

# Vergleich zwischen mikroskopischen Methoden und Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeiten

Comparison of Microscopic Methods and Polymerase Chain Reaction to Detect *Pneumocystis carinii* in Bronchoalveolar Lavage Fluids

P.-M. Rath<sup>1,2</sup>, E. N. Schmid<sup>1</sup>, R. Ansorg<sup>1</sup>

**Zusammenfassung:** Zum Nachweis von *Pneumocystis carinii* wurden 67 bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeiten von 50 Patienten mit der Methenamin-Silbernitrat-Färbung (MSN), der Toluidinblau O-Färbung (TBO), einem direkten Immunfluoreszenz-Assay (DIF) und einem Sandwich-Immunfluoreszenz-Assay (sandwich-IF) untersucht. Zusätzlich wurde eine PCR mit anschließender Oligoblot-Hybridisierung durchgeführt. Zweiundzwanzig Materialien (21 Patienten) wiesen in der PCR positive Befunde auf. Bei zehn dieser Materialien (9 Patienten) ließen sich in MSN-, TBO-Färbung und sandwich-IF *Pneumocystis carinii*-Zysten nachweisen. In einem Fall mit positivem PCR-Ergebnis waren nur im sandwich-IF Zysten in geringer Konzentration nachweisbar. Der DIF ergab bei acht Materialien positive Resultate. Bei den elf Patienten mit positivem PCR-Resultat, aber negativem mikroskopischen Ergebnis bestand klinisch kein Verdacht auf eine *Pneumocystis carinii*-Pneumonie. Die Daten zeigen, daß die einfache und schnelle Toluidinblau O-Färbung der aufwendigen MSN-Färbung gleichwertig ist. Der sandwich-IF ist dem DIF deutlich überlegen. Die PCR liefert für den Nachweis einer akuten Erkrankung keine zusätzlichen Informationen.

**Schlüsselwörter:** Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit/Mikrobiologie; *Pneumocystis carinii*; Silberfärbung; Toluidinblau; Immunfluoreszenztechnik; Polymerasekettenreaktion/Methodik; Sensitivität und Spezifität.

**Summary:** For the laboratory diagnosis of *Pneumocystis carinii*-pneumonia, the usefulness of methenaminesilver nitrate (MSN)-, toluidin blue O (TBO)-stain and two immunofluorescence assays (one direct (DIF) and one indirect (sandwich-IF) assay) were compared with results of a PCR followed by oligoblot-

hybridization. Bronchoalveolar lavage fluids (n = 67) obtained from 50 patients were investigated. In 22 samples (21 patients) *Pneumocystis carinii*-DNA was detected by PCR. Ten of these samples showed positive results in MSN- and TBO-stain, as well as in the sandwich-IF. In one PCR-positive sample *Pneumocystis* cysts were seen by the sandwich-IF only. The DIF detected cysts and trophozoites in eight samples. *Pneumocystis carinii* infection was clinically not suspected in the 11 patients with positive PCR but negative microscopic results. It is concluded that the simple and rapid TBO-stain is equivalent to the labour-intensive MSN-stain. The sandwich-IF was superior to the DIF. The PCR gave no further information for the diagnosis of an acute infection.

**Keywords:** Bronchoalveolar Lavage Fluid/microbiology; *Pneumocystis carinii*; Silver Staining; Tolonium Chloride; Fluorescent Antibody Technique; Polymerase Chain Reaction/methods; Sensitivity and Specificity.

*Pneumocystis carinii* ist ein opportunistischer Erreger, der bei Patienten mit iatrogener oder nicht-iatrogener Immunsuppression zu manifesten Infektionen, insbesondere Pneumonien, führt [1,2]. Während bei HIV-infizierten Patienten in etwa 80% der Fälle der mikroskopische Erregernachweis in induziertem Sputum geführt werden kann, sind bei anderen immunsupprimierten Patienten zur Diagnose Materialien notwendig, die per Bronchoskopie oder Biopsie gewonnen werden [2]. Als geeignetes Material gilt die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit [1,3].

Zahlreiche Färbeverfahren sind für den Nachweis beschrieben worden. Mit der Giemsa-Färbung lassen sich alle Entwicklungsstadien nachweisen; sie ist aber nicht selektiv, so daß die Identifizierung Schwierigkeiten bereiten kann [1]. Selektive Verfahren sind die Färbungen mit Methenamin-Silbernitrat (MSN) oder Toluidinblau O (TBO), die Zysten des Erregers darstellen. Verfahren, die auf fluoreszeinmarkierten mono- oder polyklonalen Antikörpern gegen *Pneumocys-*

<sup>1</sup> Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität-GH Essen

<sup>2</sup> Korrespondenzadresse: Dr. med. Peter-Michael Rath, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität-GH Essen, Hufelandstraße 55, D-45147 Essen. Fax: +49-201-723-3534

