

## *Mikrosporidiosen des Menschen – Wo ist das Reservoir?*

H. Rinder<sup>1</sup>, Bianca Dengjel<sup>2</sup>, Elsa Báez Abreu de Borges<sup>3</sup>, R. Gothe<sup>2</sup>, T. Löscher<sup>1</sup>

### **Einleitung**

Bis Mitte der 90er Jahre wurden weltweit Mikrosporidien in Stühlen und Dünndarmbiopsaten von 10-25%, in einigen Untersuchungen bei bis zu 50% HIV-positiver Patienten mit chronischer Diarrhoe gefunden (6). Die am häufigsten diagnostizierte Mikrosporidienspezies ist *Enterocytozoon bieneusi*. Infektionen mit *Encephalitozoon intestinalis* sind 3- bis 10-mal seltener (5, 8), andere Mikrosporidienarten werden nur in Einzelfällen gefunden. Seit Einführung der Dreifach-Kombinationstherapie hat sich die Prävalenz von Mikrosporidiosen bei Patienten mit AIDS drastisch vermindert, so dass zur Zeit Mikrosporidien nur noch in wenigen Fällen festgestellt werden. Da durch die genannte Therapie allerdings keine Heilung der Immunschwäche erreicht werden kann, bleibt abzuwarten, ob es in einigen Jahren zu einem Wiederanstieg kommen wird.

Obwohl zumindest die durch *Encephalitozoon cuniculi* verursachte Mikrosporidiose wiederholt als Zoonose angeschuldigt wurde (2, 9), gibt es bis heute keinen eindeutigen Beweis für die Übertragung von Mikrosporidien von Tieren auf Menschen. Eine mögliche Ausnahme könnte lediglich die Serokonversion eines 10-jährigen Mädchens darstellen, die nach engem Kontakt mit einem *E. cuniculi*-infizierten Welpen, der Sporen im Urin ausschied, gesichert werden konnte (11). Auch experimentelle Übertragungen von aus Menschen isolierten und kultivierten *E. cuniculi*-Sporen auf Kaninchen waren erfolgreich (9). Ebenfalls erfolgreich waren experimentelle Übertragungen von *E. bieneusi*-Sporen von Menschen und Rhesus-Affen auf immunsupprimierte, gnotobiotische Schweine (7).

Ob allerdings diese experimentellen Befunde Rückschlüsse auf die tatsächlichen Reservoir humanpathogener Mikrosporidien zulassen, muss weiterhin offen bleiben. Zumindest theoretisch wäre dieses Problem mit epidemiologischen Untersuchungen lösbar. Dazu könnten Kenntnisse über das Wirtsspektrum humanpathogener Mikrosporidien ausgenutzt werden. Beispielsweise

konnten für *E. bienersi* in jüngster Zeit mehrere Wirtstierarten identifiziert werden, nämlich Schwein (3), Katze (10), Rind (13) und, allerdings mit einem deutlich geringeren homologen Genotyp, Hund (10). Leider lässt sich daraus noch nicht unmittelbar ableiten, dass alle diese Tierarten auch als Infektionsquelle für den Menschen in Frage kommen. Klassisch-epidemiologische Untersuchungen, z.B. Fall-Kontroll-Studien, mit denen dieses Problem geklärt werden könnte, verbieten sich aufgrund zu geringer Fallzahlen („Patienten mit AIDS und Mikrosporidiose und Kontakt zu einer bestimmten Tierart“). Als einzig realisierbare Alternative kommt daher der Versuch in Betracht, möglichst viele Stämme innerhalb einer Mikrosporidienart zu unterscheiden und zu vergleichen, welche beim Menschen vorkommen und ob es die gleichen auch bei bestimmten Wirtstierarten gibt. Da es morphologisch keine Unterscheidungsmerkmale gibt, müssten geeignete Unterschiede unterhalb des Artniveaus im Genom gesucht werden.

