

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 175
(ISO 17025)

Bern, den 16.11.2010

Schlussbericht für das Projekt. Nr. 35001080

➤ **Projekttitle**

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: PAM, *primary amoebic meningoencephalitis*; GAE, *granulomatous amebic encephalitis*). *Naegleria fowleri* gilt als die gefährlichste Art, und wird immer wieder in Zusammenhang gebracht mit potenziellem Bioterrorismus. Im Rahmen des abgeschlossenen Forschungsprojektes zur Erforschung der potenziellen Bedeutung solcher FLA in der Schweiz wurden diverse Fragestellungen bearbeitet. Zu bemerken bleibt, dass die strategische und operative Orientierung des Projektes Ende 2009 in Zusammenarbeit mit Dr. Nadia Schürch sowie Dr. Mathias Wittwer neu ausgerichtet wurde, so dass bereits ab Beginn 2010 neue Schwerpunkte in unseren gemeinsamen Studien gesetzt wurden.

Folgende Objekte bildeten die Kernpunkte des Projektes:

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 Bioterrorismus).

1.1 Fragestellung

Wachstumsverhalten von apathogenen und pathogenen *N. fowleri* im Wasser bei verschiedenen Temperaturen.

1.2 *Naegleria fowleri* Kultivierung

Prof. Dr. Bruno Gottstein
Direktor
Institut für Parasitologie
Universität Bern
Länggassstrasse 122
CH-3001 Bern

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

Stamm 1: pathogen (xenic)

N. fowleri ATCC 30863, Isolat aus Mausversuch, 01.07.03

Stamm 2: apathogen (axenic)

N. fowleri ATCC 30863, T.W. Holbrook, 15.05.02

N. fowleri ankultivieren im PYNFH Medium. Der pathogene Stamm aus der Maus wurde 2x über L929 Zellen passagiert. Die Pathogenität des Stammes wurde durch intranasale Infektion, von 5×10^5 cells in einer 4-6 Wo alten C57/BL6-Maus überprüft. Maus starb innerhalb von 7-9 Tagen => Isolat gilt als hochpathogen.

1.3 Vorbereitung der Wasserproben

Wasserprobe stammte aus dem Biotop des Tierspitals. Das Wasser wurde sterilfiltriert und in fakultativ anerobe Tubes mit Wattenstopfen verteilt. Anschliessend wurden 1×10^8 cells/mL *Naegleria* zugegeben und bei folgenden Bedingungen inkubiert.

Tube 1: xenischer Stamm, Inkubation @ 20 °C, 2-7 Tage

Tube 2: xenischer Stamm, Inkubation @ 36 °C, 2-7 Tage

Tube 3: axenischer Stamm, Inkubation @ 20 °C, 2-7 Tage

Tube 4: axenischer Stamm, Inkubation @ 36 °C, 2-7 Tage

Wachstum wurde mikroskopisch beobachtet und Zellen ausgezählt.

1.4 Resultate und Auswertung

	2 Tage	cell/mL	7 Tage
xenic 20 °C	vereinzelt Zellanhäufungen sichtbar, kaum intakt, lebende Naeglerien zu erkennen.		alles tot, keine Zysten
xenic 36 °C	bilden Zysten	ca. 10^4	noch einzelne Zysten sichtbar
axenic 20 °C	vereinzelt Zellanhäufungen sichtbar, kaum intakt, lebende Naeglerien zu erkennen.		alles tot, keine Zysten
axenic 36 °C	bilden Zysten	ca. 10^4	einzelne Zysten vorhanden

Es waren keine markanten Unterschiede zwischen dem Wachstum des xenischen und axenischen Stamm zu erkennen. Klar wurde jedoch, dass *Naeglerien* im +20 °C Wasser kaum überleben.

1.5 Weiterführende Experimente

Geplant wurde die Anzucht des xenischen und axenischen Stammes in 3 verschiedenen Gewässerproben (Hahnenwasser, Aarewasser, Biotopwasser) bei 37 °C mit anschliessender Infektion von 6 Mäusen und erneute Rekultivierung. Diese Versuchsserie wurde aus planungstechnischen Gründen (Neuausrichtung der Forschungsobjektive) sistiert.

2. Untersuchung der Porinexpression (sowie der Expression anderer Pathogenitätsfaktoren) im Zusammenhang mit der Virulenzsteigerung durch Säugetierzellkontakt.

Diese Studie beinhaltete erste Untersuchungen zu den bisher unbekannten zellulären Funktionen, die an der Pathogenität von *N. fowleri* beteiligt sind. Hierfür verwendeten wir ein apathogen versus pathogen *in vitro* Modell des Parasiten, welches zwei wichtige experimentelle Eigenschaften aufweist: (i) Kontinuierlich axenisch kultivierte *N. fowleri* Trophozoiten sind völlig apathogen und (ii) xenische Kultivierung (Ko-Kultivierung der Trophozoiten mit L929 Mausfibroblastenzellen) führt zur Konversion der Trophozoiten in eine pathogene Form.

