

Die intraepitheliale Lage von *Cryptosporidium* spp. und die Bedeutung der Phagozytose als Abwehrmechanismus

E. Göbel

Einleitung

Der Zoonoseerreger *Cryptosporidium parvum* (Sporozoa: Apikomplexa) vollzieht seinen Entwicklungszyklus im Gastrointestinaltrakt zahlreicher Tierarten und des Menschen, in den Epithelzellen des Respirationstraktes, des Auges, der Gallenblase und der Gallengänge, des Genitaltraktes und in der *bursa fabricii* des Geflügels (1). Das klinische Bild der schweren wäßrigen Diarrhoe wird zwar durch den Sitz des Erregers im Darmbereich ausgelöst, doch stellt das Vermehrungspotential in anderen Organschleimhäuten ein Erregerreservoir dar, das bei therapeutischen Maßnahmen nicht unterschätzt werden darf. Der monoxene Lebenszyklus ist abgesehen von der „retrograden Autoinfektion“, der Freisetzung von Sporozoiten auch in Organen ohne Enzymbildung, geklärt; allerdings harret die Frage nach der Haftung des Parasiten in der Epithelzelle, die Wirt-Parasit-Beziehung, immer noch der Beantwortung. Wird die parasitophore Vakuole, die die stationären Entwicklungsstadien umgibt, vom Erreger oder von der Epithelzelle gebildet?

Für den Ausbruch einer Kryptosporidiose spielen erste Reaktionen des Wirtes eine große Rolle. Nebenbefunde lassen auf eine zelluläre Abwehr durch Phagozytose schließen. Die bislang unzureichenden Erfolge bei der Bekämpfung des Erregers erfordern größere Aufmerksamkeit sowohl der intraepithelialen Lage als auch der Phagozytose zu widmen; dies ist umso mehr angezeigt, als die akute Kryptosporidiose auch bei immunkompetenten Menschen und Tieren beobachtet wird.

Material und Methoden

Im Zuge von Therapieversuchen der akuten Kryptosporidiose wurden 4 - 5 Tage alte Kälber mit je 3 Mio. *Cryptosporidium*-Sporozysten mittels Schlundsonde infiziert. Bei Ausscheiden von massenhaft (++++) Kryptosporidien im Kot wurden von zwei Kälbern für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen Mukosaproben aus dem Ileum entnommen, nach Fixierung in Paraformaldehyd-Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) mehrmals gewaschen und nach Entwässerung mit eingeschalteter Zwischenkontrastierung in Durcupan ACM eingebettet.

Weitere Proben wurden für die Gefrierätzung eine Stunde lang in 1%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) bei 4° C fixiert und nach mehrmaligem Waschen in kaltem Puffer in 10, 20 und 30%igem Glycerol in Cacodylatpuffer für je 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Einfrieren in Freon 22 und Überführen in flüssigen

Stickstoff wurden die Proben in einer BAF 300-Gefrierätzanlage (Balzers) bei -100°C und einem Druck von 10^{-6} Torr gebrochen und geätzt, Platin-Kohle-Abdrücke hergestellt, diese mit Eau de Javelle von anhaftendem biologischen Material in mehreren Schritten gereinigt und auf unbefilmte Kupfernetze aufgezogen.

Sowohl Ultradünnschnitte wie auch Abdrücke wurden an einem Elmiskop 101 (Siemens) ausgewertet.

An 12 weiteren infizierten Kälbern wurde bis zum 7. Tag p. i. täglich zweimal ein weißes Blutbild erstellt. Von zwei Tieren wurden Mukosaabstriche nach Giemsa gefärbt.

Ergebnisse

Bei massenhaftem Befall des Ileums mit Kryptosporidien konnten ab dem 2. Tag p. i. alle Entwicklungsstadien und deren Anheftung bzw. Lage beobachtet werden. Die schlanken Sporozoiten (Abb. 1 a) zeigen schon während ihrer Annäherung an die Epithelzelle einen morphologisch typischen apikalen Pol, den eine extreme Verdickung seiner Pellikula um das Conoid herum und eine sekretgefüllte Vakuole kennzeichnet. Der folgende Schritt leitet die eigentliche Anheftung ein; es wird eine Öffnung des apikalen Pols des Sporozoiten deutlich, wodurch eine Verbindung zwischen Epithelzelle und Parasit entsteht (Abb. 1 b).