In der Tat konnten 1997 erstmals *E. bienersi*-Stämme genotypisch durch Sequenzierung von Teilen des Gens der ribosomalen RNA (rDNA) unterschieden werden (14). Dadurch wurden die hier vorgestellten molekular-epidemiologischen Untersuchungen möglich, in deren Verlauf nicht nur ein neuer *E. bienersi*-Genotyp beim Menschen gefunden werden konnte, sondern sich auch eine Antwort auf die Frage anbietet, welche Tierarten als Reservoir dieser beim Menschen am häufigsten gefundenen Mikrosporidienart in Frage kommen.

## Material und Methoden

### DNA-Isolierung aus Stuhl und Kot

0,1 g Stuhl oder Kot wurde mit 33,3 µl 1 M KOH und 9,3 µl 1 M Dithiothreitol (DTT)-Lösung (154 mg DTT in 1 ml 10 mM Natriumazetat [pH 5,2] gelöst) innig verrührt und 15 min bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit 80 µl 2 M Tris-HCl (pH 8,3) und 4,3 µl 25% HCl abgepuffert. Dabei wurde der Puffer vor der Säure zugegeben, um unnötige pH-Sprünge zu vermeiden. Nach dem Ausschütteln mit 250 µl PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, äquilibriert mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und Phasentrennung durch 4 min zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge (ca. 14.000 g<sub>max</sub>) wurde die obere, wässrige Phase nochmals wie zuvor 4 min zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Verunreinigungen abzutrennen. Anschließend wurde die DNA durch Silikagel- („GeneClean II“-Kit, BIO 101, La Jolla, USA) gereinigt und in 40 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) eluiert.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Klonierung und Sequenzierung

Das Zielgen der PCR war der interne transkribierte „Spacer“ (ITS) der rDNA von Mikrosporidien. Die PCR wurde zur Steigerung der Sensitivität als geschachtelte („nested“) PCR und zur Reduzierung von Nebenprodukten zusätzlich als „Hot-Start“-PCR durchgeführt und wurde bereits beschrieben (6). Die Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach RINDER et al. (14).

### DNA-Sequenzanalyse

Die Konsensus-Sequenz jedes Isolates wurde durch die Identität jeder Nukleotidposition in mindestens 2 unabhängig voneinander generierten Klonen aus verschiedenen PCR-Amplifikationen bestimmt. Alle diskrepanten Positionen wurden entweder durch die Identität mit allen anderen bisher charakterisierten DNA-Sequenzen dieser Spezies (konservierte Position) oder, im Fall einer nicht-konservierten Position, durch die Identität mit einem dritten, unabhängig generierten Klon aus einer separaten PCR-Amplifikation bestimmt. Mutationen, die nur in einem einzigen Klon eines einzigen Isolates gefunden wurden, wurden als Polymerasefehler oder, davon ununterscheidbar, als seltene Allele klassifiziert und wurden bei der Erstellung von Konsensus-Sequenzen nicht berücksichtigt. Identitäten zwischen Konsensus-Sequenzen der Isolate wurden als Differenz der Anzahl der beobachteten Mutationen zur durchschnittlichen Länge dieser Sequenzen, geteilt durch diese Länge, in Prozent angegeben, wobei Substitutionen, Deletionen und Insertionen als jeweils eine Mutation gezählt wurden. Für vergleichende Sequenzalignments („alignments“) der ITS-Sequenzen wurden die Programme NALIGN (für 2 Sequenzen) und CLUSTAL (für 3 und mehr Sequenzen) des PC/GENE Software-Paketes (Intelligenetics, Mountain View, USA) verwendet. Phylogenetische Zuordnungen und deren graphische Repräsentation als Dendrogramme wurden mittels Distanz-Matrix-Analyse der DNA-Sequenzen ebenfalls mit dem letztgenannten Programm berechnet.

