

Isoenzym-Isoelektrofokussierung mittels Phast®-System zur Pathogenitätsbestimmung von *Entamoeba histolytica*

H. Stemberger, Marina Binder, H. Kollaritsch, G. Wiedermann

Einleitung

Rund 10% der gesamten Weltbevölkerung sind mit *Entamoeba histolytica* infiziert, aber nur 10% aller Infizierten zeigen Krankheitssymptome (13). Daraus folgt, daß bei der überwiegenden Zahl aller Infizierten *Entamoeba histolytica* lediglich saprophytäre Eigenschaften besitzt, wobei es im Darmlumen zur Entstehung von Trophozoiten kommt, die sich, ohne die Darmwand zu alterieren, mit zunehmender Dehydrierung der Stuhlmassen in Zysten umwandeln und als solche mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Dem gegenüber stehen die relativ seltenen invasiven Geschehen, wobei es zur Destruktion der Dickdarmmukosa und zur Einschwemmung von Trophozoiten in die Leber und andere Organe kommt.

Es lag daher nahe anzunehmen, daß *Entamoeba histolytica* in 2 morphologisch nicht voneinander unterscheidbaren Taxa auftritt, nämlich in einer pathogenen und einer nicht pathogenen. In der Folge wurde eine Reihe biologischer Unterscheidungskriterien herausgefunden, wie Empfindlichkeit gegenüber humanem Komplement (8), in-vitro-zytolytische Effekte (2), die Fähigkeit zur Erythrophagozytose (5), Unterschiede im Hinblick auf Lektine, die für die Kontaktnahme für Zielzellen relevant sind (4, 6, 7, 12), sowie Unterschiede der Isoenzymmuster (10). Die Isoenzymbestimmung von *Entamoeba histolytica* erlaubt einerseits die Zuordnung von Isolaten zu einem bestimmten Zymodem, was für epidemiologische Untersuchungen praktisch wichtig ist, als auch die sichere Zuordnung des isolierten Amöbenstammes in die Kategorie „pathogen“ oder „nicht-pathogen“.

Die Isoenzymbestimmung ist deshalb von großer praktischer Bedeutung, weil sie erlaubt, die Behandlungswürdigkeit der diagnostizierten Amöbiasis zu objektivieren.

Die von SARGEAUNT beschriebene Stärkegelelektrophorese hat sich wegen ihrer guten Reproduzierbarkeit zwar als Standardmethode durchgesetzt, einer wirklich breiten Anwendung steht aber die Notwendigkeit entgegen, speziell geschultes Personalsal einzusetzen, sowie die Unmöglichkeit für diesen Zweck speziell konstruierte Elektrophoresekammmern im Handel zu erhalten. Zudem ist die Methode arbeitsaufwendig, hat einen hohen Verbrauch an Reagentien sowie einen hohen Zeitaufwand.

Mit einem semi-automatisch arbeitenden Elektrophoresegerät (Phast®-System, Pharmacia, Schweden) haben wir daher versucht, die Lysate von *Entamoeba histolytica* mittels Isoelektrofokussierung zu trennen. Im einzelnen wurden die Isoenzyme der Leitenzyme NADP-Oxidoreductase (ME), Phosphoglukomurase (PGM) sowie Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI) bestimmt.

Der Vorteil der von uns verwendeten Methode ist darin zu sehen, daß sie zeitsparend und gut reproduzierbar arbeitet und daß alle Reagentien gebrauchsfertig zu kaufen sind.

Material und Methodik

Entamoeba histolytica wurde aus dem Stuhl von Patienten nach der Methode von ROBINSON (9) kultiviert. Fünf Tage nach Anzucht wurden die Kulturen geerntet, die Trophozoiten $3 \times$ in 2 mmol Äthylendiaminetetraazetat/Epsilon-Aminokapronsäure (EDTA/EACA)-Puffer bei pH 7 gewaschen, das Sediment in einem Tropfen dieses Puffers resuspendiert, durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert und vor der Insertion auf die Gelplättchen bei 2000 g (4° C) 10 Minuten lang zentrifugiert.

Isoelektrofokussierung

Die Isoelektrofokussierung wurde mittels Phast®-System (Pharmacia Uppsala, Schweden) durchgeführt. Verwendet wurden IEF pH 5-8 Polyacrylamid-Gradientengele, die in dieser Form kommerziell angeboten werden. Pro Gel stehen acht Insertionsplätze zur Verfügung, es kann auf zwei Gelen parallel getrennt werden. Die Isoelektrofokussierung wurde bei 600 V (30 Minuten, 15° C; Original Phast®-Methode) durchgeführt.