Osmiophiles Material wird bis ins Zytoplasma des Enterozyten geschleust. Von hier ausgehend reagiert die Wirtszelle mit der Bildung von bis zu fünf Membranschichten, die sich um den apikalen Pol des Sporozoiten legen. Mikrovilli fehlen an dieser Stelle. Von diesen Schichten ausgehend, wird der Parasit schnell von der ihm anliegenden

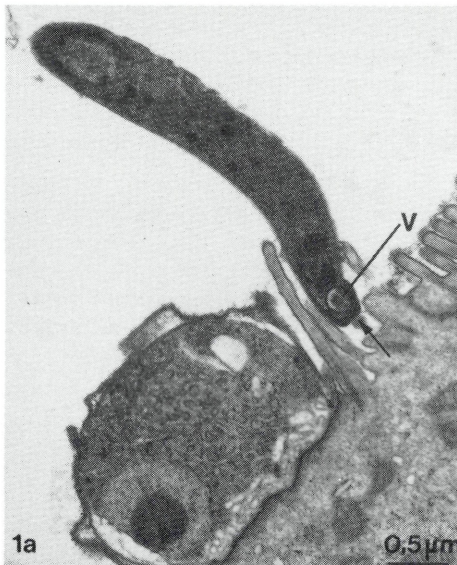


Abb. 1 a:

Cryptosporidium-Sporozoit bei Annäherung an die Epithelzelle. Sekretvakuole (V) und verdickte Pellikula (Pfeil) am apikalen Pol.

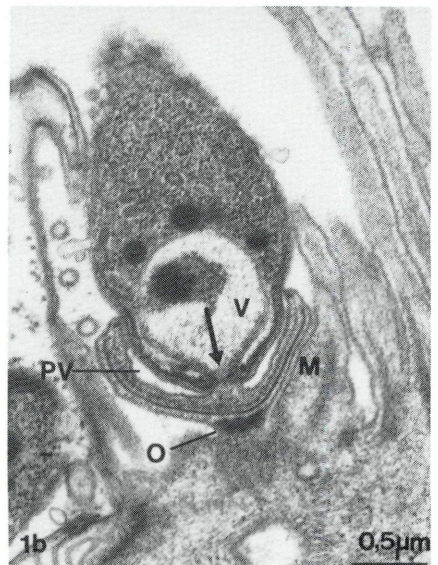


Abb. 1 b:

Sporozoit in Kontakt mit Epithelzelle. Multilamelläre Struktur (M) umgibt den Parasiten mit noch unvollständiger parasitophorer Vakuole (PV). Vakuole über Conoidöffnung (Pfeil) mit der Epithelzelle verbunden, osmiophiles Material (O) an der Kontaktstelle mit der Wirtszelle.



Abb. 2:

Schizont mit lakunenartig verzweigtem feeder organelle (FO) und Kontakt zur Haftzone (HZ).

Doppelmembran vollständig eingehüllt, so daß er schließlich wie alle folgenden stationären Entwicklungsstadien von einer parasitophoren Vakuole umgeben ist. Die verbleibenden Schichten vereinigen sich, wie die Ergebnisse aus der Gefrierätzung zeigen (Abb. 3), bewirken bei den späteren Entwicklungsstadien starke Faltenbildung.

Die eingangs beim Sporoziten beschriebene Vakuole faltet ihre Umgebungsmembran stark auf; dabei nehmen Membranschleifen auf der gesamten Strecke mit der Haftzone zwischen Parasit und Wirtszelle Kontakt auf. Dieser Schritt tritt erstmals beim jungen Schizonten, also dem einkernigen Stadium auf. Es konnte immer nur ein Schizontentyp, der mit 8 Merozoiten, beobachtet werden (Abb. 2).

Schizonten, Makrogamonten, Mikrogamonten mit Mikrogameten, Oozysten und Sporozysten, kenntlich an der Sporozystenhülle mit einer Aufbruchsstelle, zeigen diesen prinzipiellen Anheftungstyp. Nach Reifung und Auswanderung bzw. Abstoßung bleiben bei allen Stadien die parasitophore Vakuole, die Haftzone und das feeder organelle an der Epithelzelle zurück, ebenso der über dem feeder organelle liegende Restkörper,

