

Aktuelle Grenzen in der Diagnostik der okulären Toxoplasmose

Justus G Garweg¹, Patrick Jacquier², Franziska Flückiger¹

¹ Univ.-Augenklinik, Inselspital, CH-3010 Bern

² Paradiag, Parasitologisches Labor, Postfach 234, CH-3000 Bern 13

Zusammenfassung

Hintergrund Die Diagnose einer okulären Toxoplasmose wird in der Regel nach dem klinischen Befund und der Anamnese bei Vorhandensein von Antikörpern gegen den Parasiten im Serum gestellt. Eine Bestätigung der Diagnose über Laboruntersuchungen wird üblicherweise nicht versucht. Die Entwicklung neuerer Untersuchungsmethoden hat jedoch zu einer Verbesserung der Sensitivität in der Diagnostik geführt. Die vorliegende offene prospektive klinische Studie wurde unternommen, um die Sensitivität der Diagnostik unter Anwendung aller heute verfügbaren diagnostischen Methoden bei Patienten mit einer klinisch typischen okulären Toxoplasmose zu evaluieren.

Methoden Bisher wurden 27 Patienten in die Studie aufgenommen. Allen Patienten wurde zum Zeitpunkt der Diagnose Kammerwasser und Serum entnommen. Die Proben wurden je nach Verfügbarkeit in eines von zwei Referenzlaboratorien eingesandt. Aus sämtlichen Proben wurden Gesamt-IgG und Toxoplasma-IgG zur Kalkulation des Goldmann-Witmer-Koeffizienten, zusätzlich spezifisches IgM und IgA bestimmt. Aus den in Labor 2 eingesandten Proben wurde darüberhinaus die Antikörper-Avidität bestimmt und der Erregernachweis mittels PCR versucht.

Resultate Eine ätiologische Bestätigung der Diagnose gelang in 5/9 Fällen (56%) in Labor 1 und in 14/18 Fällen in Labor 2 (78%). Die höchste Sensitivität hatte mit 41% (unter Einschluss der indikativen Koeffizienten 56%) die Bestimmung des Goldmann-Witmer-Koeffizienten, es folgten DNA-Nachweis (28%), IgA im Kammerwasser (22%) und die Antikörper Avidität (15%). Eine Sicherung der Diagnose durch zwei unabhängige Tests gelang in 28% der Proben.

Schlussfolgerung Keine der untersuchten Methoden erreichte eine ausreichende Sensitivität, um als alleiniger diagnostischer Test empfohlen werden zu können. Erst die Kombination aller heute verfügbaren Methoden inklusive DNA Nachweis mittels PCR und Bestimmung der Antikörper-Avidität erreicht eine Sensitivität, die Rückschlüsse von der Kammerwasserdiagnostik erlaubt.

Schlüsselwörter Okuläre Toxoplasmose — Goldmann-Witmer-Koeffizient — Antikörper-Avidität — Erreger-Nachweis — PCR — *Toxoplasma gondii*

Current strategies in the laboratory diagnosis of ocular toxoplasmosis

Background The diagnosis of ocular toxoplasmosis has remained a merely clinical one, because the low sensitivity of established methods does not allow clinical consequences. The underlying open prospective study was undertaken to analyse the sensitivity of a combination including the newly available tests for the diagnosis of the disease.

Methods From 27 patients included until now, aqueous humor and serum samples were collected and sent to one of two reference laboratories according to their actual availability. From all samples, total IgG and anti-Toxoplasma IgG as well as specific IgM and IgA were quantified, and from the results, the antibody ratio was calculated according to the formula of Goldmann and Witmer. From the samples sent to laboratory 2, antibody avidity was determined and Toxoplasma DNA amplified using PCR.

Results A confirmation of the clinical diagnosis was achieved in 5/9 cases (56%) from samples sent to laboratory 1, and from 14/18 samples (78%) sent to laboratory 2. Calculation of the antibody ratio was confirmed to be the most sensitive method with a confirmation rate of 41%, followed by PCR (28%), determination of specific IgA (22%) and finally antibody avidity (15%). A confirmation with two independent tests was achieved in 28% of cases.

