S., CLINTON, B. A., NICKOL, A. D., FRAME, P. T.: The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting Pneumocystis carinii. Arch. Pathol. Lab.med. 113, 1062-1065 (1989).
9. ROTH, A., JANITSCHKE, K., WERNER, H.: Direktnachweis von Pneumocystis carinii mittels eines Immunfluoreszenztestes im Vergleich zu konventionellen Färbemethoden. Lab.med. 14, 239-242 (1990).
10. CHATTERTON, J. M., JOSS, A. W., WILLIAMS, H.: Pneumocystis carinii antibody testing. J. Clin. Pathol. 42, 865-868 (1989).
11. LEIGH, T. R., PARSON, P., HUME, C., HUSAIN, O. P. A. N., COLLINS, J. V.: Sputum induction as a reliable method of diagnosing Pneumocystis carinii pneumonia in AIDS patients (abstract). Thorax 44, 318 (1989).
12. MASUR, H., OGNIBENE, F. P., YARCHOAN, R. Y.: CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann. Intern. Med. 111, 223-231 (1989).
13. WAKEFIELD, A. E., PIXLEY, F. J., BANERJI, S., SINCLAIR, K., MILLER, R. F., MOXON, E. R., HOPKIN, J. M.: Detection of Pneumocystis carinii with DNA amplification. Lancet 336, 451-453 (1990).

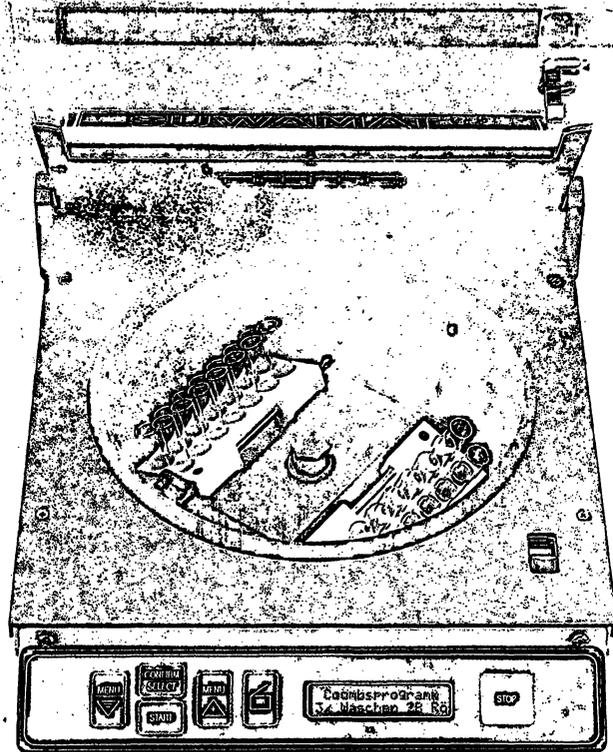
Anschrift für die Verfasser:

PD Dr. H. Daus
I. Medizinische Universitätsklinik
6650 Homburg

Innovation made in Germany

SUWAMAT 3

Semi-automatischer Zellwascher



- Spitzenleistung: 260 Proben/h
- Flexibilität in der Routine
- Mikroprozessor-unterstützte Steuerung und Überwachung der Arbeitsabläufe
- Hochwertige Bauteile garantieren Zuverlässigkeit und Langlebigkeit
- Automatisches Reinigungssystem

Das Spitzenmodell

aus der erfolgreichen SUWAMAT Reihe
vom Marktführer für Blutbankdiagnostika



Ortho Diagnostic Systems GmbH

DR. MOLTER GMBH

Karl-Landsteiner-Str. 1 · D-6903 Neckargemünd · ☎ (06223) 77-0