©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges.
Tropenmed. Parasitol. 19 (1997)
11 - 20

Laborgruppe Mikrobiologie (Leiter: PD Dr. med. L. Zöller)
Ernst Rodenwaldt-Institut Koblenz (Leiter: FLA Dr. D. Sobe)

Freilebende Amöben als Wirte und Vehikel von Mikroorganismen

Rolf Michel

Einleitung

Freilebende Amöben (FLA) der Gattungen *Acanthamoeba* und *Naegleria* u. a. haben in den letzten Jahren neben ihrer Rolle als Krankheitserreger zunehmende Beachtung als Wirtszellen von verschiedenen pathogenen Bakterienarten gefunden. Erstmalig hatte 1980 der Engländer ROWBOTHAM (27) erfolgreiche Kokultivierungsversuche von Akanthamoeben mit *Legionella pneumophila*, dem Erreger der Legionärskrankheit durchgeführt, die bei 35°C zur Invasion der Amöben durch die Legionellen mit anschließender intrazellulärer Vermehrung führten. Bei niedrigeren Temperaturen dagegen wurden die Legionellen — wie andere Futterbakterien auch — phagozytiert und verdaut. In entsprechend erwärmten Gewässern könnten die Wirtsamöben auf diese Weise zur Vermehrung und Verbreitung von *Legionella sp.* beitragen. Dieses für die Epidemiologie der Legionärskrankheit wichtige Phänomen wurde in der Folge von zahlreichen Autoren näher untersucht (2, 4, 5, 6, 10, 11, 14, 24,31, 32, 33). Das allgemein zunehmende Interesse an diesen Zusammenhängen bedeutet allerdings nicht, daß vorher keine resistenten intrazellulären Bakterien in FLA beobachtet worden wären, jedoch stießen die früheren Beobachtungen nicht auf ein entsprechendes Interesse, da die in der Amöbenzelle persistierenden Bakterien entweder als Endosymbionten angesehen wurden, oder wegen mangelnder in-vitro-Züchtbarkeit nicht identifizierbar waren. So hatte bereits NAEGLER (25) im Jahre 1910 „Micrococcen" in FLA beobachtet. PAGE (26) beschrieb 1974 Stäbchen in Sakkamoeben. DROZANSKI (9) hatte 1956 ein obligat intrazelluläres Bakterium als amoebiziden Parasiten in einem aus Erdboden isolierten Akanthamoebenstamm beschrieben, das nicht außerhalb von Amöben gezüchtet werden konnte. Erst mittels molekularbiologischer DNA-Analysen konnte dieser Endosymbiont 1991 als *„Sarcobium lyticum"* in ein enges Verwandtschaftsverhältnis zu *Legionella sp.* eingeordnet werden (30). Im Unterschied zur Vermehrung von *L. pneumophila* in Phagosomen innerhalb der Trophozoiten vermehrte sich *S. lyticum* intrazytoplasmatisch.

Diese teils historischen teils neueren Beobachtungen über eine intrazelluläre Vermehrung von Bakterien, die auch wie die Legionellen eine medizinische Bedeutung haben können, waren Anregung zur Suche nach weiteren Endozytobionten in Amöben aus der Umgebung des Menschen — mit der Bestrebung, sie zu isolieren und näher zu charakterisieren.

Überblick über den Stand eigener Untersuchungen

Das gleiche morphologische Bild intrazytoplasmatischer Vermehrung — wie eingangs für den von DROZANSKI (9) isolierten gramnegativen Endoparasiten *Sarcobium lyticum* (30) beschrieben — zeigt auch der Stamm K62 (Abb. 1), der in unserem Labor zusammen mit seiner Wirtsamöebe *Acanthamoeba sp.* (Gruppe II) aus einer mikrobiologisch bereits beanstandeten Trinkwasserleitung isoliert wurde (21). In der EM-Aufnahme (Abb. 2) erkennt man, daß die gram-negativen Stäbchen dieser

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

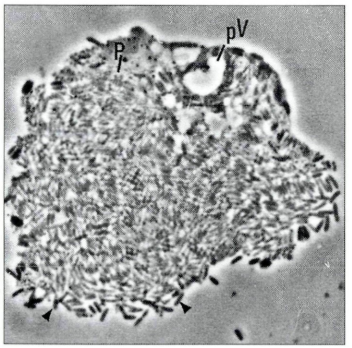

Abbildung 1:

Trophozoit von *Acanthamoeba sp.* mit einer Infektion von zahlreichen Stäbchenbakterien (P) (Stamm K62), die mit intrazytoplasmatischer Lokalisation (s. Abb.2) fast den gesamten Zellinnenraum ausfüllen. Kern und pulsierende Vakuole (pV) werden dabei in das Randplasma gedrängt. Durch Ruptur der Zellmembran werden einige Bakterien am unteren Rand frei. 940x.

„Llap's" *(legionella like amoebal pathogens)* (28) frei im Cytoplama liegen. Diese beiden Arten unterschiedlicher Lokalisierungen der Bakterien in Phagosomen bzw. im Zytoplasma der Trophozoiten spielen auch weiterhin eine wichtige Rolle bei der folgenden Darstellung eigener Beobachtungen intrazellulärer Vermehrung von Bakterien und anderen Mikroorganismen.

Im Rahmen einer Erhebung über Vorkommen und Häufigkeit von FLA in Feuchtbereichen von Physiotherapieeinheiten beobachteten wir in einer Primärkultur eine Kolonie von Akanthamoeben mit großen flüssigkeitsgefüllten Vakuolen, in denen stark bewegliche Stäbchenbakterien zu erkennen waren — einem Bild wie es z. B auch für eine Legionelleninfektion typisch ist (Abb. 3). Im Gegensatz zu einer Legionellen-Infektion trat das Phänomen jedoch bereits bei Zimmertemperatur auf.

