

Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten von „Limax-Amöben“ (*Acanthamoeba* und *Hartmannella*) auf Kulturen verschiedener gramnegativer Bakterienspezies

Julia Walochnik, O. Picher, Ch. Aspöck, Marianne Ullmann, H. Aspöck

Einleitung Die „Limax-Amöben“ – eine heterogene Gruppe freilebender, fakultativ parasitischer Amöben – sind weltweit verbreitet und besiedeln vor allem natürliche ebenso wie künstliche Feuchthabitate; es wurden aber auch bereits verschiedene Spezies aus der Luft (16) oder sogar heißem Wüstensand (12) isoliert. Seit der Beschreibung der Fähigkeit einer freilebenden Amöbe (*A. culbertsoni*), bei Mäusen und Affen Meningoenzephalitis zu verursachen (3), gilt diesen ubiquitären Protozoen auch das Interesse der Humanmedizin.

Die humanmedizinisch wichtigsten Genera sind *Naegleria* und *Acanthamoeba*; sie umfassen Erreger von akut bzw. chronisch verlaufenden Meningoenzephalitiden. *Acanthamoeba*-Spezies gelten zudem, insbesondere bei Kontaktlinsenträgern (14), als Verursacher von oft schwer verlaufenden Keratitiden. Neben dieser aktiven Pathogenität der Limax-Amöben gewinnt die sogenannte „passive Pathogenität“ dieser Organismen zunehmend an Bedeutung; man versteht darunter die Fähigkeit der Limax-Amöben, als Wirte für Bakterien – und zwar auch humanpathogene Spezies – zu fungieren. Die Bakterien können intrazellulär überleben und sich sogar vermehren; die Limax-Amöben fungieren damit als Vehikel für die Verbreitung dieser Bakterien.

Als Kriterium für die Pathogenität der Limax-Amöben gilt herkömmlicherweise der Mäuseinokulationstest: auf Mäuse übertragene Stämme, die zu einer Erkrankung der Maus führen, gelten auch als humanpathogen. Dieses Kriterium gilt indessen mit Einschränkungen: von Keratitis-Patienten isolierte Amöben führen nach intraokulärer Inokulation bei Mäusen nicht notwendigerweise zu Erkrankungen des Auges bei der Maus (2).

Alternative Wege zur Abklärung der Pathogenität freilebender Amöben sind daher von großer Bedeutung. So wurden die Vermehrungsfähigkeit in bestimmten axenischen Medien (5) oder die zytopathische Wirkung auf Zellkulturen (4) als Indikatoren für Pathogenität herangezogen. Weiters gelten Thermophilie (8, 14, 18) und Fortbewegungsverhalten (Beweglichkeit in einem Unteragarosystem (17) als Hinweise auf eine potentielle Pathogenität freilebender Amöben.

Die vorliegende Arbeit, die einen Teil einer umfangreichen Untersuchung über Vorkommen und medizinische Bedeutung von Limax-Amöben in einem Wiener Großkrankenhaus darstellt, ist zwei Fragestellungen gewidmet: Zum einen sollte das Fortbewegungsverhalten der Amöben unter dem

Gesichtspunkt der Ableitung von Hinweisen auf eine mögliche aktive Pathogenität, zum zweiten sollte die Frage der passiven Pathogenität, insbesondere unter krankenhaushygienischen Aspekten, untersucht werden. Beispielsweise konnten FIELDS et al. (1993) in einer Studie an Legionellen zeigen, daß sich virulente Legionellen in viel höherem Maße aus *Hartmannella* rückisolieren lassen als avirulente.

Material und Methoden

Amöben

Es wurden drei, aus Sanitäreinrichtungen des Wiener Allgemeinen Krankenhauses (AKH) isolierte Amöbenstämme, welche nach dem Bestimmungsschlüssel von PAGE (1991) aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale den Spezies *Acanthamoeba lugdunensis*, *Acanthamoeba rhysodes* und *Hartmannella cantabrigiensis* zugeordnet worden waren, für die Untersuchungen herangezogen. Durch diese Auswahl sollten genus- bzw. spezies-spezifische Charakteristika im Freß- und Fortbewungsverhalten eruiert werden.