Enzym-Substratreaktion

Nach dem Separationsschritt wurden die Gele in Petrischalen mit 50 mm Durchmesser eingebracht und mit frisch zubereiteten Substratlösungen (Formazan-Entwicklung unter Verwendung der Färbemethoden nach BAGSTER und PARR (1) überschichtet. Die Entwicklung erfolgte bei 37° C für 30 Minuten bei Dunkelheit. Danach wurden die Gele mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Solcherart gewonnene Gele lassen sich problemlos über mehrere Monate zu Dokumentationszwecken aufbewahren.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 1 gezeigt, finden sich die im ME-Banden von *Entamoeba histolytica* am oberen (alkalischen) Ende des Gels fokussiert. Alle von uns getesteten Stämme von *Entamoeba histolytica* weisen eine Hauptbande 21 mm über dem Insertionspunkt auf. Bei einigen Stämmen von *Entamoeba histolytica* zeigt sich eine Nebenbande im Abstand von etwa 3 mm zur Hauptbande. Diese Befunde stimmen im wesentlichen mit denen von SARGEAUNT (10) überein, der ebenfalls eine in gleicher Position befindliche ME-Bande für alle Stämme von *Entamoeba histolytica* nachgewiesen hat. Die anderen Darmamöben lassen ebenfalls eine ME-Bande erkennen, die jedoch — mit Ausnahme der von *Dientamoeba fragilis* — an anderer Stelle fokussieren.

Die Isoenzymbanden von PGM lassen in Abhängigkeit von der Pathogenität des getesteten Amöbenstammes unterschiedliche Positionen erkennen. Ganz ähnlich wie in der Stärkegelelektrophorese nach SARGEAUNT (10) sind die nicht-pathogenen Stämme von *Entamoeba histolytica* durch das Vorhandensein einer PGM-Bande nahe dem Auftragungsort charakterisiert, wobei fallweise eine zweite Bande zur Darstellung kommt. Die pathogenen Stämme von *Entamoeba histolytica* hingegen zeigen lediglich die vom

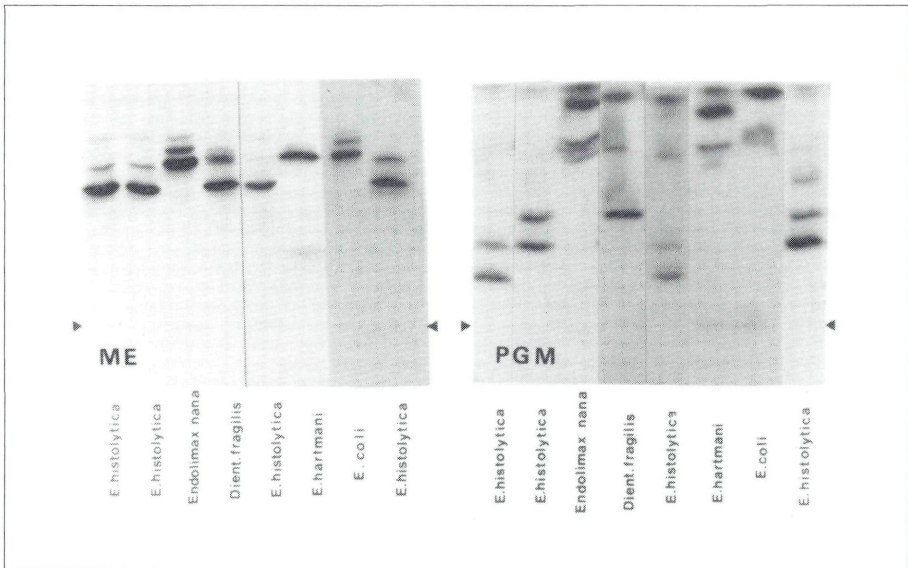


Abb. 1:

Darstellung der ME und PGM mittels Phast®-System von verschiedenen *Entamoeba* species auf pH 5-8 Polyacrylamid-Gradientengelplättchen

Auftragungsort entferntere Bande, die fallweise mit einer noch weiter vom Auftragungsort entfernten Bande assoziiert gefunden werden kann. Alle anderen Darmamöben zeigen dieses Isoenzymmuster nicht; die PGM-Bande von *Dientamoeba fragilis* entspricht in ihrer Position der am weitesten vom Auftragungsort entfernten Bande pathogener Stämme von *Entamoeba histolytica*.

Die GPI-Banden zeigten bei den verschiedenen Stämmen von *Entamoeba histolytica* unterschiedliche Verteilungsmuster. Sie waren aber im Gegensatz zu den GPI-Banden anderer Darmamöben nahe der Auftragsstelle fokussiert, wobei 13 verschiedene Banden zur Darstellung kamen (Details nicht dargestellt).