Nach Isolierung des intrazellulären Keimes und Überprüfung seiner Identität durch Reinfektion des Original-Wirtsstammes ergab die mikrobiologische Untersuchung, daß es sich um eine Pseudomonade handelte, die in einer Reihe von Fällen unter dem Namen *Burgholderia pickettii* als Hospitalismuskeim für Atemwegsinfektionen, Septikaemien u. a. verantwortlich ist (12, 18).

Daraufhin mit *Pseudomonas aeruginosa* und *A. castellanii*, Stamm C3, durchgeführte Kokultivierungsversuche führten ebenfalls zu einer morphologisch identisch erscheinenden Infektion der Akanthamoeben. Bei diesem Versuch wurden nicht nur grob vakuolisierte Trophozoiten sondern ebenfalls massiv mit Pseudomonaden infizierte Zysten (Abb. 4) beobachtet. In Zysten eingeschlossene Bakterien sind in besonderem Maße gegen Chlor u. a. Biozide geschützt. So konnte KILVINGTON (15) zeigen, daß Legionellen enthaltende Akanthamoebenzysten noch gegenüber einer Chlorkonzentration von 50-75 mg/l resistent sind.

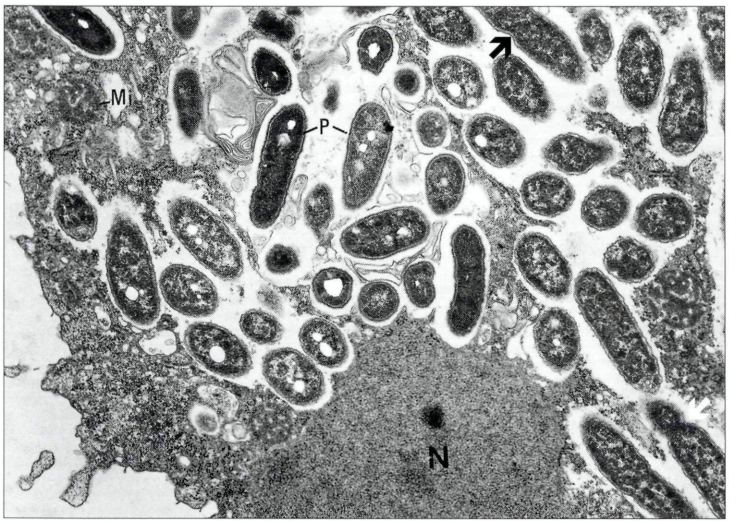

Abbildung 2:

Ausschnitt von einem mit K62 infizierten Trophozoiten von *Acanthamoeba sp.* Erkennbar sind gramnegative Stäbchen (P), die ohne Vakuolarmembran frei im Zytoplasma liegen, umgeben von einer hellen elektro-nendurchlässigen Zone, sog. *„Lakunen"* (n. Drozanski). Einzelne Teilungsstadien sind durch Pfeile gekennzeichnet. N = Kern; Mi = Mitochondrien 13 350x. Aufnahme: Dr. E. N. Schmid, Mikrobiolog. Institut Essen.

Akanthamoeben mit spontanen Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* konnten kurze Zeit nach den erfolgreichen Kokultivierungsversuchen aus einer Trinkwasserleitung in einem Neubauflügel eines Krankenhauses isoliert werden, aus deren Wasserproben ebenfalls höhere Koloniezahlen von *P. aeruginosa* nachgewiesen wurden (21). Auch *Echinamoeba*-Trophozoiten wiesen eine Infektion mit *Ps. aeruginosa* auf. Eine nachhaltige Sanierung dieses verkeimten und mit verschiedenen Amöbenarten belasteten Leitungssystems war nur über eine kombinierte chemische und thermische Behandlung möglich.

Nicht nur potentiell pathogene Bakterienarten sondern auch harmlose ubiquitäre Wasserkeime, wie Angehörige der Gattung *Cytophaga* wurden wiederholt aus Akanthamoeben, die aus verschiedenen Habitaten stammten, isoliert.

Als einer der ersten Stämme wurde die pigmentbildende *Cytophaga sp.* aus Acanthamoeben (Gruppe II) nachgewiesen (29), die aus exzidiertem Korneamaterial von einem Amöbenkeratitis-Patienten stammte. Die Frage, ob möglicherweise eine synergistische Steigerung der Virulenz von Akanthamoeben und ihren intrazellulären Parasiten bestand, konnte ohne Tierversuch nicht beantwortet werden.

Im Rahmen eines BMBF-Projekts zum Vorkommen von Amöben bei der Trinkwasseraufbereitung wurden neben *Cytophaga*- (20) und Flavobakteriumarten weitere harmlose aber auch potentiell pathogene Bakterienarten als intrazelluläre Parasiten aus Phagosomen von Akanthamoeben, Naeglerien und Vannellen isoliert. Wiederholt wurden Infektionen mit Stenotrophomonas *(Xanthomonas) maltophilia* aber auch mit verschiedenen Arten von Knallgasbakterien festgestellt (in Vorbereitung). In sämtlichen bisher geschilderten Fällen handelte es sich um gramnegative Stäbchen.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

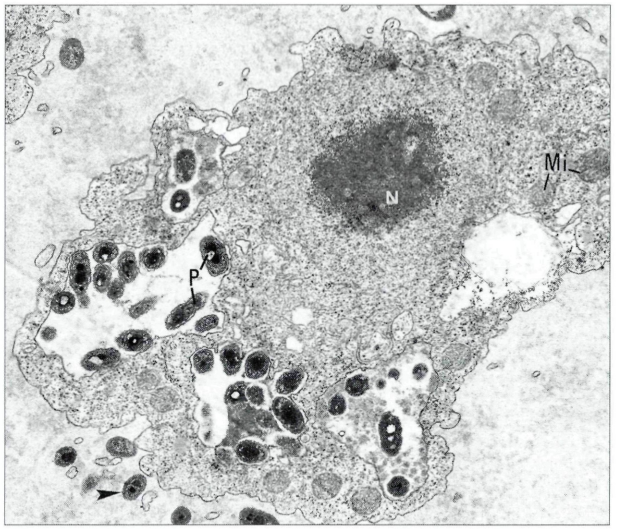

Abbildung 3:

Acanthamoeba sp. mit intravakuolärer Infektion von *Burgholderia pickettii*. Die gramnegativen Kurzstäbchen (P) vermehren sich ausschließlich in Flüssigkeitsgefüllten Vakuolen (Phagosomen). Pfeilkopf: freie Bakterien in der Umgebung.
N = Kern, Mi = Mitochondrien
5600x
Aufnahme: Dr. B. Hauröder / Ernst-Rodenwaldt-Institut Koblenz.