Eingegangen: 15. April 1996 / Angenommen: 19. Juli 1996

*stis carinii*-Zysten oder -Trophozoiten basieren, wird im Vergleich zu konventionellen Färbeverfahren eine verbesserte Sensitivität zugeschrieben [4-7]. Die PCR mit nachfolgender Oligoblot-Hybridisierung oder die nested PCR erwies sich als sensitiver als selektive oder nicht-selektive Färbeverfahren [3,5,8-16]. Allerdings wurden in Vergleichsstudien meist Materialien von Patienten mit HIV-Infektion verwendet [8-16], die im Vergleich zu anderen immunsupprimierten Patienten eine hohe Erregerkonzentration haben [2].

In der vorliegenden Studie wurde deshalb die Aussagekraft von zwei konventionellen Färbeverfahren (MSN- und TBO-Färbung), zwei Immunfluoreszenz-Verfahren und der PCR unter Verwendung von bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeiten (BALF) eines nicht selektierten Patientenkollektives geprüft.

## Material und Methoden

### Patienten

Im Zeitraum von Juni 1995 bis Januar 1996 wurden bei 50 Patienten (31 männlich, 19 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 43 Jahren (1-72 Jahre) 67 bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeiten (BALF) zur Abklärung einer pulmonalen Infektion gewonnen. Zwölf Patienten waren HIV-infiziert, bei acht Patienten lag als Grunderkrankung eine Leukämie vor, bei zehn Patienten war eine Knochenmarktransplantation durchgeführt worden, bei 20 Patienten bestanden andere Grunderkrankungen (offene Lungentuberkulose, Lungenfibrose, Glomerulonephritis, Tumorerkrankungen, Zustand nach Organtransplantation). Bei sechs Patienten bestand vor Materialabnahme klinisch der Verdacht auf eine *Pneumocystis carinii*-Infektion.

### Mikroskopische Verfahren

Zwei bis fünf ml BALF wurden für 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und das Sediment in ca. 500 µl Originalflüssigkeit suspendiert. Pro Präparat wurden 25 µl Suspension auf Objektträger aufgetragen, luftgetrocknet und 10 Minuten in Methanol fixiert. Für die Methenamin-Silbernitrat-Färbung (MSN) wurde ein Präparat verwendet, für die Toluidinblau O (TBO)- und die zwei Immunfluoreszenz-Färbungen je zwei. Die Auswertung der MSN- und TBO-gefärbten Präparate erfolgte mit einem Orthoplan-Mikroskop (Leitz, Wetzlar) bei 1000facher Vergrößerung. Die Mindestzeit der mikroskopischen Untersuchung betrug 15 Minuten pro Präparat. Die Fotodokumentation erfolgte mit einem Kodak T 64-Dia-Film.

**Nicht standardisierte Abkürzungen:** BALF, bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit; bp, base pairs; DIF, direkter Immunfluoreszenz-Assay; HIV, human immunodeficiency virus; IF, Immunfluoreszenz-Assay; MSN, Methenamin-Silbernitrat-Färbung; NBT, nitroblau tetrazolium; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, standard sodium citrate; TBO, Toluidinblau O-Färbung.

Die Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Zeiss-Axioskop (490 nm Erregerfilter, 520 nm Sperrfilter) mit Plan-Neofluar-Objektiven (40- und 100fache Vergrößerung) und einer Mikroskopierzeit von mindestens 10 Minuten pro Präparat mikroskopiert. Die Fotodokumentation erfolgte mit einem 400 ASA Dia-Film (Kodak) bei 630facher Vergrößerung. Die Auswertung der einzelnen Färbungen und der PCR-Resultate erfolgte ohne Kenntnis der Ergebnisse der anderen Verfahren. Bei diskrepanten Befunden wurden die Präparate nochmals untersucht.

**Methenamin-Silbernitrat-Färbung** (MSN, modifiziert nach Hendrickson und Krenz [17]): 10 Minuten Chrom (IV)-oxid 10%; Abspülen mit Leitungswasser; 1 Minute Natriumdisulfid 1%; Abspülen mit Aqua dest.; 30 Minuten bei 60 °C (Wasserbad) Methenamin-Silbernitrat-Lösung (40 ml Hexamethylentetramin 3%, 4 ml Silbernitrat 5%, 6 ml di-Natriumtetraborat wasserfrei 5%, 34 ml Aqua dest.); Abspülen mit Aqua dest.; 30 Sekunden Tetrachlorgold (III)-säure-Trihydrat 1%; Abspülen mit Aqua dest.; 1 Minute Natriumthiosulfat 1%; Abspülen mit Leitungswasser; 1 Minute Lichtgrün S.F. (0,2% in 0,2% Essigsäure); Abspülen mit Aqua dest. Jeder Färbeschritt wurde in separaten Färbeküvetten durchgeführt. Außer Chrom (IV)-oxid (Aldrich, Steinheim) und Lichtgrün S.F. (Riedel-de Haën, Seelze) wurden alle Substanzen von E. Merck (Darmstadt) bezogen. Abweichend von der Originalanweisung (17) wurde die Methenamin-Silbernitrat-Färbung für 30 Minuten bei 60 °C im Wasserbad durchgeführt, statt für zweimal 35 Sekunden im Mikrowellenofen, da die Qualität der Färbung dadurch reproduzierbarer wurde. Der Goldchlorid-Schritt wurde von 10 Sekunden auf 30 Sekunden ausgedehnt.