Diskussion

Die Isoelektrofokussion mittels Phast®-System ist nicht als Methode zur Zymodembestimmung von *Entamoeba histolytica* vorgesehen; sie soll lediglich als leicht durchführbare Methode zur Feststellung der Pathogenität von *Entamoeba histolytica* verwendet werden. Weiters bietet diese Methode die Möglichkeit, *Entamoeba histolytica* von anderen Darmamöben sicher zu unterscheiden, was den Vorteil hat, Lysate von Amöben ohne vorherige morphologische Zuordnung als *Entamoeba histolytica* zu identifizieren. Die Pathogenitätsbestimmung von Amöbenisolaten mittels Isoenzymbestimmung bietet den praktischen Vorteil, die Behandlungswürdigkeit der intestinalen Amöbiasis zu objektivieren und damit die unnötige Therapie mittels Benzimidazolderivaten in über 90% aller Patienten mit Nachweis von *Entamoeba histolytica* im Stuhl zu vermeiden. Die Einwände von MIRELMAN (3) gegen die Brauchbarkeit der Isoenzymbestimmung als Pathogenitätsmarker von *Entamoeba histolytica* können seit dem Nachweis genomischer DNA-Unterschiede zwischen pathogenen und nicht pathogenen Stämmen von *Entamoeba histolytica* durch TANNICH et al. (11) als bestenfalls in vitro

relevant bezeichnet werden; die Eigenschaft „pathogen“ und „nicht pathogen“ ist zwar genetisch fixiert, läßt sich aber durch extreme Veränderungen der Kulturbedingungen beeinflussen. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen dürfte aber jedenfalls ein Zymodem-“switch“ in vivo nicht zu beobachten sein, weshalb diese Kritik mehr akademischen Charakter haben dürfte. Bezüglich der Durchführbarkeit der Zymodembestimmung in der parasitologischen Routine dürfte durch die Verwendung des Phast®-Systems eine wesentliche Barriere gefallen sein.

1. Das Phast®-System bedient sich einer semi-automatisch arbeitenden Elektrophoresekammer. Als Trägermedium dient ein Polyacrylamidgelplättchen mit vorgegebenem pH-Bereich, die Fokussierung ist nach einer halben Stunde beendet. Im Gegensatz dazu wird die Stärkegel-Elektrophorese mittels eigens konstruierter Kammer durchgeführt, das Gel muß jeweils frisch gegossen werden und die Separationszeit beträgt drei Stunden.

2. Die Probemenge beträgt beim Phast®-System 1 µl, was 500 Trophozoiten entspricht, die Auftragung erfolgt automatisch, die Entwicklung der Isoenzymbanden erfolgt in Petrischalen, wofür lediglich 3 ml der Enzym-Substratkaskade erforderlich sind. Bei der Stärkegel-Elektrophorese wird ein Probenvolumen von 20 µl benötigt, was einer Trophozoitenzahl von 10.000 entspricht, die Probenauftragung wird mit der Hand durchgeführt und bedarf großer Geschicklichkeit. Die Entwicklung der Isoenzymbanden erfolgt durch Überschichtung mit der Enzym-Substratkaskade, die in Agarose inkorporiert ist. Die Menge an Reagentien beträgt hier 15 ml.

3. Die Reproduzierbarkeit beider Methoden ist vergleichbar, die Dokumentation der Resultate erfolgt beim Phast®-System durch Aufbewahrung der luftgetrockneten Gele; bei der Stärkegel-Elektrophorese erfolgt die Dokumentation durch Fotografie.

4. Die Kosten für die Isoenzymbestimmung von PGM und ME betragen ohne Berechnung des Anschaffungspreises der Apparatur 5,4 US \$, bei der Stärkegel-Elektrophorese 12 US \$.

5. Der Vergleich der Kosten der Isoenzymbestimmung gegenüber jener Chemotherapie ergibt, daß die Tinidazolkur eines Erwachsenen 57 US \$, die Isoenzymbestimmung jedoch nur 5,4 US \$ kostet.

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Isoenzyme hat ihre Brauchbarkeit zur Unterscheidung von *Entamoeba histolytica* von anderen Darmamöben sowie zur Bestimmung der Pathogenität von *Entamoeba histolytica* bereits in zahlreichen Untersuchungen unter Beweis gestellt. Die vor über zehn Jahren eingeführte Originalmethode, bei der die Isoenzymbestimmung mittels einer Stärkegel-Elektrophorese durchgeführt wird, bedarf aber geschulten technischen Personals und ist außerdem von Seiten der Reagentien ziemlich teuer. Wir haben daher das kürzlich entwickelte Phast®-System (Pharmacia, Schweden) für die Isoenzym-Isoelektrofokussierung adaptiert. Dieses System erlaubt eine semi-automatische Trennung der Lysate von *Entamoeba histolytica* mit den handelsüblichen, gebrauchsfertigen Polyacrylamid-Gradientengelen. Die Bestimmung der NADP-Oxidoreduktase (ME) und der Phosphoglukomutase (PGM) wurde auf Gradientengel von pH 5 bis 8 durchgeführt. Auf einem einzelnen Gel, welches 43 × 50 × 0,35 mm groß ist, können gleichzeitig acht Proben in einer Zeit von 30 Minuten bei 15° C (600 V) bestimmt werden. Nach der Enzym-Substratreaktion werden die Gele einfach mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Es konnte gezeigt werden, daß die Isoenzymbanden von PGM und ME jenen der ursprünglichen Stärkegel-Elektrophorese sehr ähnlich sind und mit der Originalmethode gut übereinstimmen. Die Phast®-Methode bringt im direkten Vergleich wesentliche Vorteile, wie bessere Reproduzierbarkeit und deutlich geringere Kosten gegenüber der Originalmethode.