Conclusion None of the methods analysed was sensitive enough to establish the diagnosis in a given case. The combination of all four methods, however, achieved a sensitivity, which is high enough to justify a clinical routine analysis of aqueous humor samples.

Key words Ocular toxoplasmosis — antibody ratio — antibody avidity — anti-Toxoplasma-IgA — DNA amplification — PCR — *Toxoplasma gondii*

Nach wie vor gilt der klinische Befund als der „Golden Standard“ in der Diagnostik der okulären Toxoplasmose (1, 2). Die Zuverlässigkeit dieses Standards steht und fällt jedoch mit der Erfahrung des Untersuchers. Die breite Palette klinischer Erscheinungsformen je nach Schwerpunkt der Entzündung (3, 4) bringt es mit sich, daß, je nach Augenarzt, die Kriterien für die Dia-

gnosestellung erheblich variieren (5). Dies zeigt sehr eindrücklich die schlechte Korrelation zwischen klinischer Diagnose und Laborbefund. Offensichtlich werden bei 40% der Patienten mit toxoplasmose-verdächtigen Hinterabschnittsveränderungen keine Antikörper gegen den Erreger, *Toxoplasma gondii* gefunden (1), was die Diagnose einer okulären Toxoplasmose praktisch aus-

schließt. Andererseits sind die Antikörpertiter der Patienten mit posteriorer Uveitis, bei denen Antikörper nachweisbar sind, höher als die einer gesunden Vergleichspopulation).

Ein weiteres diagnostisches Problem liegt darin, daß zwar theoretisch bei allen Patienten mit okulärer Toxoplasmose spezifisches IgG im Serum nachweisbar sein sollte, aber die Prävalenz von spezifischen Antikörpern bei Personen mit asymptomatischer systemischer Toxoplasmose sehr hoch ist. Eine Augenbeteiligung wird in 1-2% der Infizierten gefunden (8). Damit ist die Aussagekraft des Nachweises spezifischer Antikörper gering. Zudem läßt sich bei isolierter okulärer Toxoplasmose weder spezifisches IgM nachweisen noch eine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörpertiter im Serum und der Krankheitsaktivität finden (9).

Da die Diagnosesicherung Konsequenzen für Therapie und Prognose hat, zusätzlich die sozialmedizinischen Kosten für die oft wiederholten diagnostischen Abklärungen, Therapieversuche und Erkrankungsfälle bei Patienten mit unklarer Uveitis im Laufe der Jahre meist erheblich werden, ist eine möglichst frühzeitige Diagnosesicherung für die Betreuung und Therapie eines Patienten wünschenswert (5).

Die vorliegende Studie untersucht deshalb im Vergleich zweier etablierter Referenzlaboratorien, was der Einsatz aller heute verfügbaren diagnostischen Tests gegenüber einer üblichen Routineaufarbeitung von Kammerwasser und Serum zur Diagnosesicherung beitragen kann.

Patienten und Methode

In die vorliegende prospektive klinische Studie wurden eine konsekutive Gruppe von 27 Patienten eingeschlossen, die sich mit dem typischen klinischen Bild einer okulären Toxoplasmose zwischen Mai 1996 und August 1997 in der Poliklinik der Universitäts-Augenklinik Berlin vorstellten.

Als typisches klinisches Bild der okulären Toxoplasmose wurde eine Retinochoroiditis mit fokalem, cremefarbenen Netzhautödem, typischerweise im Randbereich einer alten chorioretinalen Narbe, mit lokal betonter Begleitvitritis und eventuell mäßig ausgeprägter retinaler Vaskulitis im Herdbereich bei einer immunkompetenten Person definiert, bei der eine andere entzündliche Systemerkrankung ausgeschlossen worden war (2, 8, 10). Juxtapapilläre chorioretinitische Veränderungen im Sinne eines M. Jensen, eventuell verbunden mit einer Papillitis, wurden ebenfalls eingeschlossen (11).