Die Amöben wurden auf NonNutritiv (NN)-Agarplatten, welche zuvor mit 100 µl *E. coli*-Bouillonkultur überschichtet worden waren, bei 30°C kultiviert. Die Umsetzung erfolgte alle 7 d, indem ein kleines Agarstückchen mit einer sterilen Skalpellklinge herausgeschnitten und auf eine frische, mit *E. coli* beschichtete NN-Agarplatte transferiert wurde.

Axenisierung

Aus klonierten Agarplattenkulturen wurde jeweils ein kleines Agarstückchen herausgeschnitten und auf eine NN-Agarplatte übersetzt, welche zuvor mit einer Suspension abgetöteter Bakterien (*E. coli*) in Amöbensaline (modifizierte Neff's Amöbensalzlösung nach PAGE (1991) beschichtet worden war. Diese Amöben-Kulturen wurden, um möglichst alle mitüberimpften (auf dem Agarstückchen befindlichen) noch lebenden Bakterien zu eliminieren, über einen Zeitraum von 10 d alle 48 h neu umgesetzt. Anschließend wurden die Amöben-Trophoziten von einer solchen Kultur mit einem sterilen Wattetupfer geerntet, in mit 5 ml steriler (autoklavierter) Amöbensaline befüllte Zentrifugationsröhrchen (15 ml Falcon Conical Tubes) transferiert und dreimal durch Zentrifugation (500g/10 min) in Amöbensaline gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zysten schließlich in 5 ml PPG (Proteose-Pepton/Glukose) resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden wiederum abgetötete Bakterien und zusätzlich Antibiotika (200 IU Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin) zugesetzt. Die Kulturröhrchen wurden unter einem Winkel von 45° bei 30°C inkubiert und das Medium über einen Zeitraum von 10 d alle 24 h gewechselt, wobei die Menge an zuzugebenden Antibiotika und abgetöteten Bakterien ab dem fünften Tag sukzessive minimiert wurde. Der letzte Mediumwechsel erfolgte ohne Zugabe von Antibiotika oder abgetöteten Bakterien. Die Kulturen wurden unmittelbar nach ihrer Axenisierung in den jeweiligen Versuchen eingesetzt.

Zur Erhaltung der axenischen Kulturen wurde das Medium (PPG) fortwährend alle 72 h gewechselt und die Überstände regelmäßig in BHI (Brain-Heart-Infusion) und auf Blutagarplatten auf Bakterienfreiheit überprüft.

Zystensuspensionen

Axenisch kultivierte Amöbenzysten wurden durch Zentrifugieren bei 500 g/10 min. und Absaugen des Überstandes geerntet und in 5 ml steriler Amöbensaline suspendiert. Die Suspensionen wurden unter Verwendung einer Bürker-Türk Zählkammer auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen pro ml eingestellt.

Bakterien

Als potentielle Nahrungsorganismen dienten 16 verschiedene, aus Patientenmaterial des Wiener AKH isolierte, gramnegative Bakterienstämme. Die Bakterien wurden auf Columbia-Blutagarplatten bei 37°C kultiviert. Die Agarplattenkulturen wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und alle 14 d neu überimpft.

Von allen Bakterienspezies wurden Bouillonkulturen in Nährbouillon und Suspensionen in steriler 0,9%iger Saline hergestellt. Die Suspensionen wurden durch Vergleich mit einem McFarland 0,5 BaSo₄ Standard auf ungefähr 10^8 CFU (colony forming units) pro ml gebracht.

Tabelle 1:

Fortbewegungsgeschwindigkeiten (Mittelwerte) von *A. lugdunensis*, *A. rhyodes* und *H. cantabrigiensis* auf verschiedenen gramnegativen Bakterienspezies (in mm/d).

