

Institut für Parasitologie, Länggassstrasse 122, CH-3012 Bern

Dr. Nadia Schürch
BABS/VBS
Labor Spiez
CH-3700 Spiez

Vetsuisse Fakultät und
Medizinische Fakultät

Institut für Parasitologie



STS 251
(ISO 17025)

Bern, den 7.3.2009

Zwischenbericht für das Projekt. Nr. 353000002

➤ Projekttitel

Untersuchung des Lebensraums von freilebenden pathogenen Amöben [FLA] (*Naegleria fowleri* und andere)

➤ Einleitung

Freilebende Amöben (FLA) stellen einen wesentlichen Bestandteil der natürlichen Wasser- und Bodenflora dar. Innerhalb dieser natürlichen Flora kommen wenige Arten vor, die unter noch wenig definierten Umständen den Menschen infizieren können, dies dann allerdings mit schweren oder sogar lethal verlaufenden Folgen bzw. Krankheitsverläufen (Beispiele von Keratitis bis PAM: *primary amoebic meningoencephalitis*). *Naegleria fowleri* gilt als die gefährlichste Art, und wird immer wieder in Zusammenhang gebracht mit potenziellem Bioterrorismus. Im Rahmen des laufenden Forschungsprojektes zur Erforschung der potenziellen Bedeutung solcher FLA in der Schweiz wurden in der vorliegenden Berichtsperiode folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1 Vertiefte und zielgerichtete epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von pathogenen freilebenden Amöben in verschiedenen Gewässern der Schweiz, einschliesslich Thermalbäder.
- 2 Ausweitung des Spektrums diagnostischer Werkzeuge mit dem Ziel, ein diagnostisches Kompetenzzentrum zu etablieren und alle epidemiologisch relevanten FLA diagnostizieren zu können.
- 3 Weiterführung der Suche nach Pathogenitätsfaktoren von FLA, mit dem Ziel, diese als epidemiologische Gefahrenmarker sowie als potenzielle Behandlungsziele verwenden zu können.

➤ Personelle Situation (Stand 1.3.2009)

MA am Institut für Parasitologie:

- Béatrice Zumkehr (Biomed. Analytikerin; 50%) [Projekt-bezahlt]
- Prof. Dr. N. Müller (10%)
- Prof. Dr. B. Gottstein (10%)

Assoziierte und/oder mitbeteiligte Wissenschaftler/techn. Personal:
 - Fritz Wüthrich (Labor Spiez)

➤ **Gegenwärtiger Stand der Arbeiten**

Zum Ziel 1a) „Feldstudie“ Gewässer Schweiz : Eine erste Übersichtsarbeit über das Vorkommen von potenziell pathogenen FLA in Schweizer Gewässern ist nun abgeschlossen (siehe auch frühere Berichte), die Arbeit wurde als Publikation zusammengeschrieben und bei einer Fachzeitschrift (Research in Microbiology) eingereicht.
 Im Folgenden, als Bericht, die zum Manuskript gehörende Zusammenfassung der Studienergebnisse:

„Free-living amoebae (FLA) including *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* and *Sappinia diploidea* can act as opportunistic parasites that can lead to severe brain pathologies. Human infections with pathogenic FLA have been increasingly documented in many countries. In Switzerland, so far, the occurrence and distribution of potentially pathogenic FLA has not been investigated yet. A selection of Swiss water biotopes, including swimming pools, lakes, rivers and ponds, has now been screened for FLA, including a subsequent assessment of their potential of pathogenicity for a mammalian host. Thus, a total of 17 isolates were recovered by *in vitro* cultivation from these different aquatic biotopes. Characterization by sequence analysis of *Acanthamoeba* spp.-specific and 'FLA'-specific PCR products amplified from 18s rDNA, by morphological traits, thermotolerance, and cytotoxicity towards fibroblast cells yielded the following findings: *Echinamoeba exundans* (3 isolates), *Hartmannella* spp. (3), *Vannella* spp. (4), *Protacanthamoebica bohemica* (1), *Acanthamoeba castellani* (1), and *Naegleria* spp. (5). *B. mandrillaris* and *N. fowleri* did not range amongst these isolates. All isolates lacked of pronounced cytotoxicity and failed to grow at 42°C, and therefore do not present any potential of CNS-pathogenicity for humans.“

Ziel 2) Ausweitung des Spektrum diagnostischer Werkzeuge.