**Toluidinblau O-Färbung (TBO)** [17]. 10 Minuten Säurebehandlung der Präparate (45 ml Eisessig, 15 ml konzentrierte Schwefelsäure); 5 Minuten Spülen unter fließendem Leitungswasser in Färbeküvette; 3 Minuten Färben in Toluidinblau O (0,3 g Toluidinblau O in 60 ml Aqua dest., 2 ml konzentrierte Salzsäure, 140 ml Ethanol 95%); kurz eintauchen in Ethanol 95%. Die Säuremischung wurde wöchentlich (unter Wasserkühlung) neu angesetzt, der Deckel der Färbeküvette wurde mit Vaseline abgedichtet. Während der Säurebehandlung wurde die Lösung zwei- bis dreimal mit einem Glasstab umgerührt.

**Direkter Immunfluoreszenz-Assay (DIF).** Der *Pneumocystis carinii*-Antigen IFT (Medac, Hamburg) ist ein 1-Schritt Immunfluoreszenz-Direktnachweis mit einem Gemisch aus monoklonalen Antikörpern gegen Trophozoiten und Zysten. Nach Angaben des Herstellers ist eine enzymatische Vorbehandlung nicht erforderlich, da ein Enzym dem Antikörperreagenz bereits zugesetzt ist. Methanolfixierte Proben auf Masken-Objektträgern wurden mit Antikörperlösung (25 µl) überschichtet und für 30 Minuten bei 37 °C in

einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschrift (1 Minute PBS, pH 7,4), kurzem Eintauchen in Aqua dest. und Trocknung der Objektträger wurde das im Test-Kit enthaltene Eindeckungsmedium hinzugegeben, ein Deckglas aufgelegt und sofort mit 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert. Jede fluoreszierende rund-ovale Struktur von typischer Größe oder Trophozoiten-Ansammlungen wurden bewertet. Positivkontrollen (Sanofi, Diagnostics Pasteur, Freiburg) wurden mitgeführt.

**Sandwich-Immunfluoreszenz-Assay (sandwich-IF).** Der Monofluo Kit *Pneumocystis carinii* (Sanofi, Diagnostics Pasteur) ist ein indirekter Immunfluoreszenz-Test mit einem monoklonalen Antikörper (Maus), der spezifisch mit *Pneumocystis carinii*-Zysten reagiert. Zum Nachweis einer Bindung wird ein fluoresceinisothiocyanat-markierter Antikörper gegen den monoklonalen Antikörper eingesetzt. Der immunologischen Reaktion ist eine Enzymbehandlung vorgeschaltet. Die fixierten Präparate wurden mit 20 µl rekonstituierter Enzymlösung für exakt 30 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Aqua dest. wurden die Objektträger getrocknet und mit 20 µl Anti-*Pneumocystis carinii*-Antikörper für 15 Minuten inkubiert. Nach kurzem Waschen (PBS, pH 7,4) der Objektträger und anschließender Trocknung wurden 20 µl FITC-markierte Anti-Maus-Antikörper-Lösung auf die Objektträger gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei 37 °C durchgeführt. Nach kurzem Waschen und Trocknen wurden die Präparate mit im Testkit enthaltenem Eindeckmittel eingedeckt und mit 1000facher Vergrößerung sofort mikroskopiert. Nach Angaben des Herstellers ist der Nachweis von ein bis fünf Zysten pro Präparat als fraglich zu interpretieren. Wenn fünf oder mehr Zysten nachweisbar sind, ist das Präparat positiv. Positivkontrollen (Sanofi, Diagnostics Pasteur) wurden mitgeführt.

