

Ein monoklonaler Antikörper zur Unterscheidung von Entamoeba histolytica und Entamoeba dispar

Alexandra Marinets^{1,2}, Nancy Guillén³, Barbara Bohle², Ute Siemann²,
O. Scheiner², G. Wiedermann¹, M. Duchêne^{1,2}

Einleitung

Entamoeba histolytica ist der Erreger der invasiven Amöbiasis, die jedes Jahr weltweit zu Millionen von Erkrankungen und Zehntausenden Todesfällen führt (20). Etwa eine halbe Milliarde Menschen sind Träger von Amöben, in den meisten Fällen sind diese aber harmlose, nichtpathogene Amöben, früher nichtpathogene *E. histolytica*, heute *Entamoeba dispar* genannt (3). Für die Einschätzung einer Amöbeninfektion ist es von größter Bedeutung, pathogene und nichtpathogene Amöben zu unterscheiden. Dies glückte erstmals SARGEANT (4, 15) mit Hilfe von Isoenzymmustern der Phosphoglukomutase, Hexokinase und Glukosephosphatisomerase. Später wurde eine Reihe von genetischen Unterschieden zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* entdeckt (z. B. 5, 11, 18, 19), aber auch Antikörper, die *E. histolytica* besser als *E. dispar* erkannten (z. B. 6, 9, 16).

In dieser Studie wird am Beispiel eines monoklonalen Antikörpers (EH7) beschrieben, wie Proben zur Charakterisierung von Oberflächenstrukturen von *E. histolytica* und für die Differenzierung zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* gewonnen wurden.

Material und Methoden

Amöbenstämme und
Wachstumsbedingungen

Trophozoiten der pathogenen *E. histolytica*-Stämme SFL-3, 200:NIH, HK-9 und HM-1:IMSS wurden axenisch bei 37°C in TYI-S-33 Medium (1) gezüchtet. Der nichtpathogene *E. dispar*-Stamm SAW 142 wuchs xenisch in TYSGM-9 Medium (2).

Immunisierung von Mäusen
und Antikörperproduktion

Vier weibliche BALB/c Mäuse (Forschungsinstitut für Versuchstierzucht, Himberg, Austria) wurden intraperitoneal immunisiert (Versuchsbeginn Nov. 1993). Die erste Dosis waren 50-75 µg einer Membranpräparation (13) aus *E. histolytica* SFL-3 in 150 µl 0,9% (w/v) NaCl, vermischt mit 150 µl von komplettem Freund's Adjuvans, gefolgt von zwei Dosen des Antigens mit inkomplettem Freund's Adjuvans an den Tagen 27 und 35. Die Immunantwort wurde mittels ELISA (siehe unten) verfolgt. Drei Tage vor der Fusion erhielten die Mäuse eine intravenöse Injektion von 100 µl (0,5 µg/µl), einen Tag später von 50 µl von Amöbenmembranantigenen in PBS. Zwei Tage später wurde der Maus mit dem höchsten ELISA-Titer die Milz entnommen. Die daraus gewonnenen Splenozyten wurden in einem Verhältnis 1 : 5 mit P3-X-Ag8.653X Myelomzellen fusioniert (7). Die Hybridome wurden in Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) Medium selektiert. ELISA-positive Hybridome wurden mit Hilfe des Grenzverdünnungsverfahren kloniert und in HT Medium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (Sebak, Suben, Austria) gezüchtet.