In den vorangegangenen Berichtsperioden haben wir bereits über eine PCR (FLA-PCR) zum Nachweis und Typisierung (mittels zusätzlicher Sequenzierung) von freilebenden Amöben im Allgemeinen berichtet. Außerdem wurden PCRs zum spezifischen Nachweis von *Acanthamoeba* spp. sowie *Naegleria fowleri* ausgearbeitet und bezüglich deren diagnostischen Anwendung optimiert. In der aktuellen Berichtsperiode konnte an unserem Institut die Palette der molekularbiologischen Tests im Bereich freilebender Amöben vervollständigt werden, indem eine *Balamuthia mandrillaris*-spezifische PCR etabliert wurde. Dieser Test ist bereits bei der Identifizierung von FLA-Isolaten aus schweizerischen Gewässern erfolgreich eingesetzt worden.

Ziel 3) Pathogenitätsfaktoren.

Bei diesem Projektteil wurden im Berichtsjahr einige grundlegende Experimente als Vorbereitung für die Hauptexperimente für das kommende Jahr (2009) durchgeführt: „Aktivierung“ bzw. „Pathogenisierung“ von *N. fowleri* durch Passage auf Säugetierzellen (L929), mit Kontrollkulturen ohne entsprechenden Säugetierzellkontakt. Isolierung von mRNA sowie von Proteinextrakten zur anschliessenden <komparativen> differentiellen Analyse betr. Genexpressions- bzw. Proteinmuster.

➤ Schlussfolgerungen/ Ausblick

Im Jahr 2008 wurde das Schwerpunkt der Arbeiten einerseits auf den Abschluss der ersten FLA-Feldstudie gelegt, andererseits auf die Erarbeitung bzw. Vervollständigung der Palette an diagnostischen Werkzeugen, welche auf einen akkreditierbaren Stand gebracht wurden (einschl. der dazu notwendigen Validierung), sowie auf Vorbereitungsexperimente für darauf folgende Vergleichsstudien von Genexpressions- und Proteinmuster bei „aktivierten“ versus „nicht-aktivierten“ Naeglerien.

Für das Jahr 2009 sind folgende weiterführende Arbeiten geplant:

1. Einrichtung von künstlichen Labormodellen (in vitro Kultivierung) zur Nachahmung verschiedener Gewässerstrukturen und -qualitäten (Temperatur, Wasserqualität; Kontakt mit anderen Organismen bzw. Säugetierzellen, etc.), sowie Abklärung, ob bestimmte Gewässer das ökologische Potenzial zum Überleben bekannter pathogener FLA beherbergen (Risikoabschätzung).
2. Untersuchung der Porinexpression (sowie der Expression anderer Pathogenitätsfaktoren) im Zusammenhang mit der Virulenzsteigerung durch Säugetierzellkontakt.

➤ Publikationen / Kongressteilnahme (2007-2009)

Schild M, Gianinazzi C, Gottstein B, Müller N: PCR-based diagnosis of *Naegleria* spp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J Clin Microbiol.* 45: 564-567 (2007).

Gianinazzi C, Schild M, Wüthrich F, Müller N, Schürch N, Gottstein B: Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Exp Parasitol.* 2009 Feb;121(2):180-6.

Gianinazzi C, Schild M, Wüthrich F, Müller N, Ben Nouir N, Füchsli HP, Schürch N, Gottstein B: Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Research in Microbiology* (submitted).