

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10 (1988) 175 - 182

Robert-Koch-Institut, Abteilung für Klinische Parasitologie (Leitung: Direktor Prof. Dr. K. Janitschke) (1)  
Landesinstitut für Tropenmedizin (Leiter: Prof. Dr. U. Bienzele) (2)

## Isoenzymbestimmungen bei monoxenisch gezüchteten Stämmen von *Entamoeba histolytica*

Th. Weinke<sup>1</sup>, Sibyll Lichy<sup>1</sup>, K. Janitschke<sup>1</sup>,

Barbara Friedrich-Jänicke<sup>2</sup>

### Einleitung

Etwa 480 Millionen Personen beherbergen nach WHO-Schätzungen das Protozoon *Entamoeba histolytica* in ihrem Intestinaltrakt (28). Bei mehr als 90% der Betroffenen handelt es sich um eine asymptomatische Darmlumeninfektion (9, 10, 14, 25).

Im Gegensatz dazu kommt es nur bei einem geringen Prozentsatz zur invasiven Amöbenruhr mit blutig schleimigen Durchfällen und Komplikationen wie einem Amöbenleberabszeß (1). Bislang wurde diese Beobachtung so erklärt, daß die Amöben bestimmte klimatische Voraussetzungen oder immunologische Vorgänge beim Wirt benötigen, um pathogen und invasiv zu werden (1, 6). Durch die Methode der Isoenzymdifferenzierung von *E. histolytica* ist man von dieser Beobachtung abgekommen und unterscheidet heute pathogene von nicht pathogenen Stämmen (21 - 23).

Die genaue Durchseuchung mit *E. histolytica* in Deutschland ist nicht bekannt; sie wird aber auf weniger als 1% geschätzt (11, 12). Ein höheres Risiko, mit *E. histolytica* infiziert zu sein, haben männliche Homosexuelle und Tropenreisende (4, 10, 11, 26). Wir haben daher Isolate von *E. histolytica* von diesen beiden Personengruppen kultiviert, um die Isoenzyme darzustellen. Da die Methode der Kultivierung und Isoenzymdifferenzierung nur an sehr wenigen Zentren bisher durchgeführt wird, soll sie genauer beschrieben werden.

### Methoden

#### Amöbenkultivierung nach ROBINSON (17)

Etwa 50 mg frischer unbehandelter Stuhl wird in eine Kulturflasche mit biphasischem Robinson-Medium gegeben. Neben der salinischen Agarfläche enthält das Medium Reisstärke, Pepton, Erythromycin, Phthalat und im definierten „BR“-Medium einen Stamm von *Escherichia coli*. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37° C findet ein Mediumwechsel statt. Am 2. Tag (48 Stunden nach der Überimpfung) werden Tropfen aus dem Kultursediment aufgenommen und mit Lugolscher Lösung beurteilt. Je nach Kulturergebnis werden weitere Subkulturen angelegt.

### Herstellen der Amöbenlysate

Nach etwa 2 - 5 Subkultivierungen werden die Amöben-Trophoziten abgeerntet. Dies sollte geschehen, wenn Amöben in einer Konzentration von  $5 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$  oder mehr vorliegen. Es wird dazu die basale Stärkeschicht aus dem Kulturröhrchen aufgenommen; dieses Material wird bei  $4^\circ \text{C}$  für 15 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und Enzymstabilisatoren werden hinzugefügt. Die 1 mM Enzymstabilisatoren-Lösung besteht aus Dithiothreitol (31 mg), e-Aminocaprinsäure (16 mg) und 1 ml EDTA (200 mM; pH 7,0). Einfrieren bei  $-25^\circ \text{C}$ , gefolgt von Auftauen bei Raumtemperatur, führt zur Lyse der Amöben. Nach erneutem Zentrifugieren bei  $4 - 6^\circ \text{C}$  und 300 g für 15 Minuten hat man als Überstand das Amöbenlysat.

### Bakterielle Kontrolle

Zur Unterscheidung von *E. histolytica*-Banden und bakteriellen Verunreinigungen in der Elektrophorese wurde ein Kulturfläschchen ohne Amöben angelegt. Es handelt sich somit um ein Lysat von *Escherichia coli*.