#### Polymerase chain reaction (PCR)

**Nukleinsäure-Präparation.** Zwei bis fünf ml BALF wurden 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und das Sediment in 2 ml PBS (pH 7,2) suspendiert. Der Suspension wurden 10 µl 1 mol/l Dithiothreitol (Serva, Heidelberg) und 2 ml Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37 °C wurde die Suspension 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und das Sediment zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in 500 µl TE-Puffer (10 mmol/l Tris-Cl, pH 7,5, 1 mmol/l EDTA) suspendiert und mit 250 U/ml Lyticase (Sigma, Deisenhofen) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl SDS (10%) und 1 mg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim) hinzugegeben und die Suspension eine Stunde bei 56 °C inkubiert. Die Probe wurde fünf Minuten gekocht und anschließend die DNA durch zweimalige Phenol-Chloroform-Extraktion (Roti-Phenol, Carl Roth, Karlsruhe) isoliert. Zu der wässrigen Phase wurden 0,2

Vol 10 mol/l Amoniumacetat und 2 Volumen Ethanol 95% hinzugegeben und die Nukleinsäuren über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Suspension 10 Minuten bei 14000 g zentrifugiert, das Sediment einmal mit 500 µl Ethanol 70% gewaschen und für 15 Minuten bei 37 °C getrocknet. Das Sediment wurde in 100 µl TE-Puffer suspendiert und bei -20 °C gelagert. Bei jedem Präparationslauf wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt, deren Verarbeitung sich nicht von der der Proben unterschied.

**Amplifikation.** Die für die PCR verwendeten Primer pAZ 102-E (5' - GAT GGCTGTTTCCAAGCCCCA - 3') und pAZ102-H (5' - GTGTACGTTGCAAA GTACTC - 3') amplifizieren ein 346 bp-Segment aus dem Gen, das die große Subeinheit von ribosomaler RNA von Mitochondrien kodiert [16]. Der Reaktionsansatz bestand aus dem Mastermixpuffer (50 mmol/l KCl; 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 10 mmol/l Tris-Cl, pH 8,8), 200 µmol/l dATP, dCTP, dGTP, dTP (Biozym), 0,5 µl von jedem Primer (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und 2,5 U Taq DNA Polymerase (Promega, USA) in einem Gesamtvolumen von 48 µl. Dieser Mastermix wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Durch das Öl hindurch wurden 2 µl Probe gegeben. Die Amplifikation wurde auf einem Minicycler (MJ Research, USA) durchgeführt. Nach einem Startzyklus (5 Minuten 94 °C, 1,5 Minuten 55 °C, 2 Minuten 72 °C) folgten 35 Amplifikationszyklen (1 Minute 94 °C, 1,5 Minuten 55 °C, 2 Minuten 72 °C) mit einem abschließenden Schritt für 10 Minuten bei 72 °C. Die Proben wurden bis zur Elektrophorese für maximal 18 h bei 4 °C gelagert.

**Elektrophorese.** Zehn µl der Amplifikate wurden auf ein 1,5% Agarose NA-Gel (Pharmacia) aufgetragen und für zwei bis drei Stunden bei 40-50 V in TAE-Puffer (40 mmol/l Trisacetat, 2 mmol/l EDTA, pH 7,8), der 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Boehringer Mannheim) enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurde der digoxigeninmarkierte Molekulargewichtsmarker VIII (Boehringer Mannheim) mitgeführt. Als positiv galt eine Bande im Bereich von 346 bp. Die Gele wurden unter UV-Licht photographiert. Bei jedem Lauf wurde als Positivkontrolle Material eines Patienten mit mikroskopisch und klinisch gesicherter *Pneumocystis carinii*-Infektion mitgeführt.

**Oligoblot-Hybridisierung und Detektion.** Die Hybridisierung wurde mit dem von Wakefield et al. [16] beschriebenen *Pneumocystis carinii*-spezifischem Oligonukleotid pAZ102-L2 (5' - ATAAGGTAGATAGT CGAAAG - 3') mit 5' Digoxigeninierung (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die Gele wurden für je 20 Minuten in Denaturierungspuffer (1,5 mol/l NaCl, 0,5 mol/l NaOH, pH 13,5) und Renaturierungspuffer (1 mol/l Tris-Cl, 1,5 mol/l NaCl, pH 7,4) inkubiert. Anschließend wurde der Transfer auf Nitrocellulose-Membranen mit einer Porenweite von 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel) für zwei Stunden in