Bakterienspezies	<i>A. lugdunensis</i>		<i>A. rhyodes</i>		<i>H. cantabrigiensis</i>	
	30°C	30°C	37°C	30°C	37°C	
<i>Escherichia coli</i>	5,9	9,2	9,0	4,6	11,4	
<i>Pantoea agglomerans</i>	5,1	9,8	9,3	4,7	9,6	
<i>Enterobacter cloacae</i>	4,8	9,5	8,3	5,3	9,6	
<i>Citrobacter freundii</i>	4,3	11,2	7,5	3,0	9,9	
<i>Serratia marcescens</i>	4,1	8,9	7,8	5,2	9,6	
<i>Serratia liquefaciens</i>	3,9	8,4	7,6	5,3	8,1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,9	10,6	8,4	4,3	8,0	
<i>Morganella morganii</i>	3,8	9,4	7,0	5,1	4,4	
<i>Burkholderia cepacia</i>	3,1	8,6	7,2	3,4	3,8	
<i>Providencia stuartii</i>	1,5	7,6	6,6	3,1	5,9	
<i>Comamonas acidovorans</i>	2,4	7,6	4,3	2,3	6,3	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,2	8,6	6,1	3,4	4,7	
<i>Proteus mirabilis</i>	1,4	8,4	3,9	3,1	5,8	
<i>Proteus vulgaris</i>	1,1	5,3	4,4	3,6	5,1	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,7	5,3	3,3	2,2	2,5	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,6	6,9	4,1	1,6	5,8	

Tabelle 2:

Überleben verschiedener Bakterienspezies in 3% iger HCl durch Interaktion mit *A. lugdunensis*, *A. rhyodes* und *H. cantabrigiensis* bei 30°C bzw. 37°C.

Bakterienspezies	<i>A. lugdunensis</i>		<i>A. rhyodes</i>		<i>H. cantabrigiensis</i>	
	30°C	30°C	37°C	30°C	37°C	
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	-	-	
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	-	+	

Alle Versuche wurden im Viereransatz durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden die Geschwindigkeiten [mm/d] und deren Mittelwerte errechnet.

Versuch II:

Überleben von *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* in 3%iger HCl durch Interaktion mit Amöben der Genera *Acanthamoeba* und *Hartmannella*.

Auf NN-Agarplatten wurden 100 µl der jeweiligen Bakterien-Bouillonkultur ausgestrichen und im Zentrum jeder Petrischale 1 µl Amöbensuspension der zu untersuchenden Spezies aufgebracht. Diese sogenannten Kokulturen von Amöben und Bakterien wurden 7 d bei 30°C bzw. 37°C bebrütet. Die reifen Amöbenzysten wurden anschließend mit einem sterilen Wattetupfer geerntet und in 5 ml sterile (autoklavierte) Amöbensaline transferiert. Nach dreimaligem Waschen durch Zentrifugation bei 1000 g/20 min. wurde das Pellet in 3%iger Salzsäure suspendiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Kontrollversuch hatte gezeigt, daß keine der für die Untersuchungen herangezogenen Bakterienspezies befähigt ist, 36 h in 3%iger HCl zu überleben. Die Säure wurde nach 36 h durch dreimaliges Waschen in steriler Amöbensaline entfernt und die Zysten in Amöbensaline resuspendiert. Um die Exzystierung der Amöben hervorzurufen, wurden durch Hitze abgetötete Bakterien (*E. coli*) hinzugefügt und die Kulturen bei 30°C inkubiert.

Alle Überstände wurden in BHI und auf Blutagarplatten auf ihre Sterilität hin überprüft.

Versuch I:

Fortbewegungsverhalten der Amöben auf Kulturen 16 verschiedener, gramnegativer Bakterienspezies (Methodik modifiziert nach 11).

Mit einer Impföse wurden auf NN-Agarplatten 50 mm lange, parallele Bakteriensuspensionslinien aufgetragen und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließen wurde an den Beginn jeder Linie 1 µl Amöbensuspension, also ungefähr 100 Zysten inokuliert. Die mit Parafilm versiegelten Platten wurden bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Die Wachstumsraten und Fortbewegungsgeschwindigkeiten der Amöben (von der „Amöbenfront“ pro Tag zurückgelegte Distanz) entlang dieser Linien wurden unter dem Invertmikroskop beobachtet und über einen Zeitraum von 10 d täglich protokolliert.