- ELISA-Methoden ELISA Mikrotiterplatten (Greiner, Kremsmünster, Austria) wurden mit 100 μ l der Membranpräparation von *E. histolytica* oder *E. dispar* (1 mg/ml in 0,1% [w/v] Ammoniumazetat, 0,2% [w/v] NaN₃) pro Nüpfchen beschickt und über Nacht getrocknet. Die Hybridomüberstände wurden in verschiedenen Verdünnungen in PBS zugesetzt und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Die Platten wurden fünfmal gewaschen, und die gebundenen Antikörper wurden mit Peroxidase-gekoppelten Antimaus-Antikörpern (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania) in einer Verdünnung von 1:1000 detektiert. ABTS (2,2'-Azinobis[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]) wurde für 30 Minuten zugegeben und die Absorption bei 405 nm bestimmt.
- Immunoblots Immunaффinitätsgereinigtes Galaktoselektin, das nach SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Nitrozellulose übertragen worden war, wurde uns dankenswerterweise von DR. E. TANNICH (Bernhard Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Streifen von der Nitrozellulosemembran wurden mit 1:100 Verdünnungen verschiedener Hybridomüberstände inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe von ¹²⁵J-markierten Schaf-Antimaus-Antikörpern (Amersham, Buckinghamshire, UK) markiert und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.
- Indirekte Immunfluoreszenz (12) *E. histolytica* HM-1:IMSS-Trophozoiten wurden mit PBS gewaschen, auf ein Deckgläschen in einer Petrischale übertragen und bei 37°C 10 Minuten inkubiert, um die Anheftung der Amöben zu fördern. PBS wurde entfernt und die Deckgläschen wurden 30 Minuten in 3,5% (w/v) Paraformaldehyd und danach 3 Minuten mit Methanol (-20°C) inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen 30 Minuten in 50 mM NH₄Cl und 30 Minuten in PBS mit 1% (w/v) Magermilchpulver inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Deckgläser mit einer 1:100 Verdünnung (1:10 in PBS) von Protein G (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gereinigten monoklonalen Antikörpern 60 Minuten inkubiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Die Proben wurden dann 30 Minuten in einer Verdünnung von Rhodamin-markierten Kaninchen-Antimaus-Antikörpern (Sigma, St. Louis, Missouri) inkubiert, die mit Trophozoiten wie beschrieben (12) präabsorbiert worden waren. Zuletzt wurden die Proben 30 Minuten in PBS mit 1% (w/v) Magermilchpulver inkubiert, kurz mit PBS gewaschen und mit 70% (v/v) Glycerin in PBS auf einem Objektträger fixiert.
- Konfokalmikroskopie Die wie oben beschrieben hergestellten Präparate wurden auf einem Leica DIAPLAN Laserkonfokalmikroskop (Leica, Heidelberg, Deutschland) mit einem 63X Objektiv untersucht. Die Rhodamin-markierten Proben wurden nach Anregung bei 568 nm mit einem auf 535 nm (\pm 8 nm) zentrierten RG610 Interferenzfilter betrachtet. Zehn Ebenen mit einem Abstand von jeweils 0,5 μ m reichten aus, um eine Zelle von unten bis oben abzubilden. Die dreidimensionale Rekonstruktion von Serien von Konfokalschnitten wurde mit Hilfe der CLSM-Leica Software durchgeführt. Die Fotografien wurden auf Kodak T-max 400 Filmen mit einer 35 mm Kamera auf einem Polaroid Freeze-Frame Videomonitor aufgenommen.

Resultate

- Produktion von monoklonalen Antikörpern Mit einer Membranpräparation von *E. histolytica* SFL-3 als Mischung von Antigenen wurden aus einer Fusion insgesamt acht monoklonale Antikörper gewonnen, die EH1 bis EH8 genannt wurden. Jeder der Antikörper war sowohl im Immunoblot als auch im ELISA mit Membranantigenen positiv. Diese Mitteilung befaßt sich mit dem Antikörper EH7.
- Vergleich zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* Membranantigenen im ELISA mit Antikörper EH7 Erste Tests hatten gezeigt, daß von den acht monoklonalen Antikörpern drei (EH5, EH7 und EH8) bevorzugt an *E. histolytica* banden. Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse einer Doppelbestimmung für den Antikörper EH7. Für diesen Versuch wurden gleiche Mengen von Membranpräparationen von den *E. histolytica*-Stämmen SFL-3, 200:NIH, HK-9 und HM-1:IMSS und von dem *E. dispar*-Stamm SAW142 zur Beschichtung von ELISA-Platten verwendet und mit einer 1:100 Verdünnung des Antikörpers EH7 inkubiert. Abbildung 1 zeigt, daß alle *E. histolytica*-Stämme stark positiv und *E. dispar* negativ reagierten.