20fachem SSC (3 mol/l NaCl, 0,3 mol/l Natriumcitrat, pH 7,0) durchgeführt [18]. Die DNA wurde auf der Membran durch UV-Bestrahlung immobilisiert. Zur Hybridisierung und Detektion wurde das DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Nach einem Prähybridisierungsschritt in Hybridisierungspuffer (5x SSC, 1% Blocking-Reagenz, 0,1% N-Lauroylsarkosin, 0,02% SDS) für eine Stunde bei 37 °C wurde die Hybridisierung über Nacht bei 37 °C mit ca. 50 µg/ml digoxigeninmarkierter Sonde in Hybridisierungspuffer durchgeführt. Die Membranen wurden anschließend zweimal je fünf Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer A (2x SSC, 0,1% SDS) und zweimal 15 Minuten bei 37 °C in Waschpuffer B (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern (markiert mit alkalischer Phosphatase) in einer Konzentration von 150 U/ml für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Puffer 2 (Puffer 1 [0,1 mol/l Maleinsäure, 0,15 mol/l NaCl, pH 7,5] + 1% Blockingreagenz). Nach einem Waschschrift von zweimal 15 Minuten in Puffer 1 und einem zweiminütigen Äquibrierungsschritt in Puffer 3 (0,1 mol/l Tris-Cl, pH 9,5, 0,1 mol/l NaCl, 50 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) wurde die Membran in der Entwicklungslösung (45 µl NBT-Lösung und 35 µl X-Phosphat je 10 ml Puffer 3) inkubiert. Die Reaktion wurde nach ca. 2 Stunden Inkubation bei 37 °C gestoppt. In Kontroll-experimenten mit Titration der amplifizierten Positivkontrolle ergab die Hybridisierung im Vergleich zur Gelelektrophorese eine ca. 50fach höhere Sensitivität. Positiv- und Negativkontrollen wurden in jedem Lauf mitgeführt. Jede Probe wurde mindestens zweimal untersucht. Jede nachweisbare Bande bei 346 bp galt als positiv. Die Präparation der Proben, das Ansetzen der PCR und die Amplifikation/Detektion wurden in strikter räumlicher Trennung durchgeführt. Für alle Schritte wurden Pipettenspitzen mit Filtern verwendet. Alle wiederverwendbaren Materialien einschließlich der Pipetten wurden nach jedem Lauf in Natriumhypochlorit-Lösung (0,5%) dekontaminiert.

## Ergebnisse

Die PCR mit Oligoblot-Hybridisierung war das Verfahren mit der höchsten Rate positiver Befunde. Zweiundzwanzig (33%) von 67 BALF-Proben wiesen nach Hybridisierung eine Bande bei 346 bp auf (Tabelle 1). Von diesen 22 Proben (21 Patienten) zeigten 16 Proben bereits in der Gelelektrophorese ein Amplifikationsprodukt im entsprechenden Molekulargewichtsbereich. Lediglich bei zehn Proben (9 Patienten) mit positivem PCR-Ergebnis waren in MSN- und TBO-Färbung sowie im sandwich-IF *Pneumocystis*-Zysten nachweisbar. Bei acht BALF-Proben waren im DIF *Pneumocystis*-Zysten und Trophozoiten nachweisbar (Tabelle 1).

Die MSN- und TBO-Färbung wiesen eine gleiche Empfindlichkeit zum Nachweis von *Pneumocystis*-Zysten auf. Die Mikroskopierzeit von 15 Minuten pro Präparat bis zur abschließenden Beurteilung konnte nicht unterschritten werden. Allerdings unterschieden sich beide Färbungen im Zeitaufwand (etwa 60 Minuten bei der MSN- und 20 Minuten bei der TBO-Färbung) und in der Anzahl der Färbeschritte (sechs Färbeschritte bei der MSN-Färbung, drei Färbeschritte bei der TBO-Färbung). Die Beurteilung der TBO-Färbung war einfacher als bei der MSN-Färbung, da durch den vorangehenden Säureschritt bei der TBO-Färbung weniger störende zelluläre Artefakte vorhanden waren. Typische mikroskopische Bilder sind in Abbildung 1 und 2 wiedergegeben.

Von den beiden Immunfluoreszenz-Verfahren erwies sich der sandwich-IF als das sensitivere Verfahren. In den zehn Materialien, die auch in der MSN- und der TBO-Färbung positiv waren, ließen sich mit dem sandwich-IF *Pneumocystis*-Zysten nachweisen. Durch die brillante Fluoreszenz der Zysten bei geringer Hintergrundfluoreszenz war die Identifizierung einfach (Abbildung 3). Die Präparate konnten bereits bei einer Vergrößerung von 400 sicher beurteilt werden. Die Mikroskopierzeit konnte beim sandwich-IF auf 5 Minuten pro Präparat reduziert werden. In ei-

