

Annex 1)

Analyse der Wasserproben aus Thermalbädern: Identifikation der isolierten Amöben und deren potentiellen Pathogenität

Institut für Parasitologie der Universität Bern

Zweck des Dokumentes

Der Zweck dieses Dokumentes ist es, in kurzer zusammenfassender Form über die Auswertung der Wasserproben aus den folgenden Thermalbädern zu informieren: Thermalbad Zurzach, Aquarena Bad Schinznach, Kurzentrum Rheinfelden und Thermalbad Baden. Es wird somit auf Bildmaterial (photographische Dokumentation der Isolate, Aufnahmen der Histologie-Schnitte und der PCR-Gele) wie auch auf den ausführlichen Beschrieb der einzelnen Methoden verzichtet. Die Probenahme erfolgte im Rahmen des Amöbenprojektes am Institut für Parasitologie in Bern unter der Aufsicht von Frau Regula Ryter vom Kantonalen Labor des Kanton Aargaus.

Einleitung

Der grösste Teil der frei lebenden Amöben (FLA) stellt für den Menschen kein gesundheitliches Risiko dar. Gewisse FLA wie *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. sowie *Balamuthia mandrillaris* können entweder ins zentrale Nervensystem (ZNS) gelangen und dort schwerwiegende Entzündungen und Gewebeschäden verursachen, oder sie können auch die Kornea besiedeln und dort zu Augenschäden führen. Während schwerwiegende Infektionen mit *N. fowleri* vor allem bei jungen männlichen Personen beobachtet werden, treten zerebrale Infektionen mit *Acanthamoeba* spp. praktisch ausschliesslich bei Person mit geschwächtem Immunsystem auf. *Acanthamoeba* spp. können zusätzlich auch in der Lunge, auf der Haut sowie auf der Hornhaut der Augen (Keratitis) Gewebeschäden verursachen.

Ziel der Studie

Ziele der hier vorgestellten Studie waren: a) Wasserproben aus vier Thermalbädern im Kanton Aargau auf das prinzipielle Vorhandensein frei lebender Amöben zu untersuchen, b) deren Cytotoxizität zu evaluieren (*in vivo*) sowie c) mittels PCR und Sequenzanalysen die Isolate sowie deren potentieller Pathogenität für den Menschen zu bestimmen (*in vivo*).

a) Analyse Wasserproben auf FLA

Ort der Probenentnahme	ID Probe	Wassertemp.	Isolation
Zurzach, Beckenreservoir	zz1	40.0°C	-
Zurzach, Frischwasserreservoir	zz2	37.0°C	+
Zurzach, nach Sandfiltration	zz3	34.0°C	+
Zurzach, nach Ozonbehandlung	zz4	34.0°C	-
Zurzach, nach Entgasen	zz5	34.5°C	-
Zurzach, Becken 1	zz6	34.3°C	+
Zurzach, Becken 2	zz7	35.0°C	-
Zurzach, Becken 3	zz8	36.0°C	-
Zurzach, Becken 4	zz9	35.1°C	-
Aquarena, Becken Thermi	a	35.3°C	-
Aquarena, vor Sandfiltration/Ozonisierung	b	35.3°C	+
Aquarena, nach Sandfiltration/Ozonisierung	c	35.3°C	+
Aquarena, Ozonisierung mit Vorozon	d	35.3°C	-
Aquarena, Ausgleichsbecken	e	35.3°C	-
Aquarena, Whirlpool	f	37.0°C	-
Aquarena, Innenbad	g	35.2°C	-
Aquarena, Aussenbad	h	35.2°C	-
Aquarena, Flussbad (draussen)	i	35.2°C	-
Rheinfelden, vor Filter 1 (Druck-Sandfilter)	1	33.0°C	-
Rheinfelden, Rückspülwasser Filter 1	2	33.0°C	-
Rheinfelden, vor Filter 2 (abgestand. Wasser)	4	34.0°C	+
Rheinfelden, nach Filter 2	5	34.0°C	-
Rheinfelden, Absenkbecken Filter 2	6	34.0°C	+
Rheinfelden, Rückspülwasser Filter 2	7	34.0°C	+
Rheinfelden, vor Filter 2 (Leitung gespült)	8	34.0°C	-
Rheinfelden, Hallenbad (nach Rückspülung)	9	34.0°C	-
Rheinfelden, Freibad (nach Rückspülung)	10	34.0°C	-
Baden, Innenbad nach Sandfilter	A	35.2°C	+
Baden, Aussenbad nach Sandfilter	B	36.0°C	-
Baden, Innenbad Becken	C	35.2°C	-
Baden, Aussenbad Becken	D	36.0°C	-

Tabellarische Übersicht über die genauen Orte der Probenahme, die Bezeichnung der Wasserprobe (ID Probe) und die aktuelle Wassertemperatur am Ort der Probenahme (Wassertemp.). + (Isolation) heisst, dass aus der entsprechenden Wasserprobe FLA isoliert wurden. Die Isolation der Amöben im Labor erfolgte bei 37°C.

