

thereby reaching high numbers in a very short time. These opportunists are found with those species of parasites in which the progeny stays in the same host and also starts to multiply. Therefore they are found with the Protozoa such as *Toxoplasma gondii*, *Leishmania sp.*, *Entamoeba histolytica*, *microsporidia* (in The Netherlands mainly from the genera *Enterocytozoon* and *Encephalitozoon*), *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli* and predisposed by immunoglobulin deficiencies to opportunistic *Giardia lamblia* infection. Only a single

worm species, *Strongyloides stercoralis*, acts as an opportunistic infection. The diagnostic approach in the detection of *Toxoplasma* infections in cardiac transplant recipients is described, in which the use of the Western blot is of increasing importance. Also the diagnosis of toxoplasmic encephalitis improved by the introduction of the Western blot.

Key-words: opportunistic parasitic infections; *Toxoplasma gondii*; cardiac transplant recipients; toxoplasmic encephalitis; Western blot

Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 75-78

Laboratoriumdiagnostiek van infecties met *Pneumocystis carinii*

P.J.A. BECKERS

***Pneumocystis carinii*-pneumonie blijft, ondanks goede profylaxe en therapie, een opportunistische infectie waarmee rekening dient te worden gehouden in de risicogroepen.**

Verantwoorde laboratoriumdiagnostiek van *Pneumocystis*-infecties is gebaseerd op een combinatie van kleuringen waarmee zowel de karakteristieke celinhoud van de organismen alsook de typerende structuren in de verdikte wanden van de cystestadia aangetoond worden. De introductie van specifieke, fluorescerende, monoclonale antilichamen heeft de gevoeligheid van de microscopische diagnostiek van *Pneumocystis* enigszins verhoogd maar ook het risico op vals positieve bevindingen vergroot. Vooral de grote voorspellende waarde van negatieve fluorescentie testen met behulp van deze monoclonale antistoffen is een waardevolle aanvulling op de microscopische diagnostische methoden. Twee diagnostische strategieën worden gepresenteerd die gebaseerd zijn op morfologische karakteristieken van *Pneumocystis* en de specifieke monoclonale aankleuring.

De meerwaarde van de moleculaire technieken ligt voorlopig op het gebied van epidemiologie, maar zou in de toekomst het gebruik van niet-invasieve bemonstering voor de diagnostiek mogelijk kunnen maken.

Trefwoorden: *Pneumocystis carinii*; kleuringen; morfologie; monoclonale antistoffen; IFT; PCR; diagnostische strategieën

Pneumocystis carinii is een micro-organisme dat wereldwijd bij zoogdieren in de longen wordt aangetroffen. Het is altijd als protozo beschouwd; recent is echter gebleken dat *Pneumocystis* moleculair geneti-

sche overeenkomsten vertoont met schimmels. *Pneumocystis* kan alleen bij een gestoorde afweer van de gastheer een (fataal verlopende) longontsteking veroorzaken (1).

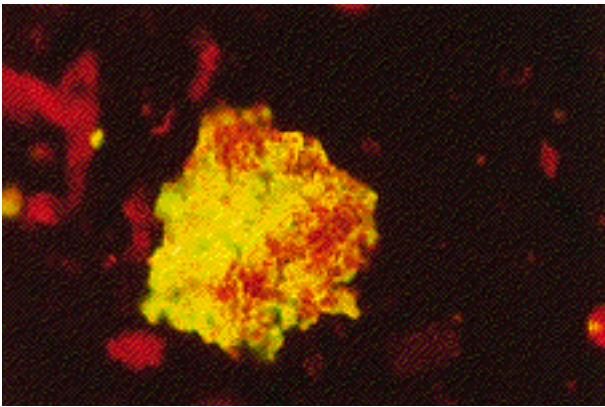
De frequentie waarmee *Pneumocystis carinii* wordt gezien, is de laatste jaren aanzienlijk afgenomen door het succes van de profylaxe bij de risicogroepen, waaronder die van HIV-positieve patiënten nog steeds de grootste is. Daardoor zou de situatie kunnen ontstaan dat de voor het aantonen van de parasiet benodigde expertise slechts gehandhaafd blijft in een beperkt aantal centra, waar de vraag naar *Pneumocystis*-diagnostiek zich regelmatig voordoet. Recente ontwikkelingen maken het aantonen van *Pneumocystis* enerzijds gemakkelijker en gevoeliger, maar vergroten anderzijds het risico van vals positieve bevindingen. Een van de oorzaken is het verlaten van karakteristieke morfologische kenmerken als absoluut criterium voor de laboratoriumdiagnose. De methoden voor het aantonen van *Pneumocystis* zijn uitgebreid met een aantal immunologische en moleculair biologische technieken. Voor de klinische routine neemt de specifieke aankleuring met monoclonale antistoffen de meest prominente plaats in onder deze vernieuwingen. Daarom staat deze techniek centraal in dit overzicht.