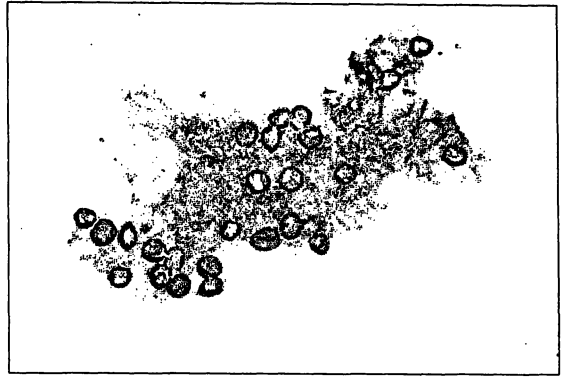
**Tabelle 1** Mikroskopische und molekularbiologische Nachweisrate von *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit

| Anzahl der Patienten | Klinischer Verdacht auf PcP | Anzahl der BALF | Anzahl positiver BALF |     |     |      |     |      |
|----------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|-----|-----|------|-----|------|
|                      |                             |                 | Mikroskopie           |     |     |      | PCR |      |
|                      |                             |                 | MSN                   | TBO | DIF | s-IF | Gel | Hyb. |
| 9                    | ja                          | 10              | 10                    | 10  | 8   | 10   | 10  | 10   |
| 1                    | nein                        | 1               | -                     | -   | -   | 1*   | 1   | 1    |
| 5                    | nein                        | 8               | -                     | -   | -   | -    | 5   | 5    |
| 6                    | nein                        | 12              | -                     | -   | -   | -    | -   | 6    |
| 29                   | nein                        | 36              | -                     | -   | -   | -    | -   | -    |
| 50                   |                             | 67              | 10                    | 10  | 8   | 11   | 16  | 22   |

\* Fraglich positiver Befund mit Nachweis von vier *Pneumocystis*-Zysten; – kein Nachweis von *Pneumocystis carinii*; PcP: *Pneumocystis carinii*-Pneumonie; BALF: bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit; MSN: Methenamin-Silbernitrat-Färbung; TBO: Toluidinblau O-Färbung; DIF: direkter Immunfluoreszenz-Assay; s-IF: sandwich-Immunfluoreszenz-Assay; PCR: polymerase chain reaction; Gel: Gelelektrophorese; Hyb.: Oligoblot-Hybridisierung.



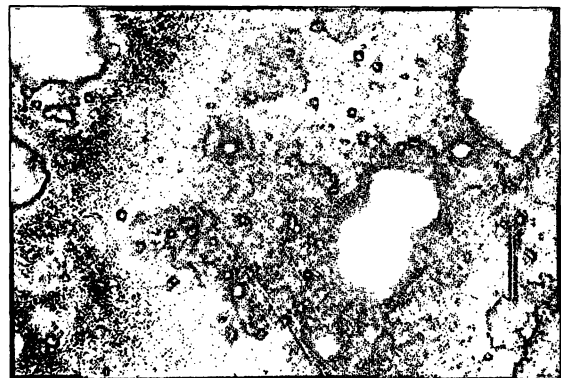
**Abbildung 1** *Pneumocystis carinii*-Zysten (Methenamin-Silbernitrat-Färbung) Vergrößerung x 1000



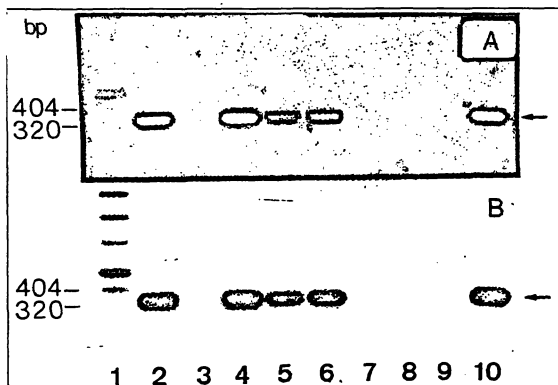
**Abbildung 2** *Pneumocystis carinii*-Zysten (Toluidinblau O-Färbung) Vergrößerung x 1000



**Abbildung 3** *Pneumocystis carinii*-Zysten (sandwich-Immunfluoreszenz-Assay) Vergrößerung x 630



**Abbildung 4** *Pneumocystis carinii*-Zysten und -Trophozoiten (Direkter Immunfluoreszenz-Assay) Vergrößerung x 630



**Abbildung 5** PCR zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-DNA in sieben BAL-Flüssigkeiten. A: Gelelektrophorese, gefärbt mit Ethidiumbromid, B: Gleiche Proben nach Oligoblot-Hybridisierung, 1: Marker, 2: Positivkontrolle, 3: Negativkontrolle, 4-10: BALF-Proben von sieben Patienten. Das spezifische Amplifikationsprodukt (346 bp) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Bei den Proben 4,5,6 und 10 konnte mikroskopisch *Pneumocystis carinii* nachgewiesen werden. Bei Probe 8 konnte mikroskopisch kein Erreger nachgewiesen werden; bei negativem Resultat nach Gelelektrophorese trat bei Oligoblot-Hybridisierung das Amplifikationsprodukt als zarte Bande in Erscheinung.

nem Material zeigte der sandwich-IF ein fraglich positives Resultat (vier Zysten) bei negativem Ergebnis in den übrigen Färbungen.