### Stärkegel-Elektrophorese

Zur Durchführung der Elektrophorese haben wir 1 mm dicke hydrolysierte Stärkegele gegossen. In das Gel werden lysatgetränkte Baumwollfäden eingedrückt, die als Startlinien gelten. Die Konzentration der Puffersubstanzen ist anderweitig ausführlich beschrieben (21). Die Stärkegelplatten werden auf  $8^\circ \text{C}$  gekühlte Platten aufgelegt und eine Potentialdifferenz von  $16 \text{ V} \times \text{cm}^{-1}$  über drei Stunden angelegt. Nach der Elektrophorese wird eine Formazan-Agarschicht in einen Rahmen auf die Stärkegele gegossen. Die genaue Zusammensetzung dieser Entwicklersubstanzen ist ebenfalls bereits beschrieben (21). Mit dieser Überzugsschicht werden die Platten bei  $37^\circ \text{C}$  für 30 Minuten inkubiert, bis die Isoenzymbanden sichtbar sind und beurteilt werden können. Folgende Enzyme werden routinemäßig untersucht: EC 5319 Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI); EC 11140 L Malat: NADP + Oxidoreduktase (Oxalazetat dekarboxylierend) (ME); EC 2751 Phosphoglukomutase (PGM); EC 2711 Hexokinase (HK).

### Ergebnisse

Bei 118 Personen gelang nativ oder in Stuhlanreicherungsverfahren (MIFC nach BLAGG et al. [5]) der Nachweis von *E. histolytica*. 85 davon (72%) waren Tropenreisende, 33 (28%) waren männliche Homosexuelle. Von den Tropenreisenden waren 37 Frauen und 48 Männer. Der Altersdurchschnitt im Gesamtkollektiv lag bei 34 Jahren, ohne daß Unterschiede zwischen den Tropenreisenden und männlichen Homosexuellen sichtbar wären. In 63 Fällen (53,4%) war es möglich, *E. histolytica* so ausreichend zu kultivieren, daß Lysate hergestellt werden konnten. Die genaue Auflistung der Zymodeme kann Tabelle 1 entnommen werden. Die gefundenen Zymodeme I, III und V gelten als nicht pathogen, während Zymodem XIX mit Pathogenität assoziiert ist. Die pathogenen Isolate kamen ausschließlich bei Tropenreisenden vor. Pathogene *E. histolytica*-Stämme wurden somit in 8,5% bei Tropenreisenden, aber kein einziges Mal bei männlichen Homosexuellen gefunden. Eine Darstellung der gefundenen Isoenzymbanden ist in Abbildung 1 zu sehen. Der Marker für Pathogenität ist eine fortgeschrittene erste Bande in PGM in Verbindung mit fortgeschrittenen Banden in HK. Die isolierte Bande in ME ist charakteristisch für *E. histolytica* und unterscheidet sie z. B. von anderen apathogenen Amöbenarten.

Die Patientenisolat mit pathogenem Isoenzymmuster wiesen eine klinische Symptomatik auf. Einer davon mit einem Amöbenleberabszeß ist bereits anderweitig ausführlich beschrieben worden (27).