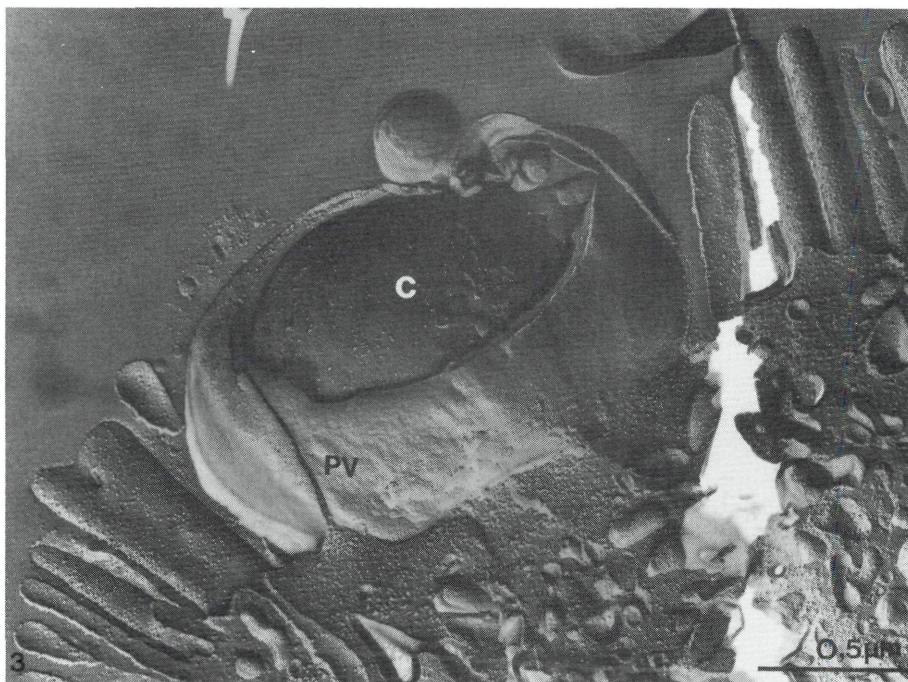


Abb. 3:

Cryptosporidium (C) in Epithelzelle nach Gefrierätzung umgeben von mehrschichtiger, faltenbildender Membran der parasitophoren Vakuole (PV).

der aber keine deutliche Verbindung mit dem Membransystem zeigt. Das bei allen Versuchstieren erstellte weiße Blutbild zeigte durchwegs am 2. Tag p. i. eine starke Zunahme der neutrophilen Granulozyten auf insgesamt 55% durch Vermehrung der Stabkernigen um 30%. Während die Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten bis Versuchsende auch weiterhin bei knapp 40% über den Normalwerten lag, stieg die Zahl der Monozyten erst am 5. Tag p. i. auf max. 25% an.

Parallel dazu waren in Giemsa-gefärbten Mukosaabstrichen der Kälber stets hohe Anteile an Kryptosporidien-phagozytierenden Granulozyten anzutreffen. Auffallend ist, daß sowohl freie Einzelparasiten als auch Schizonten mit parasitophorer Vakuole phagozytiert wurden, daß aber die Epithelzellen fehlten.

Diskussion

Der weltweit vorkommende und im Tierreich stark verbreitete einzellige Zoonoseerreger *Cryptosporidium parvum* gilt auch nach ersten Behandlungserfolgen beim Kalb als therapieresistent, vor allem beim immunkompromittierten Menschen. Ein Grund dafür könnte seine spezielle Lage im Epithel des Darmes sein. Während TYZZER (11) den Erreger als extrazellulär bezeichnete, gelang es uns (3), seine intrazelluläre aber extrazytoplasmatische Lage in Untersuchungen zur Mikrogametogenese und Gametogamie zu beweisen. LUMB et al. (7) unternahmen erste Schritte zur Aufklärung des Anhaftungsmechanismus von *Cryptosporidium*-Sporozysten in Zellkulturen, weil sie meinten, daß die Schnelligkeit des Vorganges diese Untersuchungen in vivo nicht ermöglichen. Wir haben jedoch die Annäherung und die Anheftung des Sporozysten in

allen Entwicklungsphasen beim Kalb verfolgt und dabei festgestellt, daß, ähnlich der Anheftung des Mikrogameten bei der Befruchtung (3) eine Verdickung der Pellikula am apikalen Pol mit dahinterliegender Sekretvakuole auch beim Sporozoiten auftritt, ebenso ein Übergang von osiophilem Material zur Wirtszelle, deren geringgradige Invagination bei gleichzeitiger Unverletztheit bereits HAMPTON und ROSARIO (5) beim Befall mit *Streptobacillus moniliformis* beobachteten. Als entscheidend für einen festen Kontakt sehen wir die Reaktion der Wirtszelle durch Bildung von sogenannten Mikroplicae an, die keine Formation der Parasitenpellikula darstellen. Sie wachsen zunächst in mehreren Schichten um den Parasiten herum und umgeben ihn schließlich mit einer parasitophoren Vakuole. Sie gehen nicht aus dem Mikrovilli (8) sondern aus der *zonula occludens* der Epithelzelle hervor. Wie die Untersuchungen an Ultradünnschnitten und an Abdrücken nach Gefrierätzung zeigen, wird durch mehrere Schichten dieser Wirtszellreaktion die parasitophore Vakuole in Falten gelegt, die tief in den umgebenden Mikrovillusaum eingreifen und den Parasiten so zusätzlich durch Oberflächenvergrößerung verankern. Diesen Vorgang sahen auch SNODGRASS et al. (10), fanden allerdings keine Erklärung dafür.

