Anwendbarkeit eines polyklonalen Antiserums für den immunhistochemischen Nachweis von *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Applicability of a Polyclonal Antiserum for the Immunohistochemical Detection of *Pneumocystis carinii* in Bronchoalveolar Lavage (BAL)

A. Roth, K. Janitschke

Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes Berlin, Fachgebiet Klinische Parasitologie (Direktor und Prof. Dr. K. Janitschke)

Die Diagnose einer *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie wird durch den direkten Nachweis des Erregers in Patientenmaterial (überwiegend BAL) mittels konventioneller Färbungen gestellt. Die Schaffung immunhistochemischer Nachweismethoden mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern (1–3) wurde angestrebt. Diese Techniken müssen weiter verbessert werden, um in der Laboratoriumsdiagnostik der Pneumocystose eingesetzt werden zu können.

Wir haben dieses Ziel weiterverfolgt. Menschliche infizierte Lunge wurde homogenisiert (Abb. 1 a), mit Pronase (Serva) inkubiert und in einer Saccharose-Gradientenzentrifugation aufgetrennt (3). Der 36%-Gradient enthält am meisten Zysten und wurde 3mal mit PBS pH 7,2 gewaschen (Abb. 1b). Es wurden 2 Kaninchen (Neu Seeländer) mit je 2 Mio. Zysten als gelöstes Antigen immunisiert (4mal alle 6 Tage eine Viertelportion mit Freudschem Adjuvans). Das Serum mit dem höchsten Titer (1:1280, 2 Wochen nach Immunisierung) wurde für den indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) verwendet (Serum 1:20 verdünnt; Konjugat: FITC Anti-Rabbit IgG (H+L), Miles). Dafür wurde die BAL zunächst auch mit Pronase behandelt, danach 1mal (wie oben) gewaschen, auf Objektträger aufgetragen, luftgetrocknet und in Methanol fixiert.

Die Zysten stellten sich typischerweise zusammengeballt ohne störende unspezifische Reaktionen als kräftig fluoreszierende ovale Gebilde dar (Abb. 2b). In einer Grocottgegenfärbung konnten die identischen Zysten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieses IIFT korrelierten bei einer vorläufigen Untersuchung von 15 BAL mit denen der Grocottfärbung. Eine leichte Kreuzreaktion mit Pilzen in nur einem Fall erschwerte die Beurteilung nicht, weil sie sich fluoreszenzoptisch viel schwächer und morphologisch anders darstellte (Hyphen!). Bemerkenswerterweise kommt die Antigen-Antikörper-Reaktion nur nach Inkubation des gesuchten Antigens mit Pronase zustande (Abb. 2a und b).

Die Extraktion der Zysten aus der Lunge gelingt ohne Anwendung von Enzymen nicht (4). Der Effekt der Pronase auf das Antigen ist als nachteilig beschrieben worden (4). Wir haben dieses Enzym in einer Minimalkonzentration angewandt, so daß Herstellung und Immunogenität des Antigens gewährleistet waren. Die enzymatische Behandlung des Untersuchungsmaterials verhindert einerseits unerwünschte Fluoreszenz, andererseits werden gesuchte Epitope der Erregeroberfläche günstig befreit oder biochemisch verändert, so daß der Antikörper das Antigen hochspezifisch wiedererkennt. Die vorläufigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß dieses polyklonale Antiserum auf Grund dieser Enzymmethode durchaus mit monoklonalen Antikörpern konkurrieren kann. Wir sind dabei, diesen Immunfluoreszenztest mit Absorptionsversuchen und umfangreicherem Untersuchungsmaterial zu erproben und zu verbessern, um ihn in unserer Routinediagnostik einführen zu können.

Schrifttum:

1. KOVACS, J. A., GILL, V., SWAN, J. C., OGNIBENE, F., SHELHAMER, J., PARILLO, J. E., MASUR, H.: Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 2, 1–3 (1986).
2. GRAVES, D. C., McNABB, S. J. N., IVEY, M. H., WORLEY, M. A.: Development and characterization of monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 51, 125–133 (1986).
3. LIM, S. K., EVELAND, W. C., PORTER, R. J.: Direct fluorescent antibody method for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia from sputa or tracheal aspirates from humans. *Appl. Microb.* 27, 144–149 (1974).
4. STAHR, B. J., WALZER, P. D., YONEDA, K.: Effect of proteolytic enzymes on *Pneumocystis carinii* in rat lung tissue. *J. Parasitol.* 67, 196–203 (1981).

