

OPPORTUNISTISCHE PARASITosen -AKTUELLES UND NEUES

A. Hassl

Einleitung

Infektionserreger, die erst im Rahmen einer Immunschwäche ihre Pathogenität entfalten oder diese zumindest erheblich verstärken (= opportunistische Erreger), haben erst Bedeutung erlangt und damit öffentliche Aufmerksamkeit erregt, als in den letzten Jahren die Zahl immungeschwächter Personen, insbesondere durch HIV-Infektionen oder in Folge von Organtransplantationen, rasant angestiegen ist. Seitdem ist auch das Interesse an diesen früher meist als exotisch eingestuften Keimen stark gestiegen und weltweit wurden zahlreiche Forschungsvorhaben zur Biologie solcher Erreger initiiert. Dieses wissenschaftliche Interesse trägt nun Früchte: Das Wissen über opportunistische Parasiten (erregt durch eukariote, tierische Keime) steigt derzeit sehr rasch an, und die wissenschaftlichen Meinungen zu bestimmten biologischen Phänomenen ändern sich teilweise so grundlegend, daß ich eine aktualisierende Wissensvermittlung an eine interessierte Gemeinde für notwendig halte.

Kürzlich wurden auf zwei Workshops zum Thema Opportunistische Parasitosen (3rd Workshop an Opportunistic Protozoan Pathogens; 24. - 29.6. 1994, Cleveland, Ohio; 3rd BIOMED Workshop "Toxoplasma gondii Research in Europe" im Rahmen des EU-Projekts „Toxoplasmose und AIDS“, 6. - 7.5. 1994, Wien, Österreich) der derzeitige Wissensstand aufgezeigt, und überdies wurden die Trends in der aktuellen Forschung deutlich erkennbar. Die wesentlichsten neuen Ansätze in der Biologie, in der Diagnostik und in der Therapie von opportunistischen Parasiten sollen im folgenden dargestellt werden:

Toxoplasma gondii

Die meisten Neuigkeiten gibt es aus dem Gebiet der Toxoplasmose-Forschung, da ein erheblicher Teil der finanziellen und organisatorischen Unterstützung derzeit hier konzentriert ist. Die Kernfragestellung im Zusammenhang mit Toxoplasma gondii als opportunistischer Erreger ist, welche Faktoren die Reaktivierung latenter Toxoplasma-Infektionen beim Immunsupprimierten bewirken oder die Prognose der Exazerbation beeinflussen. Durch die Klärung dieser Fragen könnten sowohl prognostische Marker definiert werden, als auch die Diagnostik im Bereich des

direkten Erregernachweises erheblich verbessert werden. Die Aktualisierung dieser Fragestellung kam zustande, weil die histochemische Unterscheidung von Tachyzoiten (= rasch vermehrungsfähige Parasiten in den sogenannten Pseudozysten) und Bradyzoiten (Dauerstadien in den Gewebezysten) durch monoklonale Antikörper möglich wurde. Der Übergang von einer in die andere Form erfolgt in jeder Parasitenpopulation innerhalb kurzer Zeit (72 Stunden) und kann spontan, und das sogar in der Zellkultur, beobachtet werden. Diese Beobachtung spricht sehr dafür, daß die Stadienumwandlung kein durch die spezifische Immunreaktion des Wirtes erzwungenes Ereignis ist, wie bisher angenommen, sondern durch eine Änderung der intrazellulären „Umwelt“ des Erregers bedingt wird. Gesteuert wird dieses Ereignis vermutlich durch die Menge an intrazellulär verfügbarem Stickoxid, welches wiederum durch die γ -Interferon-Produktion beeinflusst wird. Diese Hypothese wird gestützt durch Studien mehrerer Gruppen, die zeigen konnten, daß es nach einer Toxoplasma-Primärinfektion beim Immungesunden zu einer meßbaren Immunsuppression durch die Ausschüttung von Interleukin-10, einem potenten Antagonisten von γ -IFN, kommt. Nach experimentellen Befunden an Mäusen ist das L⁴-Gen des MHC-Komplexes für die Regulation der Cytokine-Ausschüttung verantwortlich und beeinflusst damit die Entzündungsreaktion ($\rightarrow$ Klinik) und den Druck auf die Parasitenpopulation zur Bildung von Gewebezysten. Passend dazu ist auch die Beobachtung, daß das ausschließlich in Tachyzoiten auffindbare Haupt-Oberflächenprotein (P30= SAG1) einen wesentlichen Faktor für das Anheften der Toxoplasma-Parasiten an neue Wirtszellen darstellt, also im Rahmen der aktiven Invasion von Wirtszellen (Toxoplasma kann auch passiv von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden und dann diese parasitieren) eine entscheidende Rolle spielt.