Bei Diagnosestellung wurde allen Patienten Blut und Kammerwasser abgenommen und entsprechend der Verfügbarkeit an eines von zwei routinemäßig in die Toxoplasmose-Diagnostik von Patientenmaterialien involvierten Laboratorien zur weiterführenden Diagnostik (Tabelle 2) eingesandt. Zusätzlich wurde aus allen Proben das Gesamt-IgG mittels

Nephelometrie quantifiziert. Der Goldmann-Witmer-Koeffizient wurde von allen Proben gemäß der folgenden Formel kalkuliert (12, 13):

$$C = \text{anti-Toxoplasma-IgG} \frac{\text{Kammerwasser}}{\text{Serum}} \\ \times \text{Gesamt IgG} \frac{\text{Serum}}{\text{Kammerwasser}}$$

Die Antikörper-Avidität wurde entsprechend dem Verhältnis zwischen freien und an Antigen gebundenen, aber durch Harnstoff dissoziierbaren Antikörpern bestimmt. Die Avidität ist ein Maß für die Stabilität der Verbindung zwischen einem Antigen und dem dazu passenden Antikörper. Die Avidität eines Antikörpers zeigt, wie exakt ein Antikörper auf das zu erkennende Antigen angepaßt ist, und erlaubt damit indirekt Rückschlüsse, wie lange das Antigen bereits bekannt ist. Bei einer frischen Infektion ist eine niedrige, bei einer chronischen Infektion eine hohe, und bei einer reaktivierten Infektion ein Abfall der Avidität in dem betroffenen Kompartiment zu erwarten (14). Die Amplifikation der Erreger-DNA nach etablierten Standardprotokollen wurde anderen Orts beschrieben (15). Sämtliche angewandte Methoden wurden mit etablierten Labordiagnostik-Verfahren und -Geräten durchgeführt und die Ergebnisse zentral dokumentiert. Die Kriterien zur Interpretation der Resultate sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tab. 1 Labor-Diagnostik der Toxoplasmose aus Kammerwasser und Serum (+ = verfügbar; — = nicht verfügbar)

Untersuchungsmethode	Labor 1 (n=9)	Labor 2 (n=18)	Kriterium zur Bestätigung der Diagnose
Nachweis der Erreger-DNA (PCR)	—	+	Erreger-DNA im Kammerwasser nachweisbar C-Koeffizient >3 Kammerwasser-Avidität <50% der Serum-Avidität IgA Kammerwasser/Serum > 1
spezifisches IgG Antikörper-Avidität*	+	+	
spezifisches IgA	+	+	

* Erläuterung siehe Text

Tab. 2 Bestätigung der okulären Toxoplasmose durch die Labor-Diagnostik

Untersuchungsmethode	Labor 1	Labor 2	gesamt n abs (%)
Nachweis der Erreger-DNA (PCR)	n.d.	5/18	5/18 (28%)
C-Koeffizient positiv (C > 8)	4/9	7/18	11/27 (41%)
C-Koeffizient indikativ (3 < C < 8)	3/9	1/18	4/27 (15%)
Antikörper-Avidität	n.d.	3/18	3/18 (18%)
spezifisches IgA im Kammerwasser/Serum	1/9	5/18	5/27 (19%)
Diagnose gesichert	5/9 (56%)	14/18 (78%)	19/27 (70%)
Anzahl positiver/durchgeführter Untersuchungen	5/27 (18%)	20/72 (28%)	25/99 (25%)