- Ergebnisse** Die Sequenzierung amplifizierter *E. bienewsi*-rDNA aus dem Stuhl eines 18-jährigen, immunkompetenten, männlichen Patienten aus Venezuela mit 3-4 Monate andauernder Diarrhöe, die nach Therapie mit Albendazol endete, ergab einen bisher noch nicht beschriebenen Genotyp. Die Sequenz wurde unter der Zugriffsnummer AF267147 in der Datenbank GenBank hinterlegt und zeigt eine Besonderheit, die sie von allen bisher bekannten *E. bienewsi*-Genotypen, einschließlich denen anderer Wirtsspezies, unterscheidet: Anstelle von 5 GT-Dinukleotid-Wiederholungen zwischen Position 43 und 52 im ITS besitzt der neu gefundene Genotyp 6 GT-Wiederholungen (Abb. 1). Die restlichen Positionen sind mit denen einer bereits früher beim Menschen beschriebenen Sequenz (Genotyp C) identisch. Durch die Insertion vergrößert sich die Länge des ITS, im Gegensatz zu allen bisher bekannten Genotypen, die alle eine ITS-Länge von 243 bp aufweisen, um 2 bp auf 245 bp. Die beschriebene Insertion wurde in mehreren, unabhängigen Klonierungen aus jeweils unabhängig voneinander durchgeführten PCR-Reaktionen reproduzierbar und ohne Ausnahme gefunden.
- Ein neuer *E. bienewsi*-Genotyp des Menschen
- Phylogenetische Beziehungen zwischen *E. bienewsi*-Stämmen
- Ein Vergleich bisher bekannter *E. bienewsi*-Genotypen aus Schweinen und Rindern (1, 3, 13) mit denen aus menschlichen Wirten (14, 15) sowie mit dem hier erstmals beschriebenen Genotypen AF267147 zeigt, dass sich diejenigen aus Schweinen und Menschen in einer dendrographischen Darstellung überlappen (Abb. 2). Beispielsweise besitzen die Genotypen E und G aus Schweinen eine größere Ähnlichkeit mit den Genotypen A, B und D aus Menschen als mit anderen Genotypen (F, H) aus Schweinen. Dagegen grenzen sich die *E. bienewsi*-Genotypen aus Rindern (I, J) deutlich von denen aus Menschen und Schweinen ab.
- Diskussion** Die Suche nach den Infektionsquellen und den Übertragungswegen von Mikrosporidien-Infektionen des Menschen ist in Ermangelung praktikabler Alternativen entscheidend von der Anwendung molekular-epidemiologischer Methoden abhängig (12). Besondere Bedeutung hat hierbei wiederum die Suche nach geeigneten, sogenannten „informativen“ genetischen Loci, anhand derer die Differenzierung genotypisch ähnlicher Gruppen von Individuen ermöglicht wird. Es ist deshalb wünschenswert, bei den gefundenen Wirtsspezies das genotypische Spektrum von *E. bienewsi* möglichst gut zu beschreiben. Leider waren bisher beim Menschen als Wirt nur 4 unterschiedliche Genotypen von *E. bienewsi* beschrieben worden, die sämtlich von Patienten aus München, Berlin oder Zürich stammten (14, 15).
- Der hier erstmals beschriebene Genotyp AF267147 ist nicht nur deshalb nützlich, weil er das genotypische Spektrum von *E. bienewsi* beim Menschen als Wirtsspezies komplettiert, sondern auch aus epidemiologischen Gründen. Obwohl hier erstmals ein *E. bienewsi*-Genotyp aus einem anderen Kontinent beschrieben wurde, ist dieser Genotyp eng mit einem bereits bekannten *E. bienewsi*-Genotyp aus menschlichen Wirten verwandt und gruppiert sich phylogenetisch mit den übrigen bereits bekannten Genotypen aus Menschen und Schweinen. Soweit dies nach der Charakterisierung des ersten außereuropäischen *E. bienewsi*-Genotyps vorhergesagt werden kann, scheinen geographische Unterschiede demnach einen geringeren Einfluss auf die Enge der Verwandtschaft von *E. bienewsi*-Genotypen zu haben als die Wirtstierart.
- Abbildung 2 zeigt, dass alle Genotypen aus Menschen und Schweinen zueinander enger verwandt sind als diese zu Genotypen aus Rindern. Manche Genotypen aus Menschen, zum Beispiel A, B und D sind zu einigen aus Schweinen (E und G) enger verwandt als zu weiteren Genotypen aus Menschen, zum Beispiel C und AF267147. Dagegen sind die *E. bienewsi*-Genotypen aus Rindern deutlich von denen aus Menschen und Schweinen abgegrenzt.
- Diese Befunde können unterschiedlich interpretiert werden. Eine erste Argumentationslinie stützt sich auf das Fehlen „identischer Genotypen“ bei unterschiedlichen Wirtstierarten. So konnten bei der Mikrosporidienart *E. cuniculi*, im Gegensatz zu *E. bienewsi*, identische ITS-Sequenzen bei menschlichen und tierischen Wirten, nämlich Kaninchen, gefunden werden, woraus auf ein zoonotisches Potential dieser Mikrosporidienart geschlossen wurde (9). Weil im Gegensatz dazu