Anschrift des Verfassers:

Andreas Roth
Robert-Koch-Institut
Fachgebiet Klinische Parasitologie
Nordufer 20
1000 Berlin 65

1a

1b

Abb. 1: Grocottfärbung, 580 x. a) Lungenhomogenat mit Zysten von *P. carinii*, b) daraus hergestelltes gereinigtes Antigen, mit dem immunisiert wurde, um das polyklonale Antiserum herzustellen (hier Silberimprägnierung zwecks Kontrasterhöhung für die Zählung stärker)

2a

2b

Abb. 2: IIFT mit polyklonalen Antikörpern, 580 x. a) BAL ohne Pronase, im Präparat nur eine Zyste nachweisbar (links oben), unspezifische Fluoreszenz, b) die im selben Untersuchungsmaterial nach Pronaseinkubation entfällt. Die Zysten sind jetzt dargestellt

... eine zeitgemäße Elektrolytbestimmung

MICROLYTE 6 – ein ionenselektives Meßgerät,
das simultan Na^+ , K^+ , Cl^- , Li^+ , Ca^{++} und pH
mißt, dafür 150 μl Probe benötigt und pro Stunde
über 400 Ergebnisse ermittelt.

Ein System, das durch modernste Technologie im
Routine- und Notfallbetrieb zuverlässige Meßwerte
sicherstellt und ergänzend dazu enorm
wirtschaftlich arbeitet.

Übrigens: KONE hat nahezu 10 Jahre Erfahrung
mit ionenselektiven Elektroden.

Warum sollten Sie sich mit weniger
zufriedengeben?

Ein führender Hersteller klin.-chem. Analysensysteme

KONE OY MEDIZINTECHNIK
Niederlassung Deutschland Feldbehnstr. 4A
D-2085 Quickborn
Tel. D 41 06-40 61 Telex 2 180 668 kone d
Telefax 0 41 06-5 06 90

Praxishilfen

Wissen, Tips und Service für den Arzt

Herausgegeben von Frank H. Mader

Indikation, Anwendung und Abrechnung, 15 Tabellen und 37 Abbildungen, 80 Seiten, 3. Auflage, 24,80 DM.

Katalog + Kommentar für die Allgemeinpraxis, gültig für BMA '87 und E-GO, 4. Auflage, 43,80 DM.

Katalog + Kommentar für die Allgemeinpraxis, GOÄ '88, Stand 1. 10. 88, 6. Auflage, 158 Seiten, 43,80 DM.

Leitfaden für Ärzte im Umgang mit Versicherern und Versicherungen, 24 Tabellen mit 12 ausklappbaren Seiten, 4 Abb., 52 Seiten, 3. Auflage, 22,80 DM.

Indikationen, Kontraindikationen, Kosten und Richtlinien für Kassenärzte, 64 Seiten, 2. Auflage, 22,80 DM.

Durchführungen - Auswertung - Abrechnung, 17 Abbildungen, 56 Seiten, 3. Auflage, 24,80 DM.

Ein Leitfaden für Verordnung, Materialien und Kosten, 44 Seiten, 2. Auflage, 24,80 DM.

Wertermittlung und Steuerrecht bei Kauf und Verkauf von Arztpraxen, 50 Seiten, 25,80 DM.

Bitte senden Sie mir die angekreuzten Praxishilfen

- ☐ 100137 Henke, 24,80 DM
- ☐ 100153 Weber, 43,80 DM
- ☐ 100158 Weber GOÄ, 43,80 DM
- ☐ 100149 Grieb, 22,80 DM
- ☐ 100143 Schmid, 22,80 DM
- ☐ 100156 Schmidt-Voigt, 24,80 DM
- ☐ 100147 Schilling, 24,80 DM
- ☐ 100144 Lang/Bauer, 25,80 DM
- ☐ 100145 Rengel, 49,80 DM
- ☐ 100148 Müller, 25,80 DM

Name: _____

Straße: _____

PLZ/Ort: _____

Datum: _____ Unterschrift: _____

Vordruckmuster, Richtlinien und Hilfen, 102 Seiten, 49,80 DM.

Gesetze, Todeszeit, Attest und Abrechnung, Gewebeprobe und Abstrich, Entnahme und Versand, 52 Seiten, 25,80 DM.

VERLAG
KIRCHHEIM
MAINZ

Kaiserstraße 41
6500 Mainz