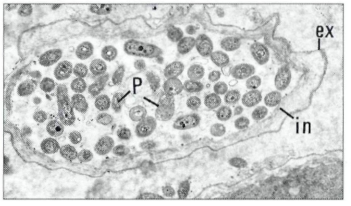

Abbildung 4:

Zyste von *Acanthamoeba sp.* (Stamm 8/2 aus einer Trinkwasserleitung) mit zahlreichen von einer doppelten Zystenhülle eingeschlossenen Kurzstäbchen von *Pseudomonas aeruginosa* (P) (St. 20-I) als Ergebnis einer Kokultivierung. Die Struktur des Wirtszellzytoplasmas ist in diesem Stadium bereits zerstört.
in = innere Zystenhülle;
ex = äußere Zystenhülle
3800x

In Ergänzung dazu wurden zwei Stämme kokkoider Bakterien mit intrazellulärer Vermehrung bereits 1992 (16) in Akanthamoeben nachgewiesen, die aus Nasenschleimhautabstrichen von weiblichen Probanden angezüchtet worden waren. Färberisch und elektronenmikroskopisch (Abb. 5) stellten sie sich als grampositive Kokken dar mit 0,5 µm Durchmesser. Pleomorphe Vermehrungsstadien erinnerten an Chlamydien. Sie weisen ein charakteristisches Fettsäureprofil auf, in dem die verzweigtkettigen Oxy-Fettsäuren dominieren (Abb. 6 [22]). Da die Elementarkörperchen der echten Chlamydienspezies eine gramnegative Hülle besitzen, war die Überraschung groß, als eine molekularbiologische Untersuchung durch Sequenzierung der 16SrRNA und 23SrRNA diese Parasiten in unmittelbare Nachbarschaft von echten Chlamydien stellte (1) mit einer Ähnlichkeit in den Basenpaaren von 86-87%. Da die drei Chlamydienspecies untereinander eine prozentuale Übereinstimmung von 94-96% besitzen, wurde *„Parachlamydia acanthamoebae"* als vorläufiger neuer Gattungs- und Artname vorgeschlagen. Die Ergebnisse beweisen somit, daß Akanthamoeben nicht nur Legionellen sondern auch Angehörige der Familie der *Chlamydiaceae* beherbergen können. Eine mögliche Bedeutung dieser Rifampicin-empfindlichen Amöbenparasiten für den Menschen ergibt sich aus der Tatsache, daß beide Stämme von Probanden und nicht aus der Umgebung isoliert wurden. Da sich ebenfalls bereits Säugerzellen mit den aus Amöben gewonnenen Bakteriensuspensionen infizieren ließen (22), ist zumindest die Annahme einer möglichen Pathogenität gerechtfertigt. Endgültigen Aufschluß hierüber könnten nur entsprechende Tierversuche oder der Nachweis dieser Keime aus menschlichem Untersuchungsmaterial geben.

Daß nicht nur Akanthamoeben und Naeglerien als Wirtszellen von Bakterien infrage kommen, zeigte die erstmalige Isolierung von zu den *Hartmannellidae* gehörenden Sakkamoeben mit großflächigen Parasitenaggregaten innerhalb der Zelle, die in 1 von 6 Wasserproben aus einem Zierfischaquarium isoliert wurden. Während PAGE (26) bereits 1974 stäbchenförmige Bakterien als Endosymbionten in Saccamoeben beschrieben hatte, handelte es sich im vorliegenden Fall um auch im Lichtmikroskop kokkoid erscheinende Bakterien innerhalb einer großen Vakuole (Abb. 7). Elektronenmikroskopisch ließen sich pleomorphe Vermehrungsstadien von abgerundeten infektiösen Stadien unterscheiden (Abb 8). Aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit verschiedenen zu den *Rickettsiaceae* gehörenden *Ehrlichia*-Arten, besonders *E. canis* und *E. equi*, wurden diese obligaten Amöbenparasiten vorläufig als *„Ehrlichia*-like" Organismen beschrieben (19) Ehrlichien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die retikuloendotheliale Zellen, speziell Leukozyten von Wild- und Haustieren, parasitieren. Sie sind bekannt z. B. als Erreger der kaninen Ehrlichiose und der equinen monozytären Ehrlichiosis *(E. ristici)*. Auch beim Menschen rufen sie, geographisch begrenzt, in Japan und Malaysia eine Mononukleose hervor — es ist die Art *E. sennetsu*. In USA ist vor kurzem die Art *E. chaffeensis* durch ANDERSON (3) als Erreger einer fieberhaften Erkrankung mit haematologischen Veränderungen beschrieben worden — in Europa nach unserer Kenntnis erst ein Fall durch MORAIS (23) in Portugal. Die Zugehörigkeit zu den *Rickettsiaceae* wurde kürzlich durch Einsatz einer spezifischen Hybridsonde, die zur in-situ-Markierung der Parasiten-DNS führte, bestätigt (AMANN, pers. Mitteilung).