Allerdings lassen sich mit Hilfe dieser wirtsabhängigen Faktoren nicht alle Phänomene der Reaktivierung erklären: Durch die jetzt verfügbar gewordenen Techniken der Typisierung einzelner Toxoplasma-Stämme (= Isolate?), wie z. B. Isoenzym-Typisierung, Restriktionsenzym-Analysen und Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase-Kettenreaktion (RAPD-PCR), konnte gezeigt werden, daß alle humanpathogenen Toxoplasma-Stämme bestimmte, definierbare Gruppen von Merkmalen tragen. Daher scheint auch der Genotyp des Parasitenstammes für die Höhe der Pathogenität eine Rolle zu spielen. Diese Merkmale könnten zukünftig wichtige Marker für die Abschätzung der Prognose von laten-

ten Toxoplasma-Infektionen bei AIDS-Patienten werden.

Eigenschaften eignen sich jedoch nur dann zur Differenzierung, wenn es sich um (genetisch) konstante Merkmale handelt. Eine solche Konstanz ist nun bei der Art *Toxoplasma gondii* keineswegs a priori sicher: Trotz der Möglichkeit einer sexuellen Vermehrung und damit zur Merkmals-Rekombination existieren in der Natur vermutlich fast ausschließlich klonal entstandene Populationen von Toxoplasmen. Diese durch genetische Analysen erhobene These läßt sich auch schlüssig durch die hohe Wahrscheinlichkeit einer Selbstbefruchtung bei der sexuellen Reproduktion im Katzendarm erklären. Die klonale Struktur der Populationen und die bei Toxoplasmen übliche Haploidie führen bei ähnlichen Organismen jedoch üblicherweise zu einer starken genetischen Varianz. Erstaunlicherweise scheinen die bisher weltweit bekannten Toxoplasma-Isolate jedoch eine außergewöhnlich hohe Gen-Konstanz aufzuweisen. Auf Grund von in vitro Klonierungsversuchen vermutet man das Vorhandensein besonderer Gen-Reparaturmechanismen. Diese Eigenheit des Parasiten ist ein unschätzbarer Vorteil beim Versuch, gentechnologische Nachweisverfahren in der Laboratoriumsdiagnostik zu etablieren. Diese Verfahren, meist Polymerase-Ketten-Reaktionen, gewinnen trotz prinzipieller Einwände (nur Infektionsnachweis!) mehr und mehr Raum; etabliert sind sie für die Diagnostik von Akutinfektionen bei Immunsupprimierten, häufig Anwendung finden sie bei der Erkennung von diaplazentar infizierten Neugeborenen, und in einem noch experimentellen Stadium werden sie bereits auch in der Schwangerenüberwachung eingesetzt. Meist werden PCR-Techniken verwendet, die auf einem multi-copy Gen (dem 30mal repetitiven BI-Gen) aufbauen.

Pneumocystis carinii

Beinahe konträr stellt sich die diagnostische Situation bei *Pneumocystis*-Infektionen dar: Das mayor surface glycoprotein (= Hauptantigen) existiert in mindestens drei verschiedenen Varianten mit Wirtspopulations-abhängiger Häufigkeit. Mindestens 100 Gene kodieren diese(s) Protein(e). Phänotypische und genotypische Varianten scheinen für die „Wirtsspezifität“ bestimmter *Pneumocystis*-Stämme oder -Arten verantwortlich zu sein und damit indirekt auch für die wahrscheinlich äußerst heterogene Pathogenität der Stämme in verschiedenen Wirtsspezies oder -individuen. Erst seitdem man sich dieser starken genetischen Variabilität dieses nunmehr taxonomisch gesicherten Pilzes bewußt ist, wurde klar, dass Pa-