Eine offene Verbindung zwischen Sporozoit und Wirtszellzytoplasma (7) stellten wir nicht fest. Im weiteren Verlauf der Parasitenentwicklung führen aus der Sekretvakuole des Sporozoiten hervorgehende Membranauffaltungen zur Bildung des feeder organelle und zahlreicher kleiner, für die Funktion der Pinozytose verantwortlicher Vesikel. Sie wurden von VIVIER (12) bei den Gregarinen *Lecudina pellucida* und von REGER (9) bei *Pyxinoidea balani* als caveolae mit gleicher Aufgabe beschrieben. Die parasitophore Vakuole sowie der eng mit der Wirtszelle über das feeder organelle und die Haftzone (= *zonula occludens*) verbundene Parasit beweisen die intrazelluläre, extrazytoplasmatische Lage von *Cryptosporidium*. Eine extrazelluläre (epizelluläre) Lage des Parasiten (2) wird unter Mißachtung dieser morphologischen Gegebenheiten postuliert, trifft aber nicht zu. Dagegen spricht nach unserer Beobachtung auch der Umstand, daß bei Verlassen der Merozoiten, Mikrogameten bzw. dem Freiwerden der Oozysten bzw. Sporozysten sowohl die parasitophore Vakuole als auch das feeder organelle und der Restkörper zurückgelassen werden, weil sie mit der Epithelzelle fest verbunden sind.

Die aus pluripotenten Stammzellen entstehenden und im Knochenmark ausreifenden neutrophilen Granulozyten bilden den Hauptanteil unter den Phagozyten. Ihre Beweglichkeit, Verformbarkeit, Chemotaxis und Erkennung körperfremder Partikel sind Grundvoraussetzung für die Phagozytose. So gesehen stellt der Anstieg ihrer Anzahl nach einer Kryptosporidien-Infektion keine Besonderheit dar. Im Verlauf der Kryptosporidiose beim Kalb konnten wir diesen Anstieg im Blut beobachten und gleichzeitig die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten in der Ileummucosa nachweisen. Dabei war auffallend, daß nicht nur Einzelparasiten sondern auch ganze Schizonten, umgeben von einer parasitophoren Vakuole, phagozytiert wurden. Auch nach Behandlung der Kälber mit Lasalocid konnten dadurch in typischer Weise geschädigte Kryptosporidien in den Granulozyten beobachtet werden (4). LIEBLER et al. (6) stellten diese Form der zellulären Abwehr auch intrauterin nach experimenteller Infektion von Mäusen dar und sahen diesen Vorgang als Mechanismus der Parasitenreinigung an.

Die Existenz von Kryptosporidien in M-Zellen, die den Peyerschen Platten assoziiert sind (8), können wir nicht bestätigen. Die nachgewiesene Phagozytose durch neutrophile Granulozyten ist bisher die einzige gesicherte Abwehr gegen Kryptosporidien und erklärt bei immunkompetenten Individuen möglicherweise die Selbstlimitierung der Parasitose.

Die beschriebenen Anheftungsmechanismen der Protozoen an die Epithelzellen verdeutlichen, daß eine wirkungsvolle chemotherapeutische Beeinflussung des Parasiten vermutlich vom Darmlumen, durch Zerstörung der Membranen der parasitophoren Vakuole und der Pellikula des Erregers erfolgen sollte. Allerdings wird dieser Weg bei fortgeschrittener Kryptosporidiose mit Sitz der Parasiten in Epithelien anderer Organe nicht geeignet sein.

Zusammenfassung

An Ultradünnschnitten und Abdrücken nach Gefrierätzung der Dünndarmmucosa von experimentell mit *Cryptosporidium parvum* infizierten Kälbern untersuchten wir den Wirt-Parasit-Kontakt sowie den Vorgang des Eindringens des Parasiten in die Epithelzelle.