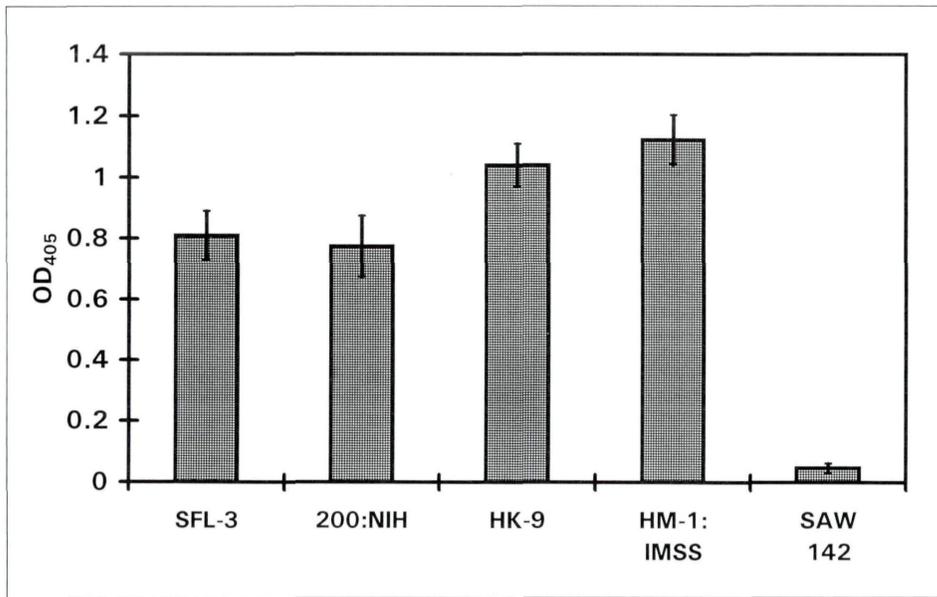


Abbildung 1:

ELISA mit Membranpräparationen aus verschiedenen *E. histolytica* und *E. dispar* Stämmen und dem Antikörper EH7. Membranpräparationen aus *E. histolytica* SFL-3, 200:NIH, HK-9, HM-1:IMSS und *E. dispar* SAW 142 wurden zum Beschichten der ELISA-Platten verwendet. Die Präparationen wurden mit dem Antikörper EH7 geprobt. Die Balken zeigen die OD₄₀₅ der Peroxidasereaktion, gemessen als Mittelwert von zwei Bestimmungen.

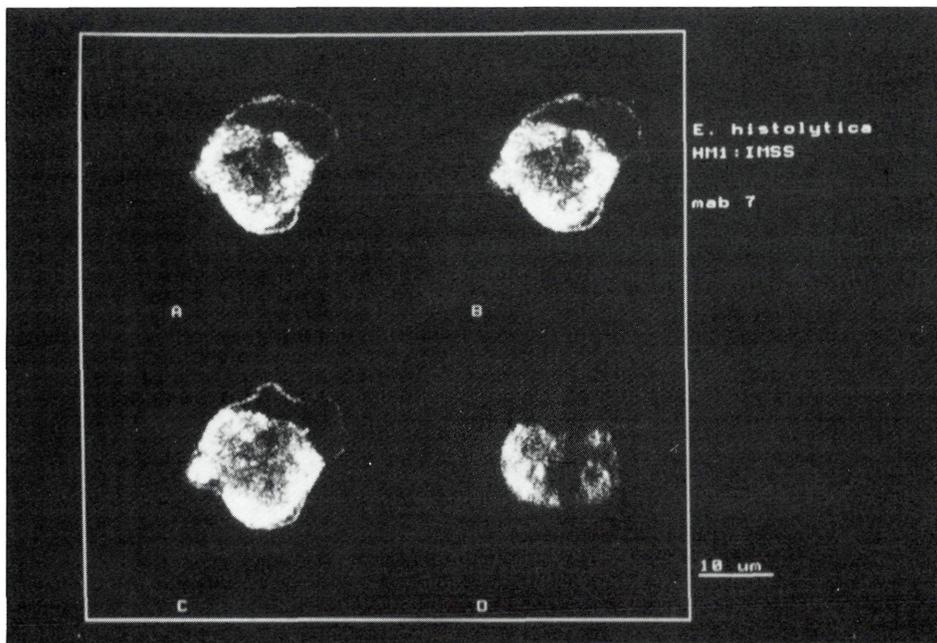


Abbildung 2:

Lokalisierung des EH7 Antigens in *E. histolytica* HM-1:IMSS Trophozoiten mit Hilfe der Konfokalmikroskopie. A, B, C sind Horizontalebene, D ist die Vertikalebene in der Mitte der Amöbe.