Untersuchungsmethode und Diagnosesicherung

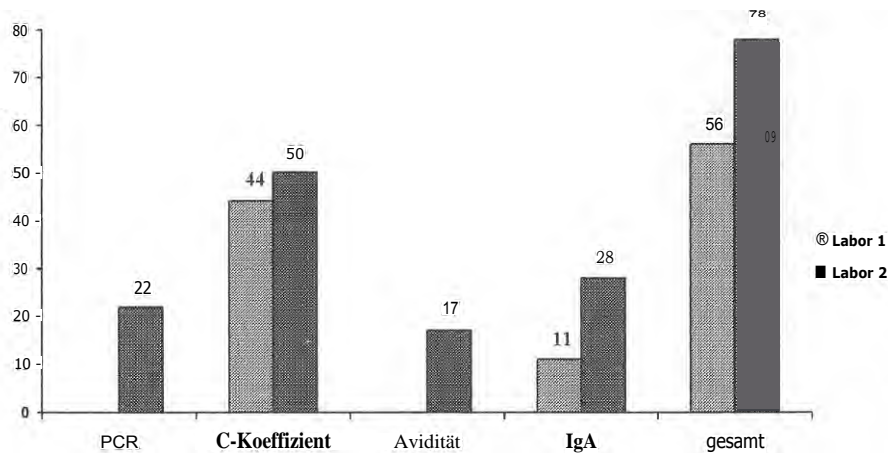


Abb. 1 Die Kalkulation des Goldmann-Witmer- oder C-Koeffizienten ist mit 45-50% die sensitivste Methode zur Bestätigung der okulären Toxoplasmose. Erst die Kombination aller verfügbaren Methoden ermöglicht die Bestätigung oder den Ausschluß der Diagnose mit einer ausreichenden Plausibilität zur Diagnose

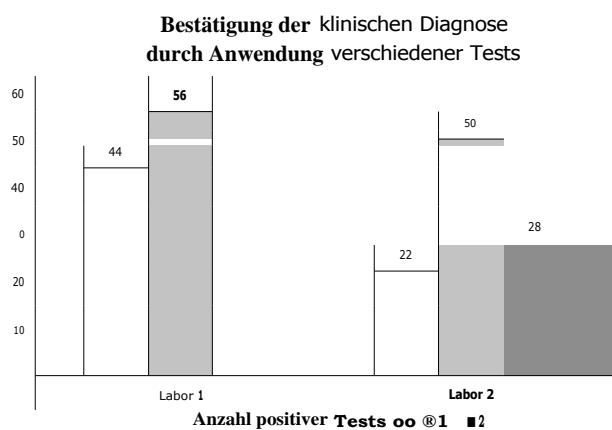


Abb. 2 Wenn die übliche lokale Antikörperdiagnostik eingesetzt wird, kann die Diagnose in gut der Hälfte der Fälle erhärtet werden. Wenn zusätzlich die Erreger-DNA mittels PCR und die Antikörper-Avidität untersucht werden, wird in fast einem Drittel der Proben die Diagnose durch zwei unabhängige Tests bestätigt, was das Risiko falsch-positiver Resultate verringert

Ergebnisse

Der Nachweis von spezifischen Antikörpern und ein adäquates Ansprechen auf die Therapie bei allen Patienten untermauert die klinische Diagnose in allen 27 Fällen.

Von den 27 Probenpaaren aus Kammerwasser und Serum wurden neun in das erste Labor (Gruppe 1) und achtzehn in das zweite Labor (Gruppe 2) eingeschickt.

Insgesamt konnte die Diagnose aufgrund der Laborresultate in 5/9 (56%) der in Labor 1 untersuchten und in 14/18 (78%) der in Labor 2 analysierten Kammerwasser- und Serum-Proben, also in insgesamt 19/27 Fällen (70%) gesichert werden (**Tabelle 2**).

Keine einzelne Methode erreichte eine ausreichende Sensitivität, um für sich die Diagnose sichern bezie-

hungsweise ausschließen zu können, wobei die Berechnung des Goldmann-Witmer-Koeffizienten mit 41% die höchste Sensitivität aufwies, gefolgt vom Erreger-Nachweis mittels PCR mit 28%, Vergleich von IgA in Kammerwasser und Serum mit 19% und der Bestimmung der Antikörper-Avidität mit 18% (**Abb. 1**).