Ebenfalls kokkoide Organismen, jedoch mit doppelt so großem Durchmesser (1 µm) fielen einem unserer Stipendiaten (13) im Zytoplasma von *Vannella cirrifera* auf, die aus einem Warmwasserleitungsnetz stammten. In der elektronenmikroskopischen Darstellung dieser „Kokken" wurde ein echter Zellkern erkennbar und damit die Annahme gerechtfertigt, es handele sich hier um *Eucaryonten* (Abb. 9). Als außerdem Längs- und Querschnitte eines Polfadens erkennbar wurden, wurde deutlich, daß es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um sehr kleine Sporen einer Mikrosporidienart handelte, die auch von einer typischen Sporenwand bzw. Hülle umgeben sind. Nach der Darstellung der Sporen wurden auch erste Erkenntnisse über die Entwicklung der Parasiten

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

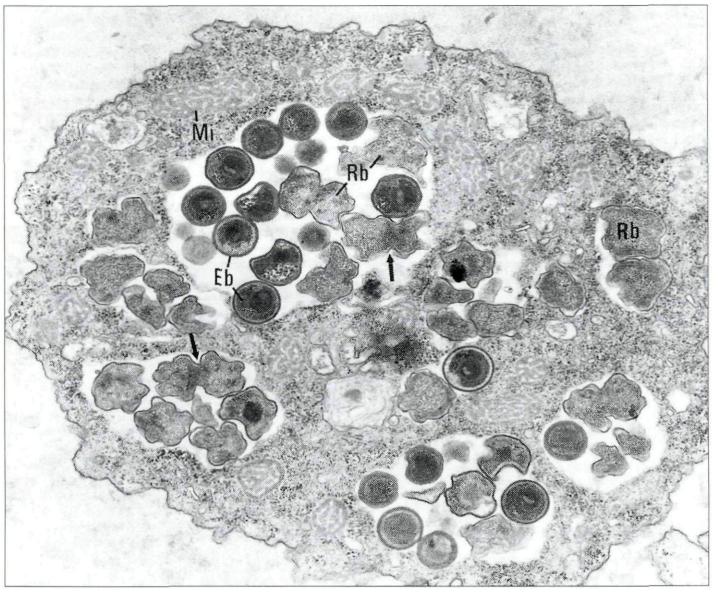

Abbildung 5:

Acanthamoeba sp. (Gr.II) (St. Bn9) von der Nasenschleimhaut einer Probandin weist eine intrazelluläre Infektion mit grampositiven kokkoiden und gramnegativen pleomorphen Organismen auf, die in Anlehnung an die Chlamydiennomenklatur als „elementary bodies" (Rb) bzw. „reticulate bodies" (Rb) bezeichnet werden. Pfeile: Teilungsstadien der retikulären Organismen.
11 650x

innerhalb der Trophozoiten dieser *Vannella*-Art gewonnen. Sie beginnt im Zellkern mit der Entwicklung des Sporoblasten, der durch starkes Größenwachstum die Kernmembran sprengt und schließlich fast das gesamte Zellinnere der Trophozoiten erfüllt. Nach Differenzierung in die o. g. Sporen und Absterben der Wirtszelle gelangen die infektiösen Sporen in die Umwelt und können erneut bisher nicht befallene *Vannella*-Trophozoiten infizieren. Die Art der Aufnahme, der Weg in den Zellkern und Einzelheiten der Sporendifferenzierung werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Nach bisherigen Kokultivierungsversuchen der Sporen mit verschiedenen Amöbenarten zeichnet sich eine Gattungsspezifität dieser intranukleären Mikrosporidien ab. Es ist auch nicht bekannt, ob sie eventuell zur Infektion von Invertebraten oder Fischen u. a. führen können.

Ein Vergleich mit den beim Menschen vorkommenden Mikrosporidienarten mittels PCR führte zu widersprüchlichen Ergebnissen, so daß augenblicklich eine phylogenetische Zuordnung zu bekannten Mikrosporidienarten molekularbiologisch nicht eindeutig bestätigt werden kann.

Als weiteres Beispiel eines eukaryotischen Endoparasiten von Amöben konnte erst kürzlich an Thekamoeben beobachtet werden. 30-80 µm große Trophozoiten von *T. similis*, die aus einer Regenrinne angezüchtet worden waren, wiesen eine intrazelluläre Infektion mit zahlreichen großen hefeartigen Zellen auf. Sie füllten nach starker Vermehrung durch Sprossung schließlich — von einer Vakuolenmembran umgeben — den gesamten Zellinnenraum aus (Abb. 10), so daß der Zellkern und die pulsierende Vakuole in den marginalen Plasmasaum gedrängt wurden — bevor die Parasiten durch Ruptur der Wirtszelle in die Umgebung gelangen. Ein Wachstum auf dem speziellen Nährboden für Hefen und Pilze nach SABAUROD wurde nicht beobachtet. K.-D. MÜLLER/ GHS Essen gelang jedoch eine Anzüchtung mit äußerst langsamer Vermehrung auf Blutagar (pers. Mitt.)

Im Unterschied zu sämtlichen bisher beobachteten intravakuolären Endozytobionten wurden im vorliegenden Fall weitere Organismenarten in der gleichen parasitophoren Vakuole mit eingeschlossen. Lebende und z. T. halbverdaute Bakterien befanden sich zusammen mit den hefeartigen Parasiten innerhalb derselben Vakuole. Möglicherweise handelt es sich demnach nicht primär um echten Parasitismus sondern um einen Saprophyten mit erworbener Resistenz gegen die Verdauungsenzyme der Wirtszelle, der durch ungehemmte Massenvermehrung zum Zerfall der Amöbe führt und damit gewissermaßen „ungewollt" zum Parasiten wird — ein Denkmodell als Übergangsform zum echten Parasitismus. Eine Übertragung auf weitere Vertreter der Familie *Thekamoebidae* u. a. Amöben gelang bisher nicht, so daß es sich möglicherweise um einen artspezifischen Endozytobionten handelt.