Hingegen waren nur acht der zehn Materialien mit mikroskopischem Erregernachweis in den anderen Verfahren auch im DIF positiv. Die Beurteilung wurde durch die schwache Fluoreszenz der Zysten und einer starken Hintergrundfluoreszenz erschwert (Abbildung 4). Der Nachweis von Trophozoiten erbrachte keine Vereinfachung in der Interpretation. Drei MSN-, TBO- und sandwich-IF-negative Proben konnten wegen starker Fluoreszenz von zellulären Bestandteilen nicht interpretiert werden. Für die mikroskopische Auswertung war eine Vergrößerung von 1000 notwendig. Die Mindestzeit für die mikroskopische Untersuchung von 10 Minuten konnte nicht reduziert werden.

Mit der PCR (Abbildung 5) konnte bei allen mikroskopisch positiven Proben das Amplifikationsprodukt bei 346 bp bereits in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Tabelle 1). Die im sandwich-IF als fraglich positiv beurteilte Probe zeigte eine starke Bande bei 346 bp. Die im DIF nicht interpretierbaren Proben zeigten kein Amplifikationsprodukt. Fünf Proben waren in der Gelelektrophorese positiv, je-

doch ließ sich mikroskopisch - auch nach erneuter Untersuchung - *Pneumocystis* nicht nachweisen. Mittels Oligoblot-Hybridisierung (Abbildung 5) konnten alle in der Gelelektrophorese positiven Proben bestätigt werden. Bei sechs weiteren Proben ließ sich erst nach Hybridisierung eine Bande nachweisen. Bei keinem dieser Materialien konnte jedoch mikroskopisch ein Erregernachweis geführt werden.

Von den neun Patienten mit mikroskopischem und molekularbiologischem Erregernachweis waren fünf Patienten HIV-infiziert und es bestand bereits klinisch der Verdacht auf eine *Pneumocystis carinii*-Infektion; zwei Patienten waren knochenmarktransplantiert worden und bei zwei Patienten bestand als Grundleiden eine Glomerulonephritis bzw. ein Malignom. Bei dem Patienten mit *Pneumocystis*-Nachweis nur im sandwich-IF und in der PCR wurde eine Pneumocystose von klinischer Seite nicht in Erwägung gezogen. Bei den elf Patienten mit positivem PCR/ Oligoblot-Ergebnis ohne mikroskopischem Erregernachweis bestand klinisch kein Verdacht auf eine *Pneumocystis carinii*-Infektion. Eine klinisch relevante *Pneumocystis carinii*-Infektion trat auch nicht im Verlauf der Nachbeobachtungszeit von drei bis sechs Monaten nach BALF-Entnahme auf.

## Diskussion

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die beiden konventionellen Färbeverfahren mit Methenamin-Silbernitrat (MSN) oder Toluidinblau O (TBO) gleiche Empfindlichkeit bei der Untersuchung von BALF-Proben eines nicht selektierten Patientenkollektives zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-Zysten aufweisen. Allerdings erwies sich die TBO-Färbung als schneller, einfacher und kostengünstiger als die MSN-Färbung.

Von den beiden Immunfluoreszenzverfahren erwies sich der sandwich-IF als einfach und schnell zu beurteilen. Die Sensitivität entsprach der der konventionellen Verfahren. Hingegen zeigten Ng et al. [7] eine Überlegenheit des sandwich-IF im Vergleich zu konventionellen Färbeverfahren, wobei allerdings gemessen an klinischen Kriterien die Rate falsch-positiver Befunde bei etwa sechs Prozent lag. Auch in der vorliegenden Studie war in einem Fall ein fraglich positives Ergebnis erhoben worden, ohne daß klinisch ein Verdacht auf eine Pneumocystose bestand.

Der DIF erwies sich als weniger sensitiv als die anderen Nachweisverfahren. Hingegen fanden Cregan et al. [4] eine vergleichbare Empfindlichkeit von sandwich-IF und DIF. Obwohl mit dem hier verwendeten DIF auch Trophozoiten nachweisbar sind, erwies sich dieses erweiterte Spektrum als wenig vorteilhaft, da die Abgrenzung von Farbe-Artefakten meist nicht sicher möglich war.

In Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur [5,8-16] zeigte die PCR häufiger positive Befunde als die Färbeverfahren. Während der mikroskopische Er-

regernachweis aber mit einem entsprechenden klinischen Krankheitsbild einhergehend, erwiesen sich die PCR-Befunde bei Materialien ohne mikroskopischen Erregernachweis als klinisch nicht relevant. In einer Übersicht wiesen bereits Schluger und Rom [3] darauf hin, daß positive PCR-Befunde bei mikroskopisch negativen BALF-Proben nur in seltenen Fällen therapiebedürftige Infektionen anzeigen. Möglicherweise spiegelt der alleinige Nachweis von spezifischer DNA eine klinisch inapparente Kolonisierung mit *Pneumocystis carinii* wieder. Allerdings wies keiner der Patienten innerhalb von drei bis sechs Monaten nach BALF-Entnahme Zeichen einer *Pneumocystis carinii*-Infektion auf. Gründe für falsch-positive PCR-Befunde können auch Kontaminationen der Bronchoskope sein [16]. Schließlich können - trotz aufwendiger Maßnahmen - Kontaminationen der Materialien nicht sicher ausgeschlossen werden. Dies trifft insbesondere bei drei Patienten zu, bei denen nur je eine von zwei oder mehreren Proben nach Oligoblot-Hybridisierung reaktiv waren. Die Befunde weisen darauf hin, daß positive Hybridisierungsbefunde durch die Untersuchung einer zweiten Probe abgesichert werden sollten. Cartwright et al. [9] wiesen bereits auf eine inakzeptabel hohe Rate an positiven Befunden nach Oligoblot-Hybridisierung bei der Untersuchung von BALF-Proben hin.

Basierend auf den gezeigten Daten können die Toluidinblau O-Färbung und der sandwich-IF als mikroskopische Nachweisverfahren von *Pneumocystis carinii* in BALF-Proben empfohlen werden. Für die Diagnose einer klinisch relevanten Infektion erscheint der Einsatz der PCR bei BALF-Proben sowohl unter Berücksichtigung der Kosten und des Zeitaufwandes als auch wegen der fehlenden Korrelation mit einem klinischen Befund nicht gerechtfertigt.

## Danksagungen

Wir danken Herrn Dr. med. F. Fabry für die Unterstützung bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate, Herrn J. Sternberg für die Durchführung der Färbungen und Herrn D. Schmidt für die hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung der PCR und der Fotodokumentation der Ergebnisse.

## Literatur

1. Bartlett MS, Smith JW. *Pneumocystis carinii*, an opportunist in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 1991;4:137-49.
2. Hadley KW, Ng VL. *Pneumocystis*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington (USA): ASM, 1995:738-48.
3. Schluger NW, Rom WN. The polymerase chain reaction in the diagnosis and evaluation of pulmonary infections. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:11-6.
4. Cregan P, Yamamoto A, Lum A, VanDerHeide T, MacDonald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1990;28:2432-6.

5. Elvin K. Laboratory diagnosis and occurrence of *Pneumocystis carinii*. Scand J Infect Dis Suppl 1994;94:1-34.
6. Ng VL, Virani NA, Chaisson RE, Yajko DM, Sphar HT, Cabrian K, Rollins N, Charache P, Krieger M, Hadley WK, Hopewell PC. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* using a direct fluorescent monoclonal antibody stain. J Clin Microbiol 1990;28:2228-33.
7. Ng VL, Yajko DM, McPhaul LW, Gartner I, Byford B, Goodman CD, Nastos PS, Sanders CA, Howes EL, Leoung G, Hopewell P C, Hadley WK. Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1990;28:975-9.
8. Atzori C, Lu JJ, Jiang B, Bartlett MS, Orlando G, Queener SF, Smith JW, Cargnel A, Lee CH. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reactions on serum specimens. J Infect Dis 1995;172:1623-6.
9. Cartwright CP, Nelson NA, Gill VJ. Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. J Clin Microbiol 1994;32:1634-8.
10. Chouaid C, Roux P, Lavard I, Poirot JL, Housset B. Use of the polymerase chain reaction technique on induced-sputum samples for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. Am J Clin Pathol 1995;104:72-5.
11. Evans R, Joss AWL, Pennington TH, Ho-Yen DO. The use of a nested polymerase chain reaction for detecting *Pneumocystis carinii* from lung and blood in rat and human infection. J Med Microbiol 1995;42:209-13.
12. Leibovitz E, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K, Borkowsky W. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 1995;33:3004-7.
13. Roux P, Lavard I, Poirot JL, Chouaid C, Denis M, Olivier JL, Nigou M, Miltgen M. Usefulness of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* DNA. J Clin Microbiol 1994;32:2324-6.
14. Tamburrini E, Mencarini P, De Luca A, Antinori A, Visconti E, Ammassari A, Ortona L, Ortona E, Siracusano A, Vicari G. Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. J Clin Microbiol 1993;31:2788-9.
15. Tamburrini E, Mencarini P, De Luca A, Maiuro G, Ventura G, Antinori A, Ammassari A, Visconti E, Ortona L, Siracusano A, Ortona E, Vicari G. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: specificity and sensitivity of polymerase chain reaction in comparison with immunofluorescence in bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 1993;38:449-53.
16. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet 1990;336:451-3.
17. Hendrickson DA, Krenz MM. Reagents and stains. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington (USA): ASM, 1991:1289-1314.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. New York (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:9.38-40.