Schlüsselwörter

Entamoeba histolytica, Isoelektrofokussierung, Phast®-System.

Summary

Suitability of the Phast®-system for discrimination of *Entamoeba* isolates by isoenzyme isoelectrofocussing

Isoenzyme determination proved to be a valuable tool to discriminate between saprophytic and pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*, thereby providing a guideline for therapeutic approaches. The originally described separation technique by starchgel electrophoresis requires skilled technical personnel and relatively high amounts of the substrate enzyme complex for the development of the isoenzyme bands, which makes the procedure expensive. We therefore used the recently developed Phast®-system (Pharmacia, Sweden) for isoelectrofocussing (IEF) which allows a semiautomatic separation of lysates of *Entamoeba histolytica* on commercially available ready-to-use polyacrylamide-gradient-gel. Determinations of isoenzymes of NADP-oxidoreductase (ME) and phosphoglucumutase (PGM) were performed along a pH gradient of 5-8. One single IEF-plate, measuring $43 \times 50 \times 0,35$ mm allows the simultaneous run of 8 samples which takes 30 min. at 600 V and 15° C. After enzyme/substrate reaction gels are washed with water, then simply air-dried and can be stored for several months. The position of isoenzyme bands of PGM and ME resembles very closely those seen after the original starchgel electrophoresis, thus allowing a precise assessment of pathogenicity of the respective strain. Moreover, the isoenzyme pattern of ME and GPI make it possible to distinguish between *Entamoeba histolytica* and other amoebae of the human gut.

Key words

Entamoeba histolytica, Isoelectrofocussing, Phast®-system.

Literatur

1. BAGSTER, I. A., PARR, C. W. (1973):
Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes.
Nature 244, 364-366.
2. KOLLARITSCH, H., GRAF, J., STEMBERGER, H., KRUMPOLZ, B., BINDER, M., SCHEINER, O., WIEDERMANN, G. (1989):
Interaction of different strains of *Entamoeba histolytica* with target cells: Characterization of elektrophysiological and morphological features.
Immunobiol., Vol 179, 190-201.
3. MIRELMAN, D. (1987):
Effect of culture conditions and bacterial associates on the zymodemes of *Entamoeba histolytica*.
Paras. Today, 3, 37-40.
4. RAVDIN, J. I., CROFT, B. Y., GUERRANT, R. L. (1980):
Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*.
J. Exp. Med. 152, 377.
5. RAVDIN, J. I., GUERRANT, R. L. (1981):
Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes.
J. Clin. Invest. 68, 1305.
6. RAVDIN, J. I., MURPHEY, C. F., SALATA, R. A., GUERRANT, R. L., HEWLETT, E. L. (1985):
N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro.
J. Infect. Dis. 151, 804.

7. RAVDIN, J. I., JOHN, J. E., JOHNSTON, L. I., INNES, D. J., GUERRANT, R. L. (1985):
Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa.
Infect. Immun. 48, 292.
8. REED, S. L., SARGEANT, P. G., BRAUDE, A. I. (1983):
Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 248.
9. ROBINSON, G. L. (1968):
The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 285-295.
10. SARGEANT, P. G., WILLIAMS, J. E., GRENE, J. D. (1978):
The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 519.
11. TANNICH, E., HORSTMANN, R. D., KNOBLOCH, J., ARNOLD, H. H. (1989):
Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol 86, 5118-5122.
12. TRISSL, D., MARTINEZ-PALOPMO, A., ARGUELLO, C., DE LA TORRE, M., DE LA HOZ, R. (1977):
Surface properties related concanavalin-A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains.
J. Exp. Med. 145, 652.
13. WARREN, K. S., MAHMOUD, M. D. (1985):
Tropical and geographical medicine.
Int. Student ed. p 1078.

KORRESPONDENZADRESSE:

Doz. Dr. Herwig Kollaritsch
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1090 Wien · Austria

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: 1990

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Stemberger Heinrich, Binder Marina, Kollaritsch Herwig, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Isoenzym-Isoelektrofokussierung mittels Phast®-System zur Pathogenitätsbestimmung von Entamoeba histolytica. 13-18](#)