Onderzoeksmateriaal

Het onderzoeksmateriaal bij uitstek is de bronchoalveolaire lavage (BAL), waarvan een sediment wordt gemaakt na behandeling met een slijmreducerend middel. Van het geresuspendeerde en eventueel gewassen sediment worden preparaten gemaakt voor de verschillende aantoonreacties (tabel 1). Ook wordt geïnduceerd sputum gebruikt voor de diagnostiek; belangrijke nadelen hiervan zijn echter de geringere gevoeligheid en de contaminatie met keel- en mondflora. De ontwikkelingen in de moleculaire technieken lijken het gebruik van mond- en keelspoelsel in de toekomst voor de *Pneumocystis*-diagnostiek zinvol te maken.

Afdeling Medische Microbiologie, Sectie Medische Parasitologie, AZN St. Radboud Nijmegen

Correspondentie: P.J.A. Beckers, Afdeling Medische Microbiologie, Sectie Medische Parasitologie, AZN St. Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen; Email: p.beckers@mmb.azn.nl



Figuur 1. Een BAL-sediment aangekleurd met fluoresceïne-gelabelde monoclonale antistoffen. Te zien is een alveolar cast, met daarin enkele individuele ronde cystestadia van *Pneumocystis* tussen een grote hoeveelheid amorf materiaal. De doorsnede van dergelijke alveolar casts kan tot 250 µm bedragen en ze zijn met het 10x objectief te traceren. Een geïsoleerde fluorescerende ronde vorm van ongeveer 4 µm duidt op een cystestadium van *Pneumocystis*.

Diagnostische technieken

Histologische kleuringen

Histologische kleuringen blijven een uiterst betrouwbaar instrument om *Pneumocystis carinii* als verwekker van pneumonie te diagnostiseren. Ze vallen uiteen in twee categorieën: kleuringen van de celwanden van de dikwandige stadia en kleuringen van kern en cytoplasma van alle stadia van de parasiet.

In de eerste categorie zijn varianten op de Grocott-zilverkleuring en toluïdineblauw de meest gebruikte methoden (1). De verdikte wand van de cystestadia wordt grijs of blauw aangekleurd en daarmee wordt tevens een uniek morfologisch kenmerk van *Pneumocystis* zichtbaar: twee tegenover elkaar liggende komvormige wandverdikkingen. Lang niet alle cysten vertonen deze karakteristieke wandverdikkingen; bij infecties met geringe aantallen cysten moet soms lang gezocht worden naar karakteristieke organismen om de differentiatie met schimmelsporen met zekerheid te kunnen maken. Ook is vaak een vouw of rimpel in de wand zichtbaar, die aanduidt dat de in de cyste gevormde dochtercellen (ook sporozoiëten of intracystic bodies genoemd) als trofozoïeten zijn vrijgekomen. Men dient zich te realiseren dat de verhouding tussen cystestadia en trofozoïeten ongeveer 1 op 100 bedraagt.

Er worden regelmatig infecties gezien waarbij geen cystestadia zijn te vinden in de wandkleuringen. Daarom wordt naast zilver- of toluïdinekleuring ook een kleuring van de celinhoud uitgevoerd. Van de methoden die celcytoplasma en -kern aankleuren, is Giemsa de meest gebruikte vanwege het superieure, contrastrijke resultaat. In Giemsa-gekleurde preparaten komen twee andere voor *Pneumocystis* typerende kenmerken tot uiting: de rangschikking van maximaal 8 dochtercellen binnen de cyste en de zogenaamde alveolar casts, waarin honderden trofozoïeten aan elkaar geklit zitten, met daartussen cystestadia en resten van alveolaire macrofagen.