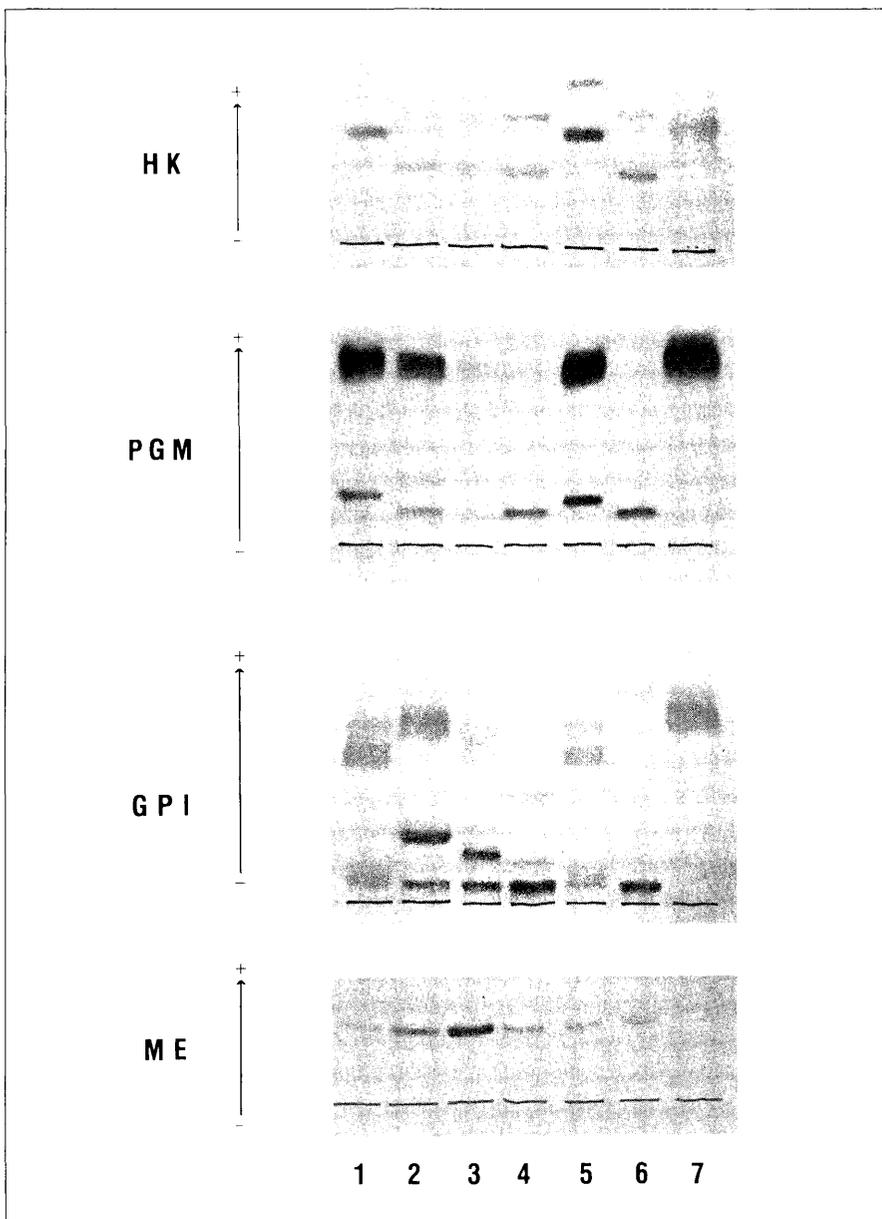


Abb. 1:

Isoenzymbanden von *E. histolytica* nach Stärkegel-Elektrophorese für die Enzyme HK, PGM, GPI und ME.

Nr. 1: SAW 1760 (erhalten von P. G. Sargeaut), Zymodem XIX; Nr. 2: WEI HO, Zymodem V; Nr. 3: WEI TH 2, Zymodem III; Nr. 4: WEI TH 65, Zymodem I (die zweite Bande in GPI ist ein Spiegeleffekt); Nr. 5: WEI T 83, Zymodem XIX; Nr. 6: Wei TH 134, Zymodem I; Nr. 7: bakterielle Kontrolle.

Zeichen für Pathogenität ist die fortgeschrittene Bande in HK in Verbindung mit einer fortgeschrittenen, primären Bande in PGM. Nr. 1 und Nr. 5 sind pathogene Stämme.

TABELLE 1  
**Auflistung der mikroskopisch gesicherten *E. histolytica*-Befunde, der kulturell hergestellten Lysate und deren Zymodemuster.**

	Anz. der <i>E. histolytica</i> -Befunde	hergest. Lysate	in %	Zymodem			
				I	III	V	XIX
Tropenreisende männl. Homosex.	85	47	55,3	35	6	2	4
	33	16	48,5	10	5	1	0
Gesamt:	118	63	53,4	45	11	3	4

## Diskussion

Die Diagnose Amöbiasis beruht auf dem Nachweis von Zysten oder Trophozoiten von *E. histolytica* (25). Die Differenzierung von *E. histolytica* in solche, die zu einer asymptomatischen Darmlumeninfektion führen und andere, die eine invasive Amöbiasis mit zum Teil erheblicher Klinik hervorrufen, war bisher kaum möglich. Einzige Ausnahme war der Nachweis von phagozytierten Erythrozyten in Trophozoiten, der nur bei der invasiven Amöbiasis gelang. Mit der Methode der Isoenzymdifferenzierung, die erstmals 1968 von REEVES und BISCHOFF (16) für Amöben durchgeführt wurde, gibt es jetzt die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Amöben. Diese Arbeiten wurden ganz entscheidend von SARGE-AUNT und Mitarbeitern (20 - 24) vorangetrieben, die bewiesen, daß bestimmte Isoenzympopulationen praktisch immer mit klinischer Symptomatik einhergehen. Eine Population mit einheitlichem Isoenzymmuster für die definierten Enzyme HK, PGM, ME und GPI heißt Zymodem.