40	GATGTGTGTGTGT--ATGGGGGA	60	<b>Genotyp C</b>
40	GATGTGTGTGTGTGTATGGGGGA	62	<b>AF267147</b>

Abbildung 1:

Vergleich der ITS-Sequenzen von *E. bienewsi*-Genotyp C und der *E. bienewsi*-Sequenz AF267147 zwischen den angegebenen Positionen. Die Nummerierung bezieht sich auf die Nukleotidposition im ITS.

und dass diese Ergebnisse „gegen einen epidemiologischen Zusammenhang zwischen Infektionen mit *E. bienewsi* bei Schweinen und Menschen“ sprächen (4).

Dieser Auffassung ist jedoch entgegenzuhalten, dass die untersuchten Bereiche von *E. cuniculi* und *E. bienewsi* bei genauerer Betrachtung einige signifikante Unterschiede aufweisen. Der ITS von *E. cuniculi* ist mit einer Länge von 33 bis 41 bp vergleichsweise kurz und besitzt nur einen einzigen polymorphen Locus. Dagegen weist der ITS von *E. bienewsi* eine Länge von 243 bp auf und besitzt

25 bekannte polymorphe Loci (13), mit der in dieser Arbeit beschrieben Insertion sogar 26. Damit ist es offensichtlich weniger wahrscheinlich, zwei identische Genotypen zu finden, wenn 26 polymorphe Loci berücksichtigt werden, als wenn nur ein einziger vorliegt. Oder anders ausgedrückt, würde man sich, wie bei *E. cuniculi* auf einen Genomabschnitt von 33 bis 41 bp beschränken, ließen sich auch bei *E. bienewsi* zahlreiche geeignete ITS-Abschnitte finden, die bei *E. bienewsi* aus Menschen und Schweinen identisch wären.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es ITS-Genotypen von *E. bienewsi* gibt, die aus Menschen und Schweinen stammen und einander ähnlicher sind als andere innerhalb der gleichen Wirtsspezies. Das genotypische Spektrum von *E. bienewsi* aus Menschen und das aus Schweinen „überlappt“, wie Abbildung 2