De alveolar casts ontstaan doordat trofozoïeten, en in mindere mate de cystestadia, op het oppervlak lange, submicroscopische, tubulaire structuren dragen, die kronkelend voor verankering aan andere organismen zorgen. De alveolar casts kunnen met de BAL uit de alveoli worden gespoeld. Met een kleine vergroting zijn deze casts te traceren, wat de tijd aan microscopiseren kan bekorten. In tabel 1 zijn de karakteristieke morfologische kenmerken van de verschillende stadia in de meest gebruikte kleuringen samengevat. Ook in sommige der kleurtechnieken die worden gebruikt in het cytologisch laboratorium zal de ervaren microscopist *Pneumocystis* kunnen herkennen. Bevestiging met zilver- of Giemsa-kleuring verhoogt in deze gevallen de zekerheid van de diagnose.

De vitaliteit van *Pneumocystis*, die een belangrijk aanvullend gegeven kan zijn bij de evaluatie van de therapie, kan men alleen in Giemsa-gekleurde preparaten inschatten.

Immunofluorescentietesten (IFT) met monoclonale antistoffen

Voor het aantonen van *Pneumocystis carinii* door middel van immunofluorescentie met monoclonalen, zijn meerdere commerciële testen te verkrijgen, met onderling kleine methodische verschillen. Sommige tests gaan uit van een gelabelde monoclonale antistof, zodat de test slechts een enkelvoudige incubatie omvat. Andere tests vereisen incubatie met een ongelabelde monoclonaal, gevolgd door reactie met een secundaire, met fluoresceïne gelabelde, antistof. Al deze testen zijn gebaseerd op specifieke reacties met het glycoproteïne A of major surface glycoproteïne (MSG). Dit eiwit is aanwezig op alle ontwikkelingsstadia van *Pneumocystis*, dus zowel op de ronde dikwandige cysten als op de dunwandige variabele trofozoïeten en alle tussenstadia.

Omdat het aangekleurde eiwit op het oppervlak van de organismen aanwezig is, gaat de karakteristieke morfologie van de cyste-inhoud en de komvormige wandverdikkingen verloren. Toch is dit in de meeste gevallen geen probleem, aangezien de alveolar casts in de IFT hun typische aanblik behouden en door de fluorescentie zeer snel in het oog vallen (fig. 1). Ook de rond-ovale contour van de dikwandige stadia valt op, vooral als ze in kleine groepjes of los worden aangetroffen. Kleine agglomeraten, bestaand uit slechts enkele trofozoïeten, zijn moeilijk te herkennen omdat deze stadia amorf zijn en de fluorescerende contouren weinig houvast bieden voor de definitieve diagnose. Het fluorescerende MSG kan de contouren van individuele *Pneumocysten* versluieren, vooral in de alveolar casts, waarin het eiwit ook tussen de organismen als een matrix aanwezig kan zijn.

Incidentele kruisreacties met bijvoorbeeld *Candida*-soorten zijn beschreven (2). Dit resulteert in fout positieve bevindingen, omdat zowel het formaat als de contour hiervan erg op *Pneumocysten* lijken. Daarom is het raadzaam naast de IFT altijd een parallel-preparaat te kleuren met Giemsa en dit te beoordelen als de IFT positief is. Kruisreacties met gelijkvormige organismen kunnen zo worden uitgesloten.

Tabel 1. Meest gebruikte technieken om *Pneumocystis carinii* aan te tonen

Techniek	Pneumocystis stadium	Aangekleurde structuur	Typerende morfologie
Zilverkleuring of toluidineblauw	dikwandige cyste	verdikte cystewand	ovaal-ronde cysten met 2 kommvormige wandverdikkingen
Giemsa	alle stadia, los en in alveolar casts	cytoplasma blauw kernen rood-paars	-8 dochtercellen in cyste -alveolar casts (<250mm) met talloze trofozoieten
IFT met monoclonale antistof	alle stadia, los en in alveolar casts	oppervlakte-eiwit MSG	alleen contouren

Tabel 2. Balans diagnostische technieken voor *Pneumocystis carinii*

Techniek	Voordelen	Nadelen / beperkingen
Kleuringen Giemsa + zilver/toluidine	ondubbelzinnig resultaat goedkoop vitaliteitsbepaling	microscopieexpertise noodzakelijk gevoeligheid 90%
IFT met monoclonale antistof	hoge gevoeligheid, groot contrast: korte microscopietijd	geen karakteristieke morfologie vals positieve resultaten hoge kosten
PCR	hoge gevoeligheid niet-invasieve bemonstering mogelijk	relevantie zwak positieve resultaten? lange duur, geen cito bepaling zeer hoge kosten

De grote winst van de IFT met monoclonale antistof ten opzichte van de conventionele kleuringen is vooral gelegen in het microscopiseren. Met name negatieve resultaten kunnen met veel minder microscopiseertijd betrouwbaar worden afgegeven vanwege het grote contrast tussen fluorescerende organismen en de rood gekleurde achtergrond. In de literatuur zijn IFT en histologische kleuringen vaak vergeleken, waarbij de IFT steeds als iets gevoeliger uit de bus komt. De percentages die worden opgegeven voor de gevoeligheid variëren tussen de 95 en 100% voor de IFT; een veel grotere variatie wordt gerapporteerd voor de verschillende histologische kleuringen.