Der Sporozoit nimmt zunächst Kontakt über seine Adhäsionszone, einer verdickten Membran am apikalen Pol, mit der *zonula occludens* des Enterozyten auf. Dieser reagiert dann mit der Bildung von Mikroplicae, die den Parasiten schließlich als parasitophore Vakuole umgeben; daraus resultiert seine intraepitheliale Lage.

Durch starke Auffaltung der Membran einer Sekretvakuole und Kontakt der Membranschlingen mit der Haftzone wird das feeder organelle gebildet. Diese Art der Anheftung gilt für alle motilen und stationären Entwicklungsstadien von *Cryptosporidium*. Der deutliche Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Blut sowie der Nachweis von phagozytierten Kryptosporidien in der Dünndarmmucosa unterstreichen die Bedeutung der zellulären Abwehr als mögliche Ursache für die Selbstlimitierung dieser Parasitose.

Schlüsselwörter

Cryptosporidium, Epithelzelle, Anheftung, Phagozytose.

Summary

The intraepithelial localization of *Cryptosporidium spp.* and the significance of phagocytosis as defense mechanism.

On ultrathin sections and freeze-etching replicas of the ileum mucosa from experimentally infected calves, we examined the host-parasite contact as well as the process of invasion of the parasite into the enterocyte.

At first the sporozoite takes contact with the adhesion zone which is a dense layer at its apical pole with the zonula occludens of the epithelial cell. The enterocyte reacts with the formation of microplcae, which surround the parasite as a parasitophorous vacuole, leading finally to its intraepithelial, but extracytoplasmatical situation. The feeder organelle is constructed with the help of a strongly folded membrane of the secretory vacuole and the contact of the membrane slings with the adhesion zone. Finally, all the motile and stationary developmental stages show this attachment to the enterocyte.

The significant increase of neutrophilic granulocytes in blood indicates the importance of cellular defense against the parasites. The detection of a high degree of phagocytosis of developmental stages of cryptosporidia in the ileum mucosa indicates a mechanism for the selflimiting of cryptosporidiosis in immunocompetent individuals.

Key words

Cryptosporidium, epithelial cell, attachment, phagocytosis.

Literatur

1. FAYER, R., UNGAR, B. L. (1986):
Cryptosporidium spp. and *Cryptosporidiosis*.
Microbiol. Rev. 50, 458 - 483.
2. GJERDE, B. (1986):
Circumstantial evidence of an extracellular (epicellular) localization of developmental stages of *Cryptosporidium*.
Acta vet. scand. 27, 629 - 631.

3. GÖBEL, E., BRÄNDLER, U. (1982):
Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogamy of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice.
Protistologica XVIII, 331 - 344.
4. GÖBEL, E. (1987):
Diagnose und Therapie der akuten Kryptosporidiose beim Kalb.
Tierärztl. Umschau 42, 863 - 869.
5. HAMPTON, J. C., ROSARIO, B. (1965):
The attachment of microorganisms to epithelial cells in the distal ileum of the mouse.
Lab. Invest. 14, 1464 - 1481.
6. LIEBLER, E. M., POHLENZ, J. F., WOODMANSEE, D. B. (1986):
Experimental intrauterine infection of adult BALB/c mice with *Cryptosporidium* sp.
Infect. Immun. 54, 225 - 259.
7. LUMB, R., SMITH, K., O'DONOGHUE, P., LANSER, J. (1988):
Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells.
Parasitol. Res. 74, 531 - 536.
8. MARCIAL, M., MADARA, J. L. (1986):
Cryptosporidium: Cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells.
Gastroenterol. 90, 583 - 594.
9. REGER, J. F. (1967):
The fine structure of the gregarine *Pyxinoidea balani* parasitic in the barnacle *Balanus tintinnabulum*.
J. Protozool. 14, 488 - 497.
10. SNODGRASS, D. R., ANGUS, K. W., GRAY, E. W. (1984):
Experimental cryptosporidiosis in germfree lambs.
J. Comp. Path. 94, 141 - 152.
11. TYZZER, E. E. (1910):
An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse.
J. Med. Res. 23, 487 - 509.
12. VIVIER, E. (1968):
L'organisation ultrastructurale corticale de la Grégarine *Lecudina pellucida*. Ses rapports avec l'alimentation et la locomotion.
J. Protozool. 15, 230 - 246.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Edward Göbel
Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
Universität München

Leopoldstraße 5
D-8000 München 40 · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [11](#)

Autor(en)/Author(s): Göbel Edward

Artikel/Article: [Die intraepitheliale Lage von *Cryptosporidium* spp. und die Bedeutung der Phagozytose als Abwehrmechanismus. 181-187](#)