tienten in der Regel mit mehr als einem *Pneumocystis*-Stamm (vermutlich nicht selten auch mit Ratten-Stämmen) infiziert sind. Die Stämme sind, wie oben gesagt, im Oberflächenproteinmuster sehr unterschiedlich und scheinen auch diese starke Variabilität im genetischen Material aufzuweisen. Eine logische Folgerung aus dieser Situation ist, daß man die Zuverlässigkeit jeder Form der Labordiagnostik bezweifeln muß. Unspezifische Färbungen (Giemsa, Grocott) sind viel zu unsensitiv und unspezifisch (Pilz!) für eine Früh- und Differentialdiagnose, direkte Nachweisverfahren mittels monoklonaler Antikörper stolpern über die Variabilität des Oberflächenproteins, und die PCR und die in-situ Hybridisierung müssen bei der (vermuteten) starken genetischen Diversität dieses Organismus „insensitiv“ ausfallen. Dieses Szenarium entspricht leider ziemlich exakt der eigenen leidvollen Erfahrung mit der Laboratoriumsdiagnostik von *Pneumocystis*-Infektionen im hiesigen Routinelabor.

Der direkte Erregernachweis bei floriden *Pneumocystis*-Pneumonien stellt hingegen kein Problem dar, scheint aber bei der üblicherweise markanten Klinik mehr als Bestätigungsdiagnose zu fungieren. Es wurden auch über die Erfahrungen mehrerer Arbeitsgruppen berichtet, daß es während einer Therapie einer Pc-Pneumonie regelmäßig zu falsch negativen Erregernachweisen in allen Färbeverfahren kommt, obwohl das klinische Bild nach wie vor vorhanden ist. Im Mausmodell konnte eine Pc-Pneumonie mit „mauspathogenen“ Stämmen nur bei gleichzeitiger Anwesenheit (grampositiver) Bakterien hervorgerufen werden, eine Inokulation mit "sterilen" *Pneumocystis*-Zellen führte zur klinisch stummen Infektion.

Mit derzeit noch nicht absehbaren Konsequenzen behaftet ist allerdings die von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander berichtete Beobachtung, daß *Pneumocystis carinii* mittels PCR in Luftproben aus Spitalsgängen, Häusern und sogar aus dem Freiland in England nachgewiesen werden konnte. Damit zeichnet sich der mögliche Hauptinfektionsweg ab. Außerdem ergibt sich ein sehr starkes Argument für die schon länger vermutete, extrem hohe Inzidenz (gegen 100%) dieses Keims in der europäischen Bevölkerung. Solange nicht bewiesen werden kann, daß die Pc-Pneumonie eine (Wirts-)genetisch determinierte Reaktion des veränderten Immunsystems auf die Anwesenheit des Keims ist, muß von der Annahme ausgegangen werden, daß es humanpathogene und apathogene *Pneumocystis*-Stämme gibt. Die pathogenen Stämme können nun möglicherweise von Patienten mit einer Pc-Pneumonie aerogen in der

Umgebung verteilt werden, und sich so andere Personen mit diesen Stämmen infizieren. Bei einem Nachweis dieses Übertragungsweges ergibt sich bei heutigem Wissensstand als unvermeidliche Forderung die Forderung nach einer luftdichten Isolierung aller Pc-Pneumonie-Patienten.

Cryptosporidium parvum

Die Schwerpunkte in der Kryptosporidien Forschung liegen in der nach wie vor ungeklärten Wirtsspezifität und damit im Übertragungsmodus, sowie in der vollständigen Therapieresistenz. Mittels Restriktionszymanalyse und Isoenzymbestimmung konnte nun festgestellt werden, daß es humanspezifische Kryptosporidien-Stämme (ev. im Art-Rang) gibt, und daß nur sehr wenige Fälle von möglich erscheinenden Zoonosen gefunden werden konnten. Rinder sind zwar der Ausgangspunkt der häufig massiven Kontamination von Trinkwasser mit Kryptosporidien-Oozysten, sie scheinen jedoch für die Epidemiologie der humanen Kryptosporidiose keine Rolle zu spielen.

Auf Grund der Zugehörigkeit dieses Durchfallerregers zu den Apicomplexa sollte eine spezifische Therapie mit anti-Protozoen-Mitteln eigentlich kein Problem sein. Der Grund für das komplette Versagen aller Therapeutika konnte jetzt gefunden werden: Kryptosporidien tragen natürlicherweise ein multidrug resistance gene in sich, das sehr ähnlich dem funktionell gleichen Gen von multiresistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen und Leishmanien-Stämmen und 50% ähnlich dem humanen mdr Gen (p-Glykoprotein 1) in bestimmten Tumorzellen ist. Es zeichnet sich allerdings doch auch in der symptomatischen Behandlung der Kryptosporidiose ein Fortschritt ab, da von einem erfolgreichen Versuch berichtet wurde, das teure bovine Hyperimmun-Kolostrum durch billige und jederzeit verfügbare spezifische IgY-Antikörper aus Hühnereiern zu ersetzen.