b) Cytotoxisches Potential und Thermotoleranz der Isolate

Pathogenic species	cytotoxicity (25°000/2500/250)		growth (25°000/2500/250)		viability	thermotolerance 18°C/37°C/42°C		
	day 2	day 5	day 2	day 5				
<i>N. fowleri</i>	1/4/4	1/1/1	0/0/0	3/3/3	+	+	+	+
<i>B. mandrillaris</i>	4/4/4	1/1/1	3/2/1	3/3/3	+	+	+	+
<i>A. lenticulata</i>	4/4/4	1/1/1	0/0/0	3/3/3	+	+	+	+
non-pathogenic species								
<i>Vannella persistens</i>	4/4/4	2/4/4	0/0/0	0/0/0	-	+	+	-
<i>Hartmannella</i> sp.	3/3/3	2/2/2	0/0/0	0/0/0	-	+	+	-
Isolates								
zz2	4/4/4	3/3/3	0/0/0	0/0/0	-	+	+	+
zz3	1/3/4	1/3/4	0/0/0	0/0/0	-	+	+	-
zz6	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-	+	+	-
b	4/4/4	1/1/1	0/0/0	3/2/1	+	+	+	+
c	4/4/4	1/3/4	0/0/0	3/2/1	+	+	+	+
4	4/4/4	1/3/4	0/0/0	3/2/2	+	+	+	+
6	4/4/4	1/1/1	0/0/0	2/2/1	+	+	+	+
7	1/4/4	1/1/1	3/1/0	3/3/2	+	+	+	+
A	4/4/4	4/4/4	0/0/0	0/0/0	-	+	+	+

Die Isolate wurden mit Mäusefibroblasten co-kultiviert. Ausgewertet wurde der an den Fibroblasten verursachte Schaden (Cytotoxicity) am Tag 2 und 5 der Co-Kultivierung (4 = kein Schaden; 1 = alle Zellen geschädigt) sowie das Wachstum der Isolate in Co-Kultur (growth; 0 = kein Wachstum; 3 = maximales Wachstum). Zusätzlich wurde die Thermotoleranz der Isolate erfasst. In Klammer ist die Anzahl Amöben angegeben, welche für die Co-Kultivierung verwendet wurde.

Isolate, welche ein ähnliches Profil wie die humanpathogenen *N. fowleri*, *B. mandrillaris* und *A. lenticulata* aufwiesen, d.h. eine hohe Cytotoxizität, maximales Wachstum sowie eine erhöhte Thermotoleranz (Wachstum bei 42°C) wurden als potenziell pathogen eingestuft, und im Tiermodell auf deren Pathogenität untersucht (siehe c). Nicht-pathogene FLA, wie z.B. *V. persistens* verfügen über keine bis geringe Cytotoxizität, vermehren sich in Co-Kultur nicht und tolerieren keine Temperaturen über 37°C.

c) Bestimmung der Isolate und deren Pathogenität *in vivo*

isolate	ID of isolate	Time point of death in days after infection (isolation of trophozoites)					
		immunocompetent			immunodeficient		
		1	2	3	1	2	3
b	<i>Acanthamoeba healyi</i>	a (-/-/-)	a (-/-/-)	n.d.	11 (n/l/b)	a (n/-/-)	n.d.
4	<i>Acanthamoeba healyi</i>	a (-/-/-)	a (-/-/-)	n.d.	8 (n/l/b)	10 (n/l/b)	n.d.
6	<i>Acanthamoeba healyi</i>	8 (-/-/b)	a (-/-/-)	n.d.	5 (n/l/b)	6 (-/-/b)	n.d.
7	<i>Acanthamoeba healyi</i>	a (-/-/b)	a (n/-/b)	n.d.	3 (n/-/-)	9 (n/-/b)	a (n/-/-)
zz2	<i>Platyamoeba stenopodia</i>						
zz3	<i>Hartmannella</i> sp.						
zz6	<i>Echinamoeba exundans</i>						
c	<i>Acanthamoeba</i> sp.						
A	<i>Echinamoeba exundans</i>						

1, 2, 3 indicate single animals

a: alive; n.d.: not done; (n/l/b): nose, lung, brain

Mit den unter b) als potenziell pathogen eingestuften Isolaten (b, 4, 6, und 7) wurden Mäuse via Nase infiziert (1, 2, 3 bezeichnet je ein Individuum). Es wurden sowohl immunkompetente wie auch immundefiziente Mäuse infiziert. Die Zahl vor der Klammer entspricht dem Zeitpunkt des Todes (in Tagen nach der Infektion). Die Angaben in der Klammer dokumentieren, aus welchen Organen (Nase, Lunge, Hirn) nach der Biopsie Amöben isoliert wurden. Alle Versuchstiere wurden, falls nicht schon vorher gestorben, 40 Tage nach der Infektion euthanasiert (a).

d) Zusammenfassung der Studie

Von total 31 Wasserproben aus vier Thermalbädern waren neun positiv, d.h. es konnten FLA isoliert werden. Vier Isolate wurden als potenziell pathogen eingestuft und im Tiermodell auf ihr pathogenes Potenzial geprüft. In immundefizienten Mäusen führte die Infektion zum Tod der Tiere. Bei den Tieren mit intaktem Immunsystem starb nur ein Tier, bei einem weiteren Tier konnten, ohne dass Symptome aufgetreten wären, Amöben aus dem Hirn isoliert werden.

Alle pathogenen Isolate konnten als *A. healyi* identifiziert werden. Alle anderen Isolate gelten für den Menschen als ungefährlich. *N. fowleri* und *B. mandrillaris* wurden in den Proben **nicht** nachgewiesen.

Als schlussfolgernde Aussagen kann festgestellt werden: a) Grundsätzlich können in Thermalgewässern Acanthamoeben nachgewiesen werden (dies in Übereinstimmung mit der in der Literatur veröffentlichten Resultaten ähnlicher Studien aus dem Ausland); *Acanthamoeba* spp. gelten als die am häufigsten vorkommenden Amöben mit Pathogenitätspotenzial überhaupt, sie können weltweit auch sehr häufig isoliert werden. b) Weil diese Amöben in den Thermalbecken aber nicht mehr nachgewiesen werden konnten, d.h. dass sie während der Filtrationsschritte erfolgreich eliminiert wurden, besteht für Thermalbäder **keine** etwelche Gefährdung des Menschen.