Zelluläre Lokalisation des Antigens, das von Antikörper EH7 erkannt wird

Um die Lokalisation des EH7 Antigens in den Amöben zu bestimmen, wurden die Trophozoiten fixiert und mit dem Antikörper EH7 inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem rhodaminmarkierten zweiten Antikörper markiert und die Amöben im Konfokalmikroskop betrachtet. Abbildung 2 zeigt vier verschiedene optische Schichten eines markierten Trophozoiten. Antikörper EH7 färbte eindeutig die Oberfläche der Amöben, aber auch eine große Zahl von intrazellulären Strukturen. Unter den gleichen Bedingungen erkannte der Antikörper EH5 fast ausschließlich Oberflächenstrukturen, während der sekundäre Antikörper allein negativ war (Resultate nicht gezeigt).

Identifizierung des EH7 Antigens

Proben von Membranpräparationen aus verschiedenen *E. histolytica* Stämmen wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblotet und mit dem Antikörper EH7 inkubiert. Dabei trat eine Bande um 170 kD auf, die von der Größe her dem gut charakterisierten (8, 10, 17) Galaktose-Lektin der Amöben entsprechen konnte.

Dankenswerterweise stellte DR. E. TANNICH uns mehrere Blotstreifen mit isoliertem Galaktose-Lektin zur Verfügung, die wir mit dem Antikörper EH7 und als Kontrolle mit dem Antikörper EH8 inkubierten. Abbildung 3 zeigt, daß der Antikörper EH7 das Galaktose-Lektin erkannte.

Diskussion

In den vergangenen Jahren wurden sowohl auf DNS- als auch auf Antikörper-ebene Nachweismethoden entwickelt, die pathogene und nichtpathogene Amöben eindeutig voneinander unterscheiden können und deshalb die Redefinition pathogener Amöben als *E. histolytica* und nichtpathogener Amöben

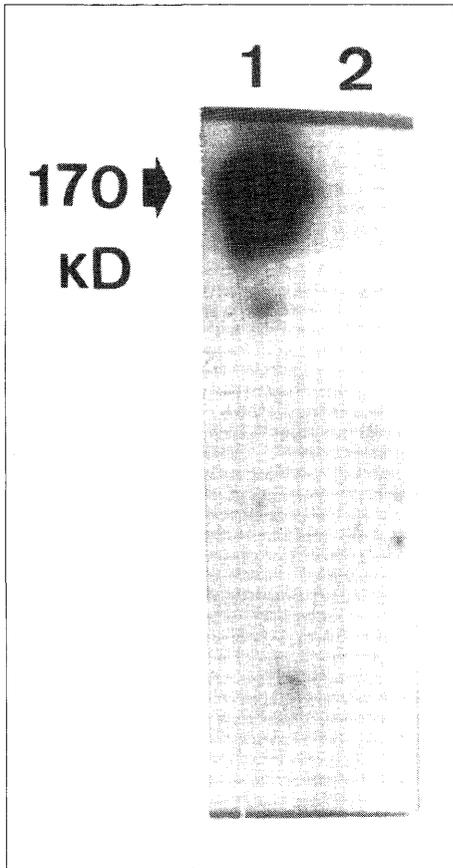


Abbildung 3:

Immunoblot. Galaktose-Lektin, aus axenisch gewachsenen Trophozoiten von *E. histolytica* HM-1:IMSS wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, auf Nitrozellulose gebliottet und mit einer 1:100 Verdünnung der Hybridomüberstände von den Antikörpern EH7 und EH8 geprobt. Die gebundenen Antikörper wurden mit ¹²⁵J-Schaf-Antimaus-Antikörpern detektiert. Spur 1 = Antikörper EH7, Spur 2 = Kontrollantikörper EH8.