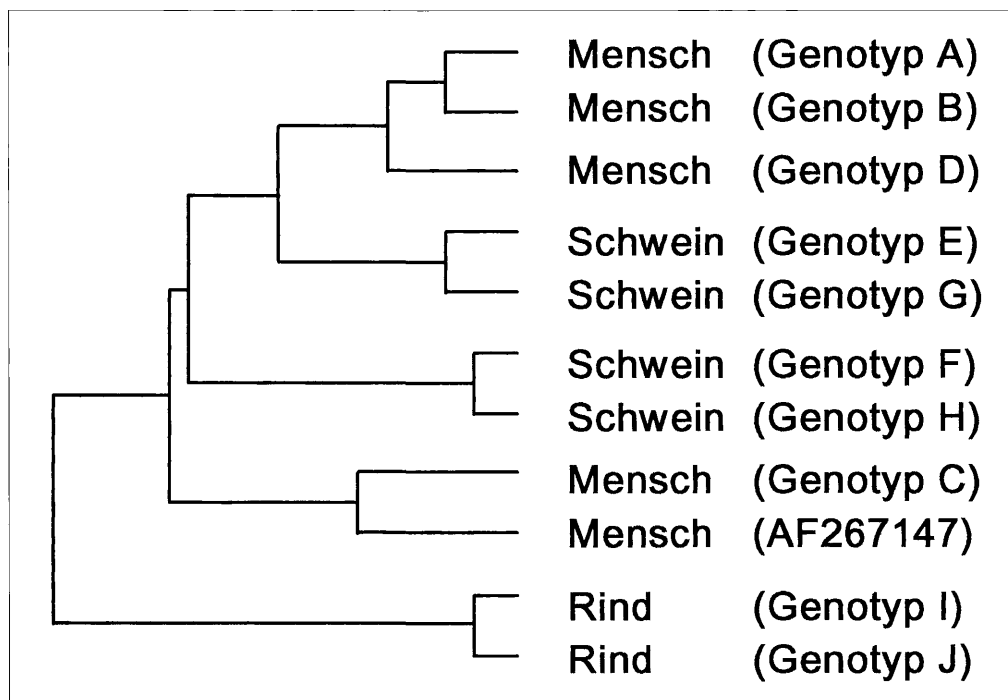


Abbildung 2:

Dendrographische Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen von *E. bienewsi*-Genotypen verschiedener Wirtsspezies.

zeigt, und es fehlt eine Abgrenzung. Im Gegensatz zu der bis jetzt bekannten Situation bei Rindern spricht dieser Befund daher gegen eine Übertragungsbarriere dieses Erregers zwischen Schweinen und Menschen. Daher kann aufgrund dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, und es erscheint sogar wahrscheinlich, dass Schweine durchaus ein Reservoir humanpathogener *E. bienewsi*-Stämme darstellen können.

## Zusammenfassung

Die Reservoire und die Übertragungswege humanpathogener Mikrosporidien sind noch immer weitgehend unbekannt. Experimentelle Infektionen des Menschen verbieten sich und epidemiologische Untersuchungen, zum Beispiel Fall-Kontroll-Studien zum Erkennen möglicher Risikofaktoren, scheitern aufgrund zu geringer Fallzahlen. Einen möglichen Ausweg stellt die Unterscheidung einzelner Stämme innerhalb einer Mikrosporidienart und ihr Vergleich zwischen verschiedenen Wirten dar. Dazu sollte das genotypische Spektrum der Parasiten in den jeweiligen Wirtsspezies möglichst gut bekannt sein. Aus menschlichen Wirten waren bisher lediglich vier Genotypen von

*Enterocytozoon bieneusi*, der häufigsten den Menschen parasitierenden Mikrosporidienspezies, bekannt. Ein neuer Genotyp, der sich um eine Dinukleotid-Insertion von allen bisher bekannten *E. bieneusi*-Genotypen unterscheidet, wird in dieser Arbeit vorgestellt (GenBank-Eintragung AF267147). Ein Vergleich der *E. bieneusi*-Genotypen aus Menschen, Schweinen und Rindern zeigte, dass einige Sequenzen aus Menschen und aus Schweinen einander ähnlicher waren als andere, die innerhalb der gleichen Wirtsspezies gefunden wurden. Dieser Befund spricht gegen eine Übertragungsbarriere dieses Erregers zwischen Schweinen und Menschen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Schweine ein mögliches Reservoir humanpathogener *E. bieneusi*-Stämme sein könnten.