Auf diese Art konnten bisher 22 Zymodeme definiert werden (19). So wurde gezeigt, daß Isolate aus Amöbenleberabszessen immer ein pathogenes Zymodem aufwiesen (22). Bei männlichen Homosexuellen hingegen wurde noch nie ein pathogenes Isoenzymmuster gefunden (15).

Die eigenen Ergebnisse decken sich mit diesen Befunden. Es fällt auf, daß nur 8,5% der Isolate von Tropenreisenden ein pathogenes Zymodem aufweisen. Bezieht man das Ergebnis der männlichen Homosexuellen noch ein, erniedrigt sich dieser Prozentsatz auf 3,4%. Diese Zahlen decken sich recht genau mit den Beobachtungen, daß mehr als 90% der Personen, die *E. histolytica* in ihrem Intestinaltrakt beherbergen, asymptomatisch sind (9, 10, 14, 25).

BRUMPT (7) hatte wegen dieser Beobachtungen bereits 1925 vorgeschlagen, zwei Amöbenspezies voneinander zu unterscheiden innerhalb des Oberbegriffes *Entamoeba histolytica*. Er benannte sie *Entamoeba dispar* (nicht pathogen) und *Entamoeba dysenteriae* (Ursache der Erkrankung). Die Isoenzymdifferenzierung scheint eine späte Bestätigung für BRUMPT zu sein. Mit Hilfe der Isoenzymdarstellung ist es also möglich, nicht nur unterschiedliches genetisches Material von *E. histolytica* darzustellen, sondern auch die Marker zu zeigen, die für die Invasivität und Gewebslyse verantwortlich sind. Von MIRELMAN (13) ist die Stabilität von Isoenzymmustern nach aufwendigen Manipulationen mit den Amöben in vitro angezweifelt worden. Klinische Langzeitbeobachtungen sprechen jedoch dagegen, daß eine Variabilität der Zymo-

deme vorliegen könnte (20). Es ist dabei anzumerken, daß ein Großteil der Amöbenforschung an axenischen Stämmen durchgeführt wird (3, 18), die oft seit Jahren oder Jahrzehnten *in vitro* subkultiviert werden. Jede Axenisierung jedoch ist ein so aufwendiges und langwieriges Unternehmen, daß es für aktuelle, klinische Fragestellungen immer zu zeitaufwendig ist (8).

Da unsere Zymodemuntersuchungen den klinischen Aspekt als vorrangig ansehen, ist es für uns wichtig, daß die Integrität des Parasiten erhalten bleibt, wie sie im Wirt vorliegt. Dafür ist das monoxenische Robinson-Medium optimal, da es in kürzester Zeit eine Beurteilung der Amöben erlaubt und da der Parasit in diesem Kultursystem ähnliche Bedingungen wie im menschlichen Intestinaltrakt vorfindet (20).

In unseren *E. histolytica*-Isolaten waren Zymodem I und III die häufigsten Befunde. Dies wurde auch in anderen Untersuchungen aus Kanada, Großbritannien, Indien, Südafrika und Mexiko gezeigt (10, 15, 21, 22, 24). Dies trifft sowohl für Personen aus endemischen Gebieten als auch für männliche Homosexuelle zu.

In 53,4% gelang die Kultivierung bekanntermaßen positiver Proben. Dies zeigt, daß die konventionelle Mikroskopie der Kulturmethode nach ROBINSON überlegen ist, um den Parasiten zu entdecken. In Einzelfällen kann es gelegentlich auch umgekehrt sein (27). In einer kanadischen Untersuchung, in der 46% der Proben kultiviert waren, tauchten jedoch ähnliche Probleme auf (15). Ein kürzerer Zeitabstand zwischen dem Gewinnen der Stuhlprobe und dem Ansetzen der Kultur als die bei uns üblichen 24 Stunden mag dabei bessere Ergebnisse bringen. Obwohl die Kultivierung einfach ist, muß sie gegenwärtig noch als Forschungsmethode eingeschätzt werden, die für ein Routinelabor in großem Umfang wohl nicht realisierbar ist.

