

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**



Bern, den 16.09.2008

Bericht für das Projekt. Nr. 350001627 (Berichtsjahr 2007)

➤ **Projekttitle**

Nachweis von freilebenden pathogenen Amöben [FLA] (*Naegleria fowleri* und andere FLA)

➤ **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 Projektes zur Erforschung der potenziellen Bedeutung solcher FLA in der Schweiz wurden in der vorliegenden Berichtsperiode folgende Fragestellungen bearbeitet (**Ziele**):

- 1 Vertiefte und zielgerichtete epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von pathogenen freilebenden Amöben (FLA) 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 Behandlungszielstrukturen der Parasiten verwenden zu können.

➤ **Personelle Situation (2007)**

MA am Institut für Parasitologie:

- Dr. Christian Gianinazzi (Post-Doc, 100%) [Projekt-bezahlt]
- Marc Schild (Laborant (50%) [Projekt-bezahlt]
- Prof. Dr. N. Müller (10%)
- Prof. Dr. B. Gottstein (10%)

**Prof. Dr. Bruno
Gottstein**
Direktor
Institut für
Parasitologie
Universität Bern
Länggassstrasse 122

Tel. +41 (0)31 631 24 18
Fax +41 (0)31 631 26 22
bruno.gottstein@ipa.unibe.ch
<http://www.vetmed.unibe.ch>

Assoziierte und/oder mitbeteiligte Wissenschaftler/techn. Personal:

- Dr. Nadia Schürch, Fritz Wüthrich (Labor Spiez)
- Frau Regula Ryter vom Kantonalen Labor des Kantons Aargau

➤ Ergebnisse zu den verschiedenen Studien

Zum Ziel 1a) „Feldstudie“ Gewässer Schweiz.

Dieser Projektteil hatte zum Ziel, die Verbreitung von pathogenen freilebenden Amöben (FLA) in verschiedenen Gewässern der Schweiz zu untersuchen. Im Folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse in Form einer englischen Zusammenfassung wiedergegeben, der Text wurde dem sich in Vorbereitung befindlichen Manuskript entnommen: “In Switzerland, no studies have been carried out with regard to pathogenic FLA so far. For this reason, the present study aimed at identifying FLA species occurring in selected Swiss waters including swimming pools, lakes, rivers and ponds, and evaluating their potential pathogenicity for humans. The isolates were characterized by sequence analysis of PCR products obtained from 18S rDNA (*Acanthamoeba* spp.-specific and `FLA`-specific PCR, respectively), morphological traits, thermotolerance, and cytotoxicity towards fibroblast cells. The isolates were identified as *Echinamoeba exundans* (3), *Hartmannella* spp. (3), *Vannella* spp. (4), *Protacanthamoebica bohémica* (1), *Acanthamoeba castellanii* (1), and *Naegleria* spp. (5). *B. mandrillaris* and *N. fowleri* were not amongst the isolates. The isolates displayed no pronounced cytotoxicity and failed to grow at 42°C, and can therefore be considered as non CNS-pathogenic for humans.”

Im Rahmen dieser Feldstudien wurde ein FLA-Isolat gewonnen, welches ein ausgeprägtes Pathogenitätspotenzial aufwies, und somit gesondert weiter untersucht wurde: “The present study reports on *Acanthamoeba* isolated in a heated swimming pool during routine water analysis. The isolate displayed a high thermotolerance, being able to grow at 42°C, and exhibited a marked *in vitro* cytotoxicity. Experimental intranasal infection of Rag2-immunodeficient mice resulted in the death of all animals within 24 days. Histopathological investigation of brains and lungs revealed massive proliferation of amoebae within the tissues. PCR and sequence analysis, based on 18S rDNA, identified the agent as *Acanthamoeba lenticulata*. In summary, the present study reports on a *Acanthamoeba* isolate from a public heated swimming pool suggestive of being potentially pathogenic to immunocompromised persons.”

Zum Ziel 1b) „Feldstudie“ Thermalbäder Schweiz

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

Siehe gesonderten Abschlussbericht von Dr. C. Gianinazzi (Annex 1)

Ziel 2) Ausweitung des Spektrum diagnostischer Werkzeuge.