**Schlüsselwörter** *Enterocytozoon bieneusi*, Reservoir, Genotypen.

**Summary** *Human Microsporidiosis: Where is the Reservoir?*

The reservoirs of human-pathogenic microsporidia and their routes of transmission are still largely unknown. Experimental infections of humans must be ruled out. Due to insufficient case numbers, epidemiologic investigations, too, for example case control studies for the detection of possible risk factors, can not be performed. A possible solution is the differentiation of strains within a given microsporidial species and their comparison between different hosts. To be efficient, the genotypic spectrum of the parasites in the different host species should be known as much as possible. From humans thus far, only four genotypes were known for the most frequently found microsporidial species in humans, *Enterocytozoon bieneusi*. A novel genotype is presented in this study (GenBank accession number AF267147), which displayed a dinucleotide insertion not found in any other known *E. bieneusi* genotype. On comparison of the different *E. bieneusi* genotypes it was found that some genotypes from humans and from pigs were related more closely to each other than to others from the same host species. This finding suggests the lack of a transmission barrier for this pathogen between pigs and humans. Thus it can not be ruled out that pigs might serve as a possible reservoir for infections of humans with *E. bieneusi*.

**Key words** *Enterocytozoon bieneusi*, reservoir, genotypes.

### Literatur

1. BREITENMOSER, A. C., MATHIS, A., BÜRGI, E., WEBER, R., DEPLAZES, P. (1999): High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology* 118, 447-453.
2. DEPLAZES, P., MATHIS, A., BAUMGARTNER, R., TANNER, I., WEBER, R. (1996): Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin. Infect. Dis.* 22, 557-559.
3. DEPLAZES, P., MATHIS, A., MÜLLER, C., WEBER, R. (1996): Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. *J. Euk. Microbiol.* 43, 93S (Abstract).
4. DEPLAZES, P., MATHIS, A., WEBER, R. (1998): Sind Mikrosporidien Zoonoseerreger? Abstract XXXII. Tagung Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol., Wien, 18.
5. FRANZEN, C. et al. (1996): Genetic evidence for latent *Septata intestinalis* infection in human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *J. Infect. Dis.* 173, 1038-1040.
6. KATZWINKEL-WLADARSCH, S., LIEB, M., HEISE, W., LÖSCHER, T., RINDER, H. (1996): Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1, 373-378.

7. KONDOVA, I. et al. (1998):  
Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bieneusi* from humans and rhesus macaques in gnotobiotic piglets.  
*Infect. Immun.* 66, 5515-5519.
8. KOTLER, D. P., ORENSTEIN, J. M. (1998):  
Clinical syndromes associated with microsporidiosis.  
*Adv. Parasitol.* 40, 321-349.
9. MATHIS, A. et al. (1997):  
Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits.  
*Parasitology* 114, 29-35.
10. MATHIS, A., BREITENMOSER, A. C., DEPLAZES, P. (1999):  
Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat.  
*Parasite* 6, 189-193.
11. McINNES, E. F., STEWART, C. G. (1991):  
The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis.  
*J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62, 51-54.
12. RINDER, H. (1999):  
Molekulare Epidemiologie.  
In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Erkrankungen (Hrsg.):  
Neuere Methoden und Ergebnisse zur Epidemiologie von Parasitosen, 189-196.  
Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Giessen.
13. RINDER, H. et al. (2000):  
Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle.  
*J. Parasitol.* 86, 185-188.
14. RINDER, H., KATZWINKEL-WLADARSCH, S., LÖSCHER, T. (1997):  
Evidence for the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bieneusi*.  
*Parasitol. Res.* 83, 670-672.
15. RINDER, H., KATZWINKEL-WLADARSCH, S., THOMSCHKE, A., LÖSCHER, T. (1999):  
Strain differentiation in microsporidia.  
*Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23, 433-437.

**Korrespondenzadresse** Dr. rer. nat. Dr. med. Heinz Rinder  
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin  
Universität München  
  
Leopoldstraße 5  
D-80802 München · Deutschland

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://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: 2000

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Rinder Heinz, Dengjel Bianca, Borges Elsa Baez Abreu de, Gothe R., Löscher Th.

Artikel/Article: [Mikrosporidiosen des Menschen - Wo ist das Reservoir? 1-6](#)