Einige Autoren haben aufgrund der Isoenzymdifferenzierung bei nicht pathogenen Zymodemen begonnen, diese Patienten nicht mehr zu behandeln (2, 10, 14). Wir sind der Ansicht, daß weitere Ergebnisse solcher Studien abgewartet werden sollten und daß dies nur unter regelmäßiger und genauer Überwachung des Patienten zu vertreten ist.

### Danksagung

Wir danken Peter G. SARGEAUNT (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Department of Medical Protozoology) für die Möglichkeit, die Amöbenkultivierung und die Isoenzymdifferenzierung zu erlernen.

### Zusammenfassung

Es wurden 118 *Entamoeba histolytica*-positive Stuhlproben von Tropenreisenden oder männlichen Homosexuellen in Robinsons-Medium kultiviert. In 53,4% der Fälle war es möglich, *E. histolytica* so ausreichend zu kultivieren, daß Isoenzymbestimmungen möglich waren. Die Isoenzymdifferenzierung erfolgte mittels Stärkegel-Elektrophorese für die Enzyme L-Malat (ME), Hexokinase (HK), Phosphoglukomutase (PGM) und Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI). Es wurden 59 nicht pathogene und 4 pathogene Zymodeme gefunden. Alle 4 pathogenen Isolate gingen mit klinischer Symptomatik einher und stammten von Tropenreisenden. Bei den männlichen Homosexuellen konnte kein pathogenes Isoenzymmuster gefunden werden.

### Schlüsselwörter

*Entamoeba histolytica*, Amöbiasis, Isoenzyme, Zymodem, Stärkegel-Elektrophorese

## Summary

### Isoenzyme classification obtained from monoxenic cultures of *Entamoeba histolytica*

118 fecal samples positive for *Entamoeba histolytica* had been cultured in Robinson's medium. The samples had been obtained from travellers returning from the tropics or from male homosexuals. *E. histolytica* could be cultured sufficiently in 53,4% to perform isoenzyme classification. This classification was made using starch gel electrophoresis for the following enzymes: L-malate (ME), hexokinase (HK), phosphoglucumutase (PGM), and glucose phosphate isomerase (GPI). We found 59 nonpathogenic and 4 pathogenic zymodemes. All 4 pathogenic isolates had clinical symptoms of invasive amebiasis and originated exclusively from travellers returning from tropics. No pathogenic isoenzyme pattern was found in male homosexuals.

## Key words

*Entamoeba histolytica*, amebiasis, isoenzymes, zymodeme, starch gel electrophoresis

## Literatur

1. ADAMS, E. B., McLEOD, I. N. (1977):  
Invasive Amebiasis.  
Medicine 56, 315 - 323.
2. ALLASON-JONES, E., MINDEL, A., SARGEANT, P., WILLIAMS, P. (1986):  
*Entamoeba histolytica* as a commensal intestinal parasite in homosexual men.  
N. Engl. J. Med. 315, 353 - 356.
3. BAILEY, G. B., DAY, D. B., NOKKEAW, C., HARPER, C. C. (1987):  
Stimulation by target cell membrane lipid of actin polymerization and phagocytosis by *Entamoeba histolytica*.  
Infect. Imm. 55, 1848 - 1853.
4. BIENZLE, U., COESTER, C. H., KNOBLOCH, J., GUGGENMOOS-HOLZMANN, I. (1984):  
Protozoal enteric infections in homosexual men.  
Klin. Wochenschr. 62, 323 - 327.
5. BLAGG, E. L., SCHLOEGEL, L., MANSOURS, N. S., KHALAF, G. I. (1955):  
A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 4, 23 - 28.
6. BRAY, R. S., HARRIS, W. G. (1977):  
The epidemiology of infection with *Entamoeba histolytica* in the Gambia, West Africa.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 401 - 407.
7. BRUMPT, E. (1925):  
Etude sommaire de l'"*Entamoeba dispar*" n. sp. Amibe à Kystes quadrinuclees, parasite de l'homme.  
Bull. Acad. Med. (Paris) 94, 943 - 952.
8. DIAMOND, L. S. (1986):  
*Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903: from xenic to axenic cultivation.  
J. Protoz. 33, 1 - 5.
9. GATHIRAM, V., JACKSON, T. F. H. G. (1985):  
Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural south africa population.  
Lancet I, 717 - 721.
10. GOLDMEIER, D., PRICE, A. B., BILLINGTON, O., BORIELLO, P., SHOAW, A., SARGEANT, P., MUNDAY, P. E., DIXON, I., CARDER, J. M., HILTON, J. (1986):  
Is *Entamoeba histolytica* in homosexual men a pathogen?  
Lancet I, 641 - 646.