Trotz Anwendung aller Methoden konnte in Labor 1 in 44% und in Labor 2 in 22% die klinische Diagnose nicht bestätigt werden. Andererseits war bei Anwendung aller Methoden eine Diagnosesicherung durch zwei unabhängige Methoden in immerhin 28% möglich (**Abb. 2**).

Diskussion

Nach den hier präsentierten Ergebnissen läßt sich eine Bestätigung der klinischen Diagnose in vier von fünf Fällen nur dann erreichen, wenn Kammerwasser und Serum parallel untersucht werden und alle derzeit verfügbaren Methoden zum Einsatz kommen. Bei Anwendung der üblichen Labordiagnostik (Bestimmung von spezifischem IgG, IgA und IgM), wie in einem der beiden von uns gewählten Referenzlaboratorien geschehen, gelingt die Diagnosesicherung trotz Vorderkammerpunktion nur in etwa der Hälfte der Fälle (5,16,17).

Keine der von uns untersuchten Methoden war für sich alleine genommen sensitiv genug, um als alleinige Untersuchungsmethode empfohlen werden zu können. Die Bestimmung des Antikörper-Koeffizienten nach der von Goldmann und Witmer 1954 erstmals für die Diagnostik der Leptospirose des Pferdes angewandten Methode (12) ist zwar die älteste der analysierten Methoden, erwies sich dennoch aber als nach wie vor für sich alleine am aussagekräftigsten, wie auch von anderen Untersuchern gefunden wurde (16, 17, 18, 19). Erstaunlicherweise fehlt für diese Methode jedoch bisher eine Definition von Sensitivität und Spezifität, sodaß der prädiktive Wert der Analyse nach wie vor nicht abgeschätzt werden kann. Die Kalkulation des C-Koeffizienten für

Antikörper gegen verschiedene Infektionen zeigt entsprechend in einem bestimmten Anteil der Proben eine Erhöhung für mindestens zwei Infektionen. Dies liegt an einer unspezifischen poliklonalen B-Lymphozytenstimulation (20), die einen — bisher unbekannt — Anteil an falsch positiven Resultaten nach sich zieht (21). Nach Ausschluß der mehrfach-positiven Proben wird schließlich eine Bestätigung der Diagnose in nur 38% erreicht (19, 21).

Bisher ist wenig über die Aussagekraft der Antikörper-Avidität bei okulärer Toxoplasmose bekannt. Offensichtlich ist bei Patienten mit okulärer Toxoplasmose die Antikörper-Avidität im Kammerwasser deutlich niedriger als im Serum (22). Immerhin war bei 85% unserer Patienten eine relativ hohe Avidität von 0,7-0,8 und kein Unterschied in der Avidität zwischen Kammerwasser und Serum zu finden.

Der Nachweis der Erreger-DNA wurde mit großer Hoffnung nach der Einführung der DNA-Amplifikation (PCR) in die Routine-Diagnostik von vielen Autoren propagiert (z. B. 23, 24), offensichtlich ist aber, wie auch in persönlichen Gesprächen von diesen Gruppen zu erfahren ist, die anfängliche Euphorie gewichen. Ein Nachweis der Erreger-DNA aus dem Kammerwasser in 28% im hier vorgestellten Kollektiv entspricht der heutigen Einschätzung der Sensitivität der Methode (17, 25).

Nach unseren Ergebnissen erreicht damit erst die Kombination aller Methoden einen ausreichend hohen prädiktiven Wert, um eine Vorderkammerpunktion als diagnostische Maßnahme in unklaren Fällen zu rechtfertigen. Die Anzahl der bisher analysierten Proben erlaubt noch keine definitiven Aussagen über den prädiktiven Wert der Kammerwasser-Diagnostik. Ein weiteres Ziel für die Fortführung der Studie ist die Ausarbeitung eines Diagnostik-Score-Systems. Dieses dürfte eine Vereinfachung in der Bewertung der Laborresultate bedeuten und eine weitere Verfeinerung der diagnostischen Strategie erlauben.