Zur Identifikation von potenziellen Pathogenitätsfaktoren von *N. fowleri* haben wir bereits auf Transkriptionsebene (mittels quantitativer "reverse transcription-PCR") die Genexpressionsmuster der beiden isogenen, jedoch phänotypisch unterschiedlichen, Zelllinien (apathogen versus pathogen) verglichen. Dabei stellten wir fest, dass das Gen des sogenannten Naegleriaporins B in der pathogenen Form des Parasiten stark überexprimiert wird. Von diesem Protein ist bekannt, dass es u.a. an der Zerstörung von Wirtszellgewebe beteiligt ist. Das Gen von Naegleriaporin A sowie die Gene einiger anderer potenzieller Pathogenitätsfaktoren wie die Serin- und Cysteinproteasen zeigten hingegen keine differenzierbaren Expressionsmuster.

Weitere Abklärungen auf Proteinebene und in Tierversuchen müssen nun zeigen, welchen Beitrag das Naegleriaporin B bei der Ausprägung der Pathogenität des Parasiten tatsächlich leistet.

3. Konstruktion und Verwendung von GFP („green-fluorescence-protein“)-exprimierender Naeglerien zur Vereinfachung von Infektionsverlaufsstudien in der Maus sowie für Untersuchungen an *in vitro* Naeglerien-Kulturen gemäss Punkt.

Dieses Studienziel wurde wegen der Neuausrichtung der Versuchsstrategie im Jahr 2009 nicht mehr als relevant taxiert und somit auch nicht mehr experimentell bearbeitet.

Dafür konnten noch folgende zusätzlichen Studien weitergeführt oder entsprechend ausgeweitet werden:

4. Vertiefte und zielgerichtete epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von pathogenen freilebenden Amöben in verschiedenen Gewässern der Schweiz, einschliesslich Thermalbäder:

Es wurden „Feldstudien“ in verschiedenen Gewässern der Schweiz durchgeführt, mit dem Ziel, das Vorkommen von potenziell pathogenen FLA in Schweizer Gewässern zu dokumentieren (siehe auch frühere Berichte). Die Arbeiten wurden als Publikation zusammengeschrieben und bei entsprechenden Fachzeitschriften publiziert. Detailinformationen zu den Studien -> siehe weiter unten aufgeführte Publikationsliste.

5. Ausweitung des Spektrums diagnostischer Werkzeuge mit dem Ziel, ein diagnostisches Kompetenzzentrum zu etablieren und alle epidemiologisch relevanten FLA diagnostizieren zu können.

Zusätzlich zu den in früheren Berichten dargestellten PCRs (FLA-PCR) zum Nachweis und Typisierung (mittels zusätzlicher Sequenzierung) von freilebenden Amöben sowie zum spezifischen Nachweis von *Acanthamoeba* spp. sowie *Naegleria fowleri* 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.

➤ **Schlussfolgerungen/ Ausblick**

Im vorliegenden Projekt wurde das Schwergewicht der Arbeiten einerseits auf den Abschluss früherer Studien gelegt, dann auf die Erarbeitung bzw. Vervollständigung der Palette an diagnostischen Werkzeugen, welche auf einen akkreditierbaren Stand gebracht wurden (einschl. der dazu notwendigen Validierung). Des Weiteren führten wir Basisexperimente zur Erforschung der Umweltbiologie von Naeglerien aus, sowie schliesslich Vorbereitungsexperimente für darauf folgende Vergleichsstudien von Genexpressions- und Proteinmuster bei „aktivierten“ versus „nicht-aktivierten“ Naeglerien. Da im Rahmen einer gemeinsamen (involvierte MA des Instituts für Parasitologie sowie des Labors Spiez) Bearbeitung der Naeglerienproblematik sich ein Defizit in den Grundlagenkenntnissen zur Pathobiologie der Naegleriose herauskristallisierte, wurde das Projekt grundsätzlich neu gestaltet und auf mehr grundlegende Fragestellungen ausgerichtet. Die entsprechenden Zielsetzungen finden sich im Anschlussprojekt Nr. 353002433/Stm.

➤ **Publikationen / Kongressteilnahme (2008-2010)**

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. 121:180-186 (2009).

Gianinazzi C, Schild M, Wüthrich F, Ben Nour N, Fuchsli HP, Schürch N, Gottstein B, Müller N: Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. Res Microbiol. 160: 367-374 (2009).

Gianinazzi C, Schild M, Zumkehr B, Wüthrich F, Nüesch I, Ryter R, Schürch N, Gottstein B, Müller N: Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Experimental Parasitology* 126: 45–53 (2010).

Teilnahme an Kongressen (Vorträge):

Müller, N: Screening of Swiss waterbodies for potentially pathogenic free-living amoebae. 8th International meeting on the biology and pathogenicity of free-living amoebae. Puerto de la Cruz, Tenerife, Spain, May 17-21, 2009

Müller, N: Comparative genomics, transcriptomics, and proteomics approaches for the identification of pathogenicity factors in *Naegleria fowleri*. Workshop Free-living amoebae and *Giardia*. Berlin, Germany, September 30 - October 1, 2010.



Prof. Dr. Bruno Gottstein, 16.11.2010