11. KIMMING, P., MERÒ, A. (1983):  
Importierte und autochtone Darmparasitosen.  
Dtsch. Ärztebl. 35, 21 - 31.
12. KNOBLOCH, J., BIALEK, R., HAGEMANN, J. (1983):  
Intestinal Protozoenbefall durch berufsbedingten Abwasserkontakt.  
Dtsch. Med. Wochenschr. 108, 57 - 60.
13. MIRELMAN, D., BRACHA, R., CHAYEN, A., AUST-KETTIS, A., DIAMOND, L. S. (1986):  
*Entamoeba histolytica*: effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence.  
Exp. Parasit. 62, 142 - 148.
14. NANDA, R., BAVEJA, U., ANAND, B. S. (1984):  
*Entamoeba histolytica* cyst passers: clinical features and outcome in untreated subjects.  
Lancet II, 301 - 303.
15. PROCTOR, E. M., WONG, Q., YANG, J., KEYSTONE, J. S. (1987):  
The electrophoretic isoenzyme patterns of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in two major cities in Canada.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 37, 296 - 301.
16. REEVES, R. E., BISCHOFF, J. M. (1968):  
Classification of *Entamoeba* species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes.  
J. Paras. 54, 594 - 600.
17. ROBINSON, G. L. (1968):  
The laboratory diagnosis of human parasitic amoeba.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 285 - 294.
18. SALATA, R. A., COX, J. G., RAVDIN, J. I. (1987):  
The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amoeba by lectin-dependent lymphocytes.  
Paras. Imm. 9, 249 - 261.
19. SARGEANT, P. G. (1987):  
Zymodemes of *Entamoeba histolytica*.  
Parasitology Today 3, 158.
20. SARGEANT, P. G. (1987):  
The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis.  
Parasitology Today 3, 40 - 43.
21. SARGEANT, P. G., BAVEJA, U. L., NANDA, R., ANAND, B. S. (1984):  
Influence of geographical factors in the distribution of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*: identification of zymodeme XIV in India.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 96 - 101.
22. SARGEANT, P. G., JACKSON, T. F. H. G., SIMJEE, A. (1982):  
Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates especially those from liver abscess.  
Lancet I, 1386 - 1388.
23. SARGEANT, P. G., WILLIAMS, J. E., JACKSON, T. F. H. G., SIMJEE, A. E. (1982):  
A zymodeme study of *Entamoeba histolytica* in a group of South Africa school-children.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 401 - 402.
24. SARGEANT, P. G., WILLIAMS, J. E. (1980):  
The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in Mexico City. A pilot survey I.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 653 - 656.
25. WALSH, J. A. (1986):  
Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality.  
Rev. Infect. Dis. 8, 228 - 238.
26. WEINKE, Th., FRIEDRICH-JÄNICKE, B., LICHY, S., JANITSCHKE, K. (1987):  
Isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* isolated from homosexual men.  
Trop. Med. Parasitol. 38, 337 - 338.

27. WEINKE, Th., FRIEDRICH-JÄNICKE, B., SARGEAUNT, P. G., TRAUTMANN, M., JANITSCHKE, K. (1988):  
Amoebic liver abscess in an European patient: Zymodeme classification of *Entamoeba histolytica*.  
Klin. Wochenschr. 66, 37 - 40.
28. WHO (1985):  
Amoebiasis and its control.  
Bull. WHO 63, 417 - 426.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. med. Thomas Weinke  
Robert Koch-Institut  
Abt. für Klinische Parasitologie

Nordufer 20  
D-1000 Berlin 65  
Bundesrepublik 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: 1988

Band/Volume: [10](#)

Autor(en)/Author(s): Weinke Thomas, Lichy Sibyll, Janitschke Klaus, Friedrich-Jänicke Barbara

Artikel/Article: [Isoenzymbestimmungen bei monoxenisch gezüchteten Stämmen von Entamoeba histolytica. 175-182](#)