Im Rahmen der Unterprojekte 1a) und 1b) wurden diverse PCRs bzw. Primers kreiert und anschliessend evaluiert, welche geeignet sind, die verschiedensten in schweizerischen Gewässern vorkommenden FLA molekularbiologisch zu erfassen und mittels Sequenzierung zu typisieren.

Ziel 3) Pathogenitätsfaktoren.

Wie in der Einleitung bereits angedeutet, besitzen FLA wie *Acanthamoeba spp.* und *Naegleria fowleri* das Potenzial, in Mensch und Tier opportunistische und nicht-opportunistische Infektionen wie z. B. die tödlich verlaufende primäre Amöben-Meningoenzephalitis (PAM) zu verursachen. Es wird vermutet, dass die mit der Infektion verbundenen zytolytischen Prozesse durch Adhension der FLA an die Wirtszellen eingeleitet werden. Diese Wechselwirkung verläuft über Glykolipide und Glykoproteine und bewirkt die Lyse der Wirtszelle auf mechanische Weise sowie durch die Ausschüttung von Cysteinproteinasen und gleichzeitiger Phagozytose. Als Patogenitätsfaktoren kommen auch die Poren-bildenden Peptide von *N. fowleri*, genannt Naegleriaporine in Frage. Die Beteiligung der oben genannten Komponenten in der Pathogenese bei FLA Infektionen wurde jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt experimentell nicht bewiesen. Um die Beteiligung der oben genannten Faktoren in der FLA-induzerten Pathogenese experimentell zu verifizieren, beabsichtigen wir in unserem Projekt, axenisch kultivierte, apathogene *N. fowleri* Trophozoiten durch mehrfache Passsage in Anwesenheit von Säugerzellen (xeniische Kulturen) in pathogene Trophozoiten zu konvertieren. Durch einen Vergleich der Genexpressionsmuster apathogener versus pathogener Naeglerien soll dann herausgefunden werden, ob die in vitro-induzierte Konversion der Trophozoiten zu pathogenen Erregern mit einer Stimulation von Naegleriaporin, Cysteinproteinasen und bestimmter Virulenzfaktoren wie das sogenannte Nf314 Protein einhergeht. Im Zusammenhang mit dieser Studie haben wir bereits verschiedene real-time RT-PCR Assays entwickelt, die eine genaue Quantifizierung der Genexpression der oben erwähnten potenziellen Pathogenitätsfaktoren erlaubt. Diese Tests können dann eingesetzt werden, wenn in unserem BL-3 Labor die in vitro Konvertierung von *N. fowleri* in die pathogene Form erfolgt ist.

➤ **Schlussfolgerungen/ Ausblick**

Im Jahr 2007 wurde das Schwergewicht der Arbeiten einerseits auf die Erfassung von FLA gelegt, welche in schweizerischen Gewässern bzw. Thermalbädern vorkommen, andererseits auf die Erarbeitung bzw. Vervollständigung der Palette an diagnostischen Werkzeugen, welche zur Identifizierung dieser FLA eingesetzt werden können (einschl. der dazu notwendigen Validierung).

Für das Jahr 2008 sind folgende weiterführende Arbeiten geplant:

- 1) Untersuchung der Überlebensfähigkeit von pathogenen FLA in verschiedenen Gewässertypen in der Schweiz (in vitro – Modelle)
- 2) Untersuchung des Potenzials von FLA, über welchen Zeitraum und unter welchen Bedingungen (in vitro) sie ihren Pathogenitätsstatus aufrecht erhalten können.

➤ **Publikationen / Kongressteilnahme (2007)**

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. (in preparation).

Gianinazzi C, Schild M, Schnell B, Müller N, Schürch N, Gottstein B: Pathogenic free-living amoeba: diagnostic tools and research focus Joint meeting of the Swiss, German and French Societies of Tropical medicine and Parasitology, Strasbourg, June 13-16, 2007

Gianinazzi C: Vorkommen freilebender Amöben in der Schweiz. Weiterbildungsseminar am Labor Spiez (VBS), Spiez, 31.10.2007.

Gottstein B: Freilebende Amöben: Einführung in die Parasitologie. Weiterbildungsseminar am Labor Spiez (VBS), Spiez, 31.10.2007.