als *E. dispar* (3) als zweier getrennter Arten eindeutig unterstützen, und eine Umschaltung zwischen beiden höchst unwahrscheinlich machen. Damit werden auch diese Tests wichtiger, denn mit ihrer Hilfe kann man asymptomatische Infektionen mit *E. histolytica* und *E. dispar* unterscheiden (14). Nur im Fall der Infektion mit *E. histolytica* ist dann eine Chemotherapie notwendig. Da der Antikörper EH7 das Galaktose-Lektin erkannte, war er den Antikörpern aus dem Labor von PROF. W. A. PETRI ähnlich, die ebenfalls mit pathogen-spezifischen Epitopen des Galaktose-Lektins reagierten (9). Der Antikörper EH7 und die beiden anderen *E. histolytica* spezifischen Antikörper sollen in Zukunft weiter auf ihre Verwendbarkeit zur Differenzierung zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* getestet werden.

Erstaunlicherweise färbte der Antikörper EH7 auch das Innere der Trophozoiten stark an, obwohl das Galaktose-Lektin eindeutig als Oberflächenprotein bekannt ist. Man könnte sich vorstellen, daß der Antikörper frisch synthetisiertes Lektin erkennt, das die Oberfläche noch nicht erreicht hat, aber es könnte auch sein, daß die Amöben bei der Phagozytose oder Pinozytose mit den Membranen auch EH7 Antigen aufnehmen und dann wieder zur Oberfläche zurückführen.

Mit Hilfe einer Zahl von spezifischen Sonden kann es in Zukunft gelingen, nicht nur pathogene und nichtpathogene Amöben voneinander zu unterscheiden, sondern auch die Struktur und Dynamik der Amöbenoberfläche besser zu verstehen.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. E. Tannich für die Überlassung von Proben von isoliertem Galaktose-Lektin, Frau H. Erben für die hervorragende Betreuung der Amöbenkulturen. Diese Arbeit wurde von Projekt P09256-MED des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, unterstützt.

Zusammenfassung

Entamoeba histolytica ist, besonders in den wärmeren Ländern, ein Verursacher von signifikanter Morbidität und Mortalität. Um antigene Strukturen des Parasiten zu charakterisieren, wurde eine Reihe von monoklonalen Antikörpern gegen eine Membranpräparation von *Entamoeba histolytica* SFL-3 erzeugt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden die Antigene in ganzen Amöben lokalisiert. Die Analyse der angefärbten Präparate mit Hilfe der Konfokalmikroskopie zeigte, daß Antikörper EH7 die Oberfläche der Amöben, aber auch sehr stark die Vesikelstrukturen im Inneren der Amöben anfärbte. Antikörper EH7 band im Immunoblot an das gereinigte Galaktose-Lektin. Ein ELISA mit Membranpräparationen aus *E. histolytica* und *E. dispar* Stämmen zeigte, daß das Epitop für den Antikörper EH7 bevorzugt auf *E. histolytica* vorkam und deshalb für die Differenzierung von *E. histolytica* (pathogen) und *E. dispar* (nichtpathogen) nützlich sein könnte.

Schlüsselwörter *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, monoklonale Antikörper.

Summary *A monoclonal antibody for the differentiation between Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*

Entamoeba histolytica causes extensive morbidity and mortality worldwide, especially in the warmer countries. In order to characterize antigenic structures from *Entamoeba histolytica*, a panel of mouse monoclonal antibodies was raised against a membrane preparation from

E. histolytica strain SFL-3. We used immunofluorescence to localize the antigens in entire amebae. Analysis of stained trophozoites with a laser confocal microscope showed that antibody EH7 labelled the surface of the amebae as well as vesicles inside the amebae. Antibody EH7 bound to the purified galactose lectin of *E. histolytica*. An ELISA using membrane preparations from *E. histolytica* and *E. dispar* strains showed that the epitope of antibody EH7 occurred preferentially on *E. histolytica* strains. Therefore antibody EH7 could be useful as a reagent for the differentiation of *E. histolytica* (pathogenic) and *E. dispar* (nonpathogenic).

Key words *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, monoclonal antibody, diagnosis.