Polymerase chain reactie (PCR)

De toepassing van PCR heeft grote impact gehad op het gebied van de epidemiologie, het onderzoek naar transmissie, het vaststellen van genetische variaties tussen isolaten en de taxonomische indeling wegens de gevonden verwantschap van *Pneumocystis* met *Fungi*. Sinds de eerste beschrijving van een bruikbare PCR voor *Pneumocystis* in 1990 (3), is een groot aantal varianten ontwikkeld die de toepassing in het routinelaboratorium steeds dichterbij brengen. De zeer grote gevoeligheid van de PCR-technieken kan de interpretatie van positieve resultaten compliceren: theoretisch kan een enkel in de bronchus binnen gekomen organisme een positieve test opleveren. Toch lijken recente resultaten erop te wijzen, dat de PCR voor niet invasieve monsters zoals spoelingen van mond en keel een specificiteit van 90% kan bereiken (4). De negatieve voorspellende waarde van de PCR wordt algemeen als 100% beschouwd, mits controles

voor natuurlijke remmers van DNA-polymerase worden ingebouwd. De zeer hoge kosten en de voorlopig nog te lange procedures zijn op dit moment de voornaamste factoren die implementatie van de PCR als routinebepaling voor *Pneumocystis*-infecties verhinderen.

Conclusie

Samenvattend komen de volgende twee strategieën in aanmerking voor de laboratoriumdiagnostiek van *Pneumocystis*-infecties. Ze kunnen beide als citobepaling worden verricht:

- Screening met IFT, gecombineerd met Giemsa-kleuring ter bevestiging van positieve fluorescentieresultaten. Dit is een gevoelige en specifieke manier om *Pneumocystis* aan te tonen.
- Een combinatie van twee histologische kleuringen één van de cystewand en één van de celinhoud, is betrouwbaar en zeer specifiek met gering gevoeligheidsverlies ten opzichte van IFT.

PCR geeft op dit moment nog niet voldoende meerwaarde om als routinebepaling in gebruik te worden genomen

Literatuur

1. Polderman AM, Rijpstra AC. Medische Parasitologie, handleiding bij de laboratoriumdiagnostiek. 2e ed. Houten/Zaventem: Bohn Stafleu Van Loghum 1993: 56-57 en 187-190.
2. Koch M, Heizmann W. Problems in the detection of *Pneumocystis carinii* by indirect immunofluorescence. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 1:58-59.

3. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Maxon ER, Hopkin JM. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; 336: 451-453.
4. Helweg-Larsen J, Jensen JS, Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, Lundgren B. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2068-2072.

Summary

Diagnosis of Pneumocystis carinii. Beckers PJA. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 75-78.

The frequency of *Pneumocystis carinii* pneumonia (PcP) episodes in immunocompromised patients has been reduced by effective prophylaxis, especially in the HIV-positive riskgroup. At present, the laboratory diagnosis of this infection is based on the morphologic characteristics of the organism: the typical comma-like wall structures in silver or toluidin stains and the arrangement of daughter cells within the cystic

stage in Giemsa stained preparations of broncho-alveolar lavage fluid or induced sputum samples. *Pneumocystis* specific monoclonal antibodies, applied in immunofluorescence assays (IFA), increase the sensitivity of the laboratory diagnosis, but can give false positive results. The high predictive value of negative IFA results is especially appreciated. A combination of IFA and Giemsa is recommended as a safe and sensitive strategy for the diagnosis, although the combination of silver/toluidin blue and Giemsa gives also reliable results in the hands of experienced microscopists.

The molecular techniques (PCR) have proven their value in epidemiologic studies; in the nearby future the high sensitivity of PCR may improve routine PcP diagnosis, especially by enabling reliable laboratory diagnosis on non-invasive samples, such as oral washings.

Key-words: Pneumocystis carinii; staining techniques; morphology; monoclonal antibodies; IFA; PCR; diagnostic strategies