Cyclospora cayetanensis

Immer wieder werden Kryptosporidien-ähnliche Keime im Durchfallstuhl von Reiserückkehrern (besonders von Nepalfahrern) und, seltener, AIDS-Patienten gefunden. Diese etwas größeren Formen (8 - 10 µm zu 4 - 6 µm) wurden früher als Cyanobacterium-like bodies bezeichnet. Sie konnten nun durch PCR-Technik eindeutig den Apicomplexa zugeordnet werden, wurden in die nahe Verwandtschaft von *Cryptosporidium sp.* gestellt, und erhielten den wissenschaftlichen Namen *Cyclospora cayetanensis*.

Mikrosporidien

Bei den als humanpathogen bekannten Arten rechnete man bisher mit einem relativ hohen Maß an Organspezifität. Diese Ansicht muß wohl revidiert werden, da gezeigt werden konnte, daß es sich nur um eine in bestimmten Organen höhere Pathogenität der einzelnen Arten handelt. Bei genauerer autoptischer Inspektion mittels jetzt allmählich verfügbar werdender sensitiver Nachweisverfahren (Direkte Immunfluoreszenztests, PCR) scheint der Multiorgan-Befall durch vermutlich alle Mikrosporidien-Arten eher die Regel als die Ausnahme zu sein. Albendazol ist bisher noch immer das einzige verfügbare, wirksame Medikament, es hat jedoch selbst in vitro nur einen inhibitorischen Effekt auf die Vermehrung.

„Limax“-Amöben

Bei den unter dieser Bezeichnung zusammengefaßten freilebenden Amöben handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Einzellern mit zum Teil sehr unterschiedlichen Verhaltensmustern. Während die primäre Amöbenenzephalitis hervorruhenden Arten auf Grund der seltenen Diagnose noch immer weitgehend unerforscht sind, werden doch zunehmend häufiger Limax-Amöben, besonders *Acanthamoeba sp.*, als Erreger von Keratitiden beschrieben. Viele dieser Limax-Amöben sind mit intrazellulären Bakterien vergesellschaftet, dabei handelt es sich vermutlich um Symbiosen. In *Acanthamoeba castellanii*-Trophozoiten konnten Defektmutanten von *Legionella pneumophila* als Kommensalen festgestellt werden. Vom Autor dieser Studie wurde besonders auf die häufige Beobachtung von lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Legionellen in Trinkwässern hingewiesen, was durch die ubiquitäre Verbreitung dieser Amöben erklärbar wäre. Gegenwärtig wird an diagnostisch nutzbaren Primern für PCR-Techniken zum Nachweis von fakultativ pathogenen „Limax“-Amöben gearbeitet, da die derzeit übliche Anzucht und Temperatursensitivitäts-Bestimmung für eine rasche Diagnose unbefriedigend ist.

Zusammenfassung

Als zusammenfassenden Eindruck von den beiden Workshops habe ich mitgenommen, daß der Zoo der opportunistischen Parasiten noch keineswegs komplett ist und mit weiteren Überraschungen in Form von neuentdeckten Arten jederzeit gerechnet werden muß. Hingegen ist derzeit kein echter Durchbruch auf einem der bearbeiteten Gebiete bei den opportunistischen Parasitosen in Sicht, obwohl kleinere Ver-

besserungen laufend gefunden werden und auch relativ rasch zum Nutzen der Patienten in die Routine umgesetzt werden. Zudem scheint es mir so, als ob die Komplexität des Wirkungsgefüges der beforschten Arten mit der Menge an verfügbarem Wissen zunimmt. Dies führt zur gelegentlich frustrierenden Situation, daß intensive Forschungstätigkeit nicht zur Verbesserung der diagnostischen oder therapeutischen Situation einer Parasitose führt, sondern nur zur Zerstörung der Hoffnung auf eine solche.

Schlüsselwörter

Opportunisten, Parasiten, Tagungsbericht.

Korrepondenzadresse:

Univ. Doz. Dr. Andreas Hassl

Klinisches Institut für Hygiene

Kinderspitalgasse 15 A-1095 Wien • Austria