Literatur

1. DIAMOND, L. S., HARLOW, D. R., CUNNICK, C. C. (1978):
A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 431-432.
2. DIAMOND, L. S. (1982):
A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa.
J. Parasitol. 68, 958-959.
3. DIAMOND, L. S., CLARK, C. G. (1993):
A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (amended Walker, 1911) separating it from
Entamoeba dispar, Brumpt, 1925.
J. Eukaryot. Microbiol. 40, 340-344.
4. FARRI, T. A., SARGEAUNT, P. G., WARHURST, D. C., WILLIAMS, J. E., BHOJNANI, R. (1980):
Electrophoretic studies of the hexokinases of *Entamoeba histolytica* groups I to IV.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 672-673.
5. GARFINKEL, L. I., GILADI, M., HUBER, M., GITLER, C., MIRELMAN, D., REVEL, M., ROZENBLATT, S. (1989):
DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* processing pathogenic or nonpathogenic zymodemes.
Infect. Immun. 57, 926-931.
6. GONZALEZ-RUIZ, A., HAQUE, R., REHMAN, T., AGUIRRE, A., JARAMILLO, C., CASTANON, G., HALL, A.,
GUHL, F., RUIZ-PALACIOS, G., WARHUST, D. C., MILES, M. A. (1992):
A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*.
J. Clin. Microbiol. 30, 2807-2813.
7. JAROLIM, E., TEJKL, M., ROHAC, M., SCHLERKA, G., SCHEINER, O., KRAFT, D., BREITENBACH, M., RUMPOLD, H.
(1989):
Monoclonal antibodies against birch pollen allergens: characterization by immunoblotting and use for
single-step affinity purification of the major allergen Bet v I.
Int. Arch. All. Appl. Immunol. 90, 54-60.
8. MANN, B. J., TORIAN, B. E., VEDVICK, T. S., PETRI, W. A. (1991):
Sequence of a cysteine-rich galactose-specific of *Entamoeba histolytica*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3248-3252.
9. PETRI, W. A., JACKSON, T. F. H. G., GATHIRAM, V., KRESS, K., SAFFER, L. D., SNODGRASS, T. L.,
CHAPMAN, M. D., KEREN, Z., MIRELMAN, D. (1990):
Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal
antibodies to the galactose-specific adherence lectin.
Infect. Immun. 58, 1802-1806.
10. PETRI, W. A., SMITH, R. D., SCHLESINGER, P. H., MURPHY, C. F., RADVIN, J. I. (1987):
Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*.
J. Clin. Invest. 80, 1238-1244.
11. PLAIMAUER, B., ORTNER, S., WIEDERMANN, G., SCHEINER, O., DUCHÊNE, M. (1994):
An intron-containing gene coding for a novel 39-kilodalton antigen of *Entamoeba histolytica*.
Mol. Biochem. Parasitol. 66, 181-185.
12. RAHIM, Z., RAYMOND-DENISE, A., SANSONETTI, P., GUILLÉN, N. (1993):
Localization of myosin heavy chain A in the human pathogen *Entamoeba histolytica*.
Infect. Immun. 61, 1048-1054.

13. RAMWANI, J., MISHRA, R. K. (1986):
Purification of bovine striatal dopamine D-2 receptor by affinity chromatography.
J. Biol. Chem. 261, 8894-8898.
14. RADVIN, J. I. (1994):
Diagnosis of invasive amoebiasis – time to end the morphological era.
Gut 35, 1018-1021.
15. SARGEAUNT, P. G., WILLIAMS, J. E., GRENE, J. D. (1978):
The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis.
Trans. R. Soc. Med. Hyg. 72, 519-521.
16. STRACHAN, W. D. SPICE, W. M., CHIODINI, P. L., MOODY, A. H., ACKERS, J. P. (1988):
Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*.
Lancet 561-563.
17. TANNICH, E., EBERT, F., HORSTMANN, R. D. (1991):
Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1849-1853.
18. 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 86, 5118-5122.
19. TANNICH, E., SCHOLZE, H., NICKEL, R., HORSTMANN, R. D. (1991):
Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*.
J. Biol. Chem. 266, 4798-4803.
20. 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.

Korrespondenzadresse: Univ. Doz. Dr. Michael Duchêne
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 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: 1996

Band/Volume: [18](#)

Autor(en)/Author(s): Marinets A., Guillen Nancy, Bohle Barbara, Siemann U., Scheiner O., Wiedermann ,
Duchene [Duchéne] Michael

Artikel/Article: [A monoclonal antibody for the differentiation between Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar 195-200](#)