Literatur

- Holliman RE, Stevens PJ, Duffy KT, Johnson JD. The serological investigation in ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1991; 75:353-3555
- Tabbara KF. Toxoplasmosis. In Duane E (ed) *Clinical Ophthalmology*, Churchill Livingstone-Verlag London, 1994; 4 (46) : 1-23
- ³ de Jong PT. Ocular toxoplasmosis; common and rare symptoms and signs. *Int Ophthalmol* 1989;13 : 391-397
- ⁴ Johnson MW, Greven CM, Jaffe GJ, et al. *Ophthalmology* 1997; 104:48-57
- ⁵ Rothova A. Ocular involvement in toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1993;77:371-377
- ⁶ Jennis F. Toxoplasmosis: An epidemiological study. *Aust Ann Med* 1966;15:157-161
- ⁷ Damms T Böhnke M, Behrend-Berdin B, Laufs R. Antikörpertiter gegen *Toxoplasma gondii* bei Uveitiden toxoplasmotischer and anderer Genese. *Fortschr Ophthalmol* 1991; 88 : 154-157
- ⁸ Perkins ES. Ocular Toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1973; 57 :1-17
- ⁹ Rothova A, van Knapen F, Baarsma GS, Kruit PJ, Loewer-Sieger DH, Kijlstra A. Serology in ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1986;70:615-622
- ¹⁰ Duke-Elder S. *System of Ophthalmology*, Vol. 9: Diseases of the Uveal Tract. H. Kimpton-Verlag, London, 1966: 418-419
- ¹¹ Folk JC, Lobes LA. Presumed toxoplasmic papillitis. *Ophthalmology* 1984; 91: 64-66
- ¹² Goldmann H, Witmer R. Antikörper im Kammerwasser. *Ophthalmologica* 1954;127:323-330
- ¹³ Desmots G. Definitive serological diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Arch Ophthalmol* 1966; 76: 839-851
- ¹⁴ Hedman K, Lappalainen M, Söderlund M, et al. *Rev Med Microbiol* 1993;3:123-129
- ¹⁵ Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. *J Clin Microbiol* 1996; 34 : 2850-2852
- ¹⁶ Kijlstra A, Luyendijk L, Baarsma GS, Rothova A, Schweitzer CM, Timmerman Z, et al. Aqueous humor analysis as a diagnostic tool in toxoplasma uveitis. *Int Ophthalmol* 1989;13: 383-386
- ¹⁷ de Boer JH, Verhagen C, Bruinenberg M, et al. *Am J Ophthalmol* 1996;121:650-658
- ¹⁸ Baarsma GS, Luyendijk L, Kijlstra A, et al. *Am J Ophthalmol* 1991; 112:147-150
- ¹⁹ Bornand JE, de Gottreau P. Uveitis: Is Ocular Toxoplasmosis only a Clinical Diagnosis? *Ophthalmologica* 1997; 211:87-89
- ²⁰ Kahn LS, Schlaegel Jr TF, Weber JC, Biegel A. Serum immunoglobulins and uveitis. *Arch Ophthalmol* 1983;101:458-459
- ²¹ Dussaix E, Cerqueti PM, Pontet F, et al. *Ophthalmologica* 1987; 194:145-149
- ²² Vinhal FA, Pena JD, Katina JH, Brandao EO, Silva DA, Ore fce F, Mineo JR. Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis: detection of low avidity IgG specific to *Toxoplasma gondii*. *Appl Parasitol* 1994; 35 :1-7
- ²³ Brezin AP, Eqwuagu CE, Silveira C, Thulliez P, Martins MC, Mandi RM, Belfort Jr R, Nussenblatt RB. Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis. (Letter) *New Engl J Med* 1991; 324: 699
- ²⁴ Aouizerate F, Cazenave J, Poirier L, Verin P, Cheyrou A, Begueret J, Lagoutte F. Detection of *Toxoplasma gondii* in Aqueous Humor by the Polymerase Chain Reaction. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:107-109
- Garweg J, Böhnke M, Körner F. Restricted applicability of the polymerase chain reaction for the diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Ger J Ophthalmol* 1995; 5:104-108