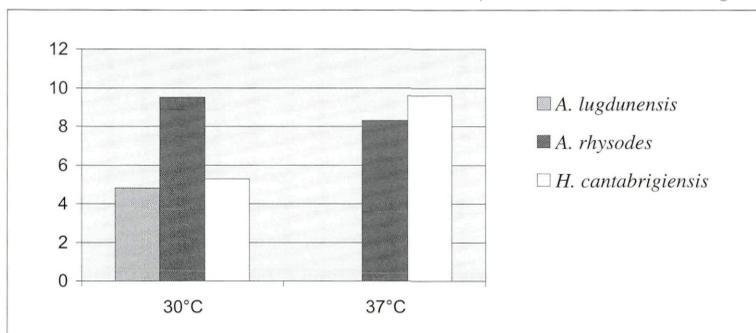


Abbildung 1:

Fortbewegungsgeschwindigkeit von *A. lugdunensis*, *A. rhyssodes* und *H. cantabrigiensis* auf *E. cloacae* bei 30°C bzw. 37°C in mm/d.

Ergebnisse

Versuch I

Alle untersuchten Bakterienarten führten, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, zur Exzystierung und Fortbewegung der Amöben entlang der Suspensionslinien – wurden also als Nahrungsorganismen akzeptiert. Die drei Amöbenisolate zeigten, unabhängig von der dargebotenen Bakterienart, ein charakteristisches, von der Kultivierungstemperatur abhängiges Wachstumsverhalten: *Hartmannella cantabrigiensis* wies auf allen Bakterienkulturen eine weitaus höhere Teilungsrate auf als die *Acanthamoeben* und ist außerdem eindeutig als thermophil einzustufen, da sie, wie aus Abbildung 1 am Beispiel von *E. cloacae* deutlich hervorgeht, bei 37°C mehr als die doppelte 30°C-Geschwindigkeit zeigte. *A. rhyssodes* wuchs zwar bei 37°C, hatte aber bei 30°C ihr Temperaturoptimum und kann daher nur als thermotolerant angesehen werden; *A. lugdunensis* zeigte bei 37°C kein Wachstum.

Noch wesentlich deutlicher als ein bestimmtes Wachstumsverhalten wiesen die Amöbenisolate ein jeweils charakteristisches Fortbewegungsverhalten auf. Gemeinsam war allen Isolaten, daß sich die Trophoziten grundsätzlich in einer Front entlang der Bakterien suspensionslinien fortbewegten. Zwischen den beiden untersuchten Amöbengenera *Acanthamoeba* und *Hartmannella* war ein Unterschied besonders auffallend: Während *Hartmannella* sich ausschließlich entlang der Agaroberfläche fortbewegte, zeigten beide *Acanthamoeben* auch die Fähigkeit, den Agar zu penetrieren. Die zwei *Acanthamoebenspezies* unterschieden sich einerseits in ihrer Thermotoleranz, andererseits in ihrer Fortbewegungsgeschwindigkeit. Die thermophilere *A. rhyssodes* bewegte sich auf allen Bakterienarten ungefähr doppelt so schnell wie *A. lugdunensis*, welche bei 37°C keinerlei Wachstum zeigte (siehe Abb. 1).

Versuch II

Wie Tabelle 2 zeigt, spielt die Temperatur bei den Interaktionen zwischen Amöben und Bakterien eine bedeutende Rolle. Wenn die Kokulturen der Amöben mit den Bakterien bei 30°C inkubiert worden waren, ließen sich nach der Säurebehandlung (36 h in 3% iger HCl) und der anschließend eingeleiteten Exzystierung der Amöben (durch Zugabe von abgetöteten Bakterien) im allgemeinen in den Kulturen keine lebenden Bakterien mehr nachweisen. Nach Kokultivierung bei 37°C hingegen konnten die Bakterien die Säurebehandlung in den Zysten der Amöben überleben. Allerdings scheinen sich die untersuchten Amöbenspezies nicht gleichermaßen als Wirtszellen für *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* zu eignen. Auch scheinen sich die drei Bakterienarten in ihrer Fähigkeit, in Amöbenzysten zu überleben, zu unterscheiden.

Acanthamoeba rhyssodes eignete sich in vorliegender Untersuchung sehr gut als Wirt; nach Kokultivierung bei 37°C ließen