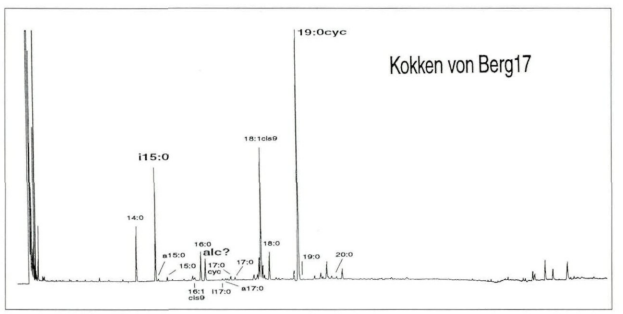

Abbildung 6:

Gaschromatische Untersuchung des Fettsäureprofils von Berg17. Typisch sind die bakterienspezifischen längerkettigen Fettsäuren, 13-Methyltetradekansäure (i15:0) und Methylenoktadekansäure (19:0,cyc) sowie ein fraglicher Alkohol (Alc?). Durchführung und Darstellung: Dr. K.-D. Müller / Mikrobiol. Institut, GHS Essen.

Diskussion

Abgesehen von den theoretisch natürlich interessanten Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Parasit an sich, steht bei Beobachtungen dieser Art die Frage im Vordergrund, ob sich möglicherweise auch potentiell pathogene Arten in den Amöben vermehren. Wie wir gesehen haben, gehören neben einigen *Legionella*-Arten auch solche der Gattungen Pseudomonas und Stenotrophomonas *(Xanthomonas)* sowie Flavobakterien und Listerien zu den potentiell Pathogenen. Die neue vorläufige Gattung *„Parachlamydia"* und die *Ehrlichia*-ähnlichen Organismen lassen zumindest eine Verwandtschaft zu pathogenen Taxa erkennen. Eine dritte Gruppe, wie *Cytophaga*-Arten, Mikrosporidien u. a. haben bisher keinerlei medizinische Bedeutung erkennen lassen.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

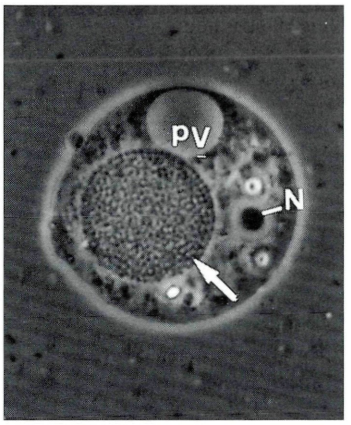

Abbildung 7:

Abgerundete *Saccamoeba limax* (Strain Sl1) mit einer großen Vakuole, die zahlreiche kokkoide dichtgelagerte Parasiten enthält (Pfeil). Kern (N) und pulsierende Vakuole (pV) sowie Kristalle sind im randständigen Cytoplasma erkennbar
Phasenkontrast:10 200x

Die Wirtsamöben haben für die potentiell pathogenen Arten ihre Hauptbedeutung als Vehikel für eine Verbreitung, was bei Legionellen deutlich wird, die sich nicht in nährstoffarmen Gewässern ohne Amöben oder den ebenfalls als Wirtszelle geeigneten Ciliaten *Tetrahymena sp.* vermehren können. Zumindest ist die Anwesenheit spezieller Begleitkeime, wie z. B. Zyanobakterien, erforderlich. Anspruchslosere Arten wie Pseudomonaden jedoch sind in Ihrer Vermehrung nicht im gleichen Maße von Amöben abhängig. Für sämtliche Keime in dieser intrazellulären Nische gilt jedoch in gleicher Weise wie für Legionella-Arten der zweite Gesichtspunkt: der Schutz vor den üblichen Chlor-Konzentrationen und anderen Bioziden — besonders, wenn die Bakterien auch in Zysten eingeschlossen werden. So erwiesen sich Akanthamoeben-Zysten resistent gegen 40 mg bzw. 50-75 mg/l Chlor (8, 15). KILVINGTON (15) gelang die Anzüchtung von *L. pneumophila* aus Zysten, die mit 50 mg/l Chlor mindestens eine halbe Stunde lang behandelt worden waren. Daß sich darüber hinaus der Phänotyp bei intrazellulärer Vermehrung ändern kann, zeigen Untersuchungen von BARKER (5, 6) an Legionellen. So waren Keime aus Amöben um den Faktor 100 resistenter gegen die Biozide PHMB und Benz-Isothiazolon als der gleiche parallel gezüchtete in-vitro-Stamm. Außerdem war die Infektiösität von den in Amöben vermehrten Legionellen für Epithelzellen um den Faktor 100 und für Makrophagen um das 10fache gegenüber dem gleichen in-vitro-Stamm erhöht (7), was eine eindeutige Pathogenitätssteigerung als Folge der Vermehrung in den Einzellern darstellt!

Derartige und zahlreiche weitere Fragestellungen zur Wechselbeziehung zwischen Wirt und seinen unterschiedlichen Parasiten können in Zukunft an den vorgestellten Modellen bearbeitet werden — wobei jedes Amöben-Parasit-Modell seine spezifischen Charakteristika aufweist und daher gesondert beurteilt und weiter untersucht werden müßte.

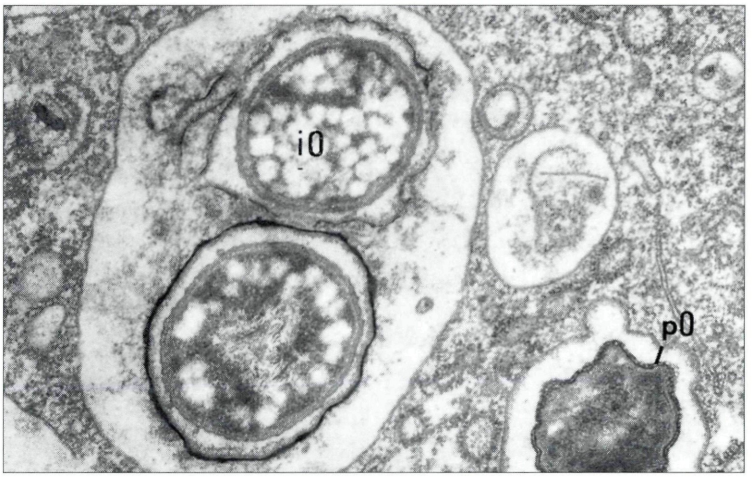

Abbildung 8:

Ausschnitt aus einem Zytoplasmaareal von *Saccamoeba limax* mit den beiden Stadien der Parasiten (KSl1): pleomorphe Vermehrungsstadien (po) entwickeln sich in die rundovalen infektiösen Organismen (io), die innerhalb einer Vakuole von weiteren Membranen (Pfeilköpfe) unbekannter Herkunft umgeben sind.
50 850x

Zusammenfassung

Die ersten Akanthamoeben mit intrazellulärer Vermehrung von gramnegativen Stäbchenbakterien wurden in unserem Labor aus dem Bewegungsbad einer Physiotherapieabteilung isoliert. Es handelte sich nicht — wie zunächst angenommen — um *Legionella pneumophila*, sondern um *Burgholderia pickettii*. In der Folgezeit wurden vor allem *Pseudomonas*-Spezies, aber auch wiederholt gramnegative z. T. schwer anzüchtbare Bakterienarten des *Cytophaga-Flavobacterium*-Komplexes als natürliche Infektionen von Akanthamoeben aus unterschiedlichen aquatischen Habitaten isoliert. Die meisten Arten vermehrten sich intravakuolär, einige jedoch — wie unser Stamm K62 auch intrazytoplasmatisch, wie die „Llap's" (*Legionella* like amoebal pathogens [28]). Neben den mehr oder weniger amöbiziden Bakterien wurde auch ein Endosymbiont nachgewiesen und dargestellt. Einer Artbestimmung durch Routinemethoden entzogen sich drei Amöbenisolate mit unterschiedlichen kokkoiden Parasiten, die den Gattungen *Acanthamoeba, Saccamoeba* und *Vannella* angehörten. Molekularbiologische Untersuchungen der „grampositiven Kokken" aus Akanthamoeben von der Nasenschleimhaut ergaben eine deutliche Verwandtschaft mit Chlamydien (1). Parasiten aus Sakkamoeben ließen aufgrund morphologischer und serologischer Befunde eine Beziehung zur Gattung *Ehrlichia* erkennen. Schließlich erwiesen sich Parasiten mit intranukleärer Entwicklung in Vannellen als Eukaryonten. Die Feinstruktur führt zur Annahme einer Zugehörigkeit zu den *Microsporidia* (13). Kürzlich wurden außerdem bisher nur auf Blutagar kultivierbare einzellige Pilze als intrazelluläre Parasiten von *Thekamoeba similis* beobachtet, die nach der Art der Sprossung zu den Hefepilzen zu rechnen sind.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

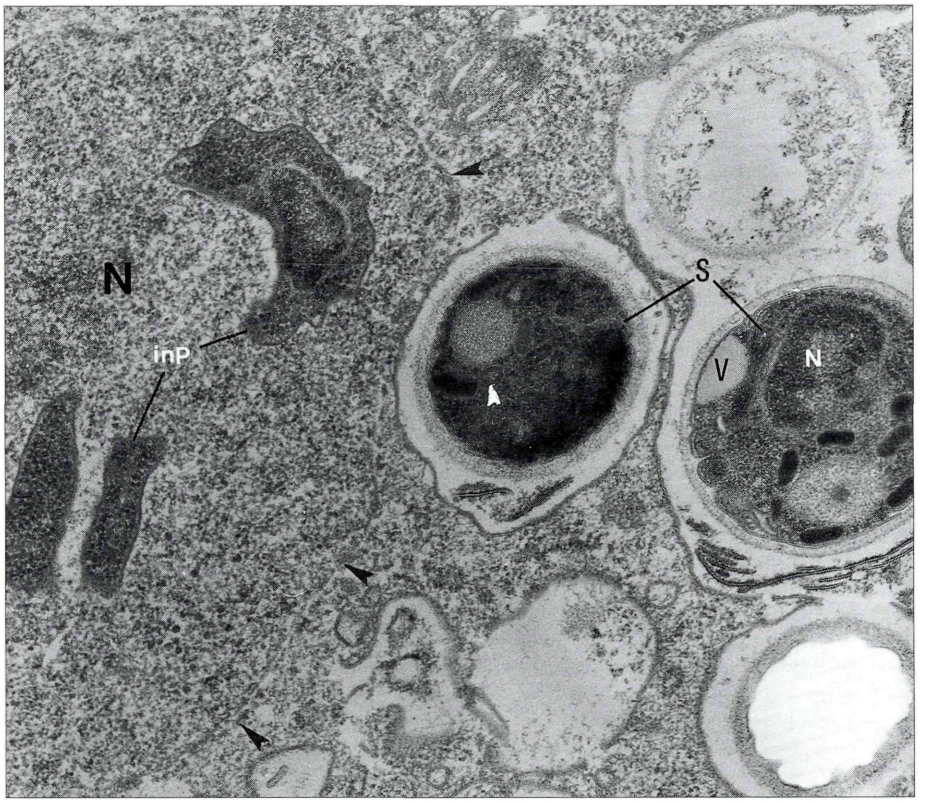

Abbildung 9:

Ausschnitt von *Vannella miroides* (Stamm Wi9) mit 2 Entwicklungsstadien intrazellulärer eukaryotischer Parasiten: S - Sporen mit Kern (N) und Vakuole (V) und einzelnen Querschnitten eines Polfadens (Pfeilkopf) als infektiöse Stadien nach ihrem Freiwerden durch Ruptur der Wirtszelle. inP - intrazelluläre Parasiten, die sich im Karyoplasma zu Sporen differenzieren, die wiederum nach Ruptur der Kernmembran (Pfeilköpfe) in das Zytoplasma gelangen können.
29 150x
Aufnahme: E. N. Schmid / Essen

Schlüsselwörter

Burgholderia, Pseudomonas, Endocytobiont, Acanthamoeba, Chlamydia, Mikrosporidia.

Summary

Free living amoebae serving as hosts and as vehicles of microorganisms

The first *Acanthamoebae* infected with Gram negative rod-shaped bacteria were isolated in our laboratory from a physiotherapeutic bath. The very motile rods multiplied within a phagosome of infected trophozoites resulting in death of the amoebae. The parasites were identified as *Burgholderia (Pseudomonas) pickettii* known as a nosocomial bacterium. Later on we observed different Gram negative bacteria of the genera *Pseudomonas, Cytophaga* and *Flavobacterium* as intracellular parasites of *Acanthamoebae.* In addition a strain of „Llap" (Legionella like amoebal pathogen [29]) exhibited intracytoplasmatic growth.

Coccoid bacteria inside *Acanthamoebae* isolated from human nasal mucosa turned out to be closely related to *Chlamydia sp.* as a result of DNA sequencing of the 16SrRNA (1). Within *Saccamoeba limax* multiplication of *Ehrlichia-like* parasitic endocytobionts was demonstrated by electronmicroscopy. Furthermore coccoid organisms within *Vannella sp.* from warm tap water were identified as spores of the order *Microsporidia.* The relatively large amoeba *Thekamoeba similis* harboured ovoid eucaryotic cells replicating within large vacuoles by budding thus appearing as yeast-like endocytobiotic organisms of amoebae.

Key words

Acanthamoeba, Endocytobiont, *Pseudomonas, Burgholderia,Chlamydia, Microsporidia.*

Hinweis

Seit dem vorliegendem Vortrag haben DNA-Sequenzierungen an 10 sog. Llap-Stämmen ergeben, daß die Gattungen *„Sarcobium"* und *„Legionella"* nicht voneinander zu trennen sind (Birtles, R. J. et al.: Microbiology 142, 3525-30 (1996). Die Identität beider Gattungen wurde auch durch entsprechende Hybridisierungversuche an dem hier dargestellten Llap-Stamm K62 bestätigt (Michel et al.: Parasitology Research, 1997, im Druck). Acht der von Birtles et al. untersuchten Stämme wurden als neue Art *Legionella lytica* beschrieben.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

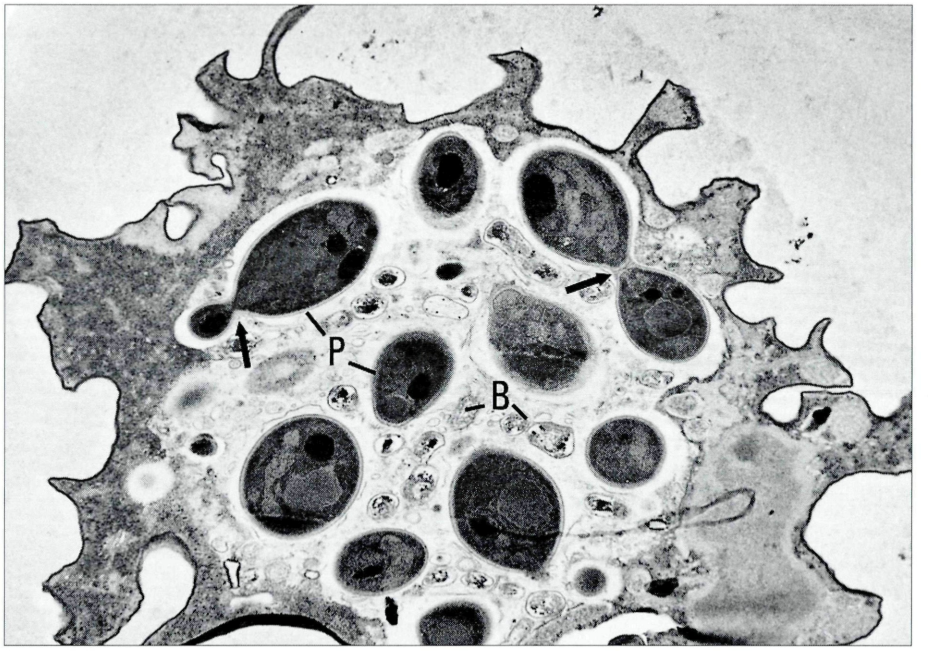

Abbildung 10:

Thekamoeba similis mit weitlumiger Vakuole, in der Ansschnitte von Pilzen (P) zu erkennen sind. Knospungsstadien mit Querwandbildung (Pfeile) belegen die Verwandtschaft zu Hefen.
Neben den Parasiten befinden sich in der Vakuole noch intakte und angedaute Bakterien (B).
8050x

Literatur

1. AMANN, R. et al. (1997):
Obligate intracellular bacterial parasites of Acanthamoebae related to Chlamydia spp.
Appl. Environm. Microbiol. 63, 115-121.

2. ANAND, M., SKINNER, A. R., MALIC, A., KURTZ, J. B. (1983):
Interaction of L. pneumophila and a free living amoeba (Acanthamoeba palestinensis).
J. Hyg. (Camb) 91, 167-178.

3. ANDERSON, B. E., DAWSON, J. E., JONES, D. C., WILSON, K. H. (1991):
Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis.
J. Clin. Microbiol. 29, 2838-2842.

4. BARBAREE, J. M., FIELDS, B. S., FREELEY, J. C., GORMAN, G. W., MARTIN, W. T. (1986):
Isolation of protozoa from water associated with a Legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of Legionella pneumophila.
Appl. Environm. Microbiol. 422-424.

5. BARKER, J. et al. (1992):
Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: Physiological status and susceptibility to chemical inactivation.
Appl. Environm. Microbiol. 58, 2420-2425.

6. BARKER, J., LAMBERT, P. A., BROWN, M. R. W. (1993):
Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of Legionella pneumophila.
Infection and Immunity, 61, 3503-3510.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

7. CIRILLO, J. D., FALKOW, S., TOMPKINS, L. S. (1994):
Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion.
Infection and Immunity, 62, 3254-3261.

8. DE JONCKHEERE, J., VAN DE VOORDE, H. (1976):
Differences in destruction of cysts of pathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine.
Appl. Env. Microbiol. 31, 294-297.

9. DROZANSKI, W. (1956):
Fatal bacterial infection in soil amoebae.
Acta Microbiol. Pol. 5, 315-317.

10. FIELDS, B. (1993):
Legionella and Protozoa: Interaction of a pathogen and its natural host.
In: Legionella Current Status and Emerging Perspectives. Editors: J.M. Barbaree, R.F. Breiman, A.P. Dufour, ASM American Society for Microbiology Washington, D.C.

11. HARF, C., MONTEIL, H. (1988):
Interactions between free-living amoebae and legionella in the environment
Wat. Sci. Technol. 20, 235-239.

12. HAURÖDER-PHILIPPCZYK, B., MICHEL, R. (1991):
Pseudomonas pickettii as intracellular parasite in Acanthamoebae. Bioforum, 34.

13. HOFFMANN, R. SCHMID, E. N., MÜLLER, K.-D., MICHEL, R. (1996):
An eucaryotic parasite with intranuclear growth within free-living amoebae of the genus Vannella.
17. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, München.

14. HOLDEN, E. et al. (1984):
Intracellular Growth of Legionella pneumophila within Acanthamoeba castellanii Neff.
Infection and Immunity 45, 18-24.

15. KILVINGTON, S., PRICE, J. (1990):
Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure.
Journal of Applied Bacteriology 68, 519-525.

16. MICHEL, R., HAURÖDER-PHILIPPCZYK, B., MÜLLER, K.-D., WEISHAAR, I. (1992):
Observations on acanthamoebae from nasal mucosa infected by obligate intracellular parasites.
Zbl. Bakt. Hyg. Abstracts 56, 325.

17. MICHEL, R., HAURÖDER-PHILIPPCZYK, B., MÜLLER, K.-D., WEISHAAR, I. (1994):
Acanthamoeba from human nasal mucosa Infected with an obligate intracellular parasite.
Europ. J. Protistol. 30, 104-110.

18. MICHEL, R., HAURÖDER, B. (1997):
Isolation of an Acanthamoeba strain with Intracellular Burkholderia pickettii Infection.
Zbl. Bakt. 285, 541-557.

19. MICHEL, R., MÜLLER, K.-D., SCHMID, E. N. (1995):
Ehrlichia-like organisms (KSL1) observed as obligate intracellular parasites of Saccamoeba species.
Endocytobiosis Cell Res. 11, 69-80.

20. MICHEL, R., HOFFMANN, R., GIESE, A. und MÜLLER, K.-D. (1995):
Untersuchung von drei Grundwasserwerken auf Vorkommen von Acanthamoeben, Naeglerien und anderen freilebenden Amöben.
Acta hydrochim. hydrobiol. 23, 5, 202-211.

21. MICHEL, R., BURGHARDT, H., BERGMANN, H. (1995):
Natürliche intrazelluläre Infektionen bei Acanthamoeben mit Pseudomonas aeruginosa nach ihrer Isolierung aus einer mikrobiologisch beanstandeten Trinkwasser-Hausinstallation eines Krankenhauses.
Zbl. Hyg. 196, 532-544.

22. MÜLLER, K.-D., MICHEL, R., SCHMID, E. N., WEISHAAR, I. (1993):
Grampositive Kokken als obligat intrazelluläre Parasiten in Acanthamoeben, Abstr.
45. Tagung der DGHM, Karlsruhe.

23. MORAIS, J. D. et al. (1991):
First european case of Ehrlichosis.
Lancet 338, 633-634 (Letter).

24. NAHAPETIAN, K.et al. (1991):
The intracellular multiplication of Legionella pneumophila in protozoa from hospital plumbing systems.
Res. Microbiol. 142, 677-685.

25. NAEGLER, K. (1910):
Fakultativ parasitische Mikrococcen in Amöben.
Arch. Protistenkd. 19, 246-253.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

26. PAGE, F. C. (1974):
A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of new species and a key to genera.
Arch. Protistenkd. 116, 149-184.

27. ROWBOTHAM, T. J. (1980):
Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae.
J. Clin. Pathol. 33, 1179-1183.

28. ROWBOTHAM, T. J. (1993):
„Legionella-like amoebal pathogens"
In: „Legionella, Current status and emerging perspectives" 137-140.
American Society for Microbiology, Wahington D.C.

29. SCHMID, E. N., MICHEL, R., MÜLLER, K.-D., PICHER, O. (1993):
Cytophaga spec., a facultative intracellular bacterium in acanthamoebae isolated from a keratitis patient.
45. Tagung der DGHM in Karlsruhe.

30. SPRINGER, N., LUDWIG, W., DROZANSKI, W., AMANN, R., SCHLEIFER, K.H. (1992):
The phylogenetic status of Sarcobium lyticum, an obligate intracellular bacterial parasite of small amoebae.
FEMS Microbiology Letters 96, 199-202.

31. STEINERT, M., OTT, M., LÜCK, P. C., TANNICH, E., HACKER, J. (1994):
Studies on the uptake and intracellular replication of Legionella pneumophila in protozoa and in macrophage-like cells.
FEMS Microbiology Ecology 15, 299-308.

32. TYNDALL, R. L., DOMINGUE, E. L. (1982):
Cocultivation of Legionella pneumophila and Free-Living Amoebae.
Applied and Environmental Microbiology 44, No. 4, 954-959.

33. WADOWSKY, R. M. et al. (1991):
Multiplication of Legionella spp. in tap water containing Hartmannella vermiformis.
Appl. Environm. Microbiol. 57, 1950-1955.

Korrespondenzadresse Dr. Rolf Michel
Ernst-Rodenwaldt-Institut

Postfach 7340
D-56065 Koblenz · Bundesrepublik Deutschland

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

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: 1997

Band/Volume: 19

Autor(en)/Author(s): Michel Rolf

Artikel/Article: Freilebende Amöben als Wirte und Vehikel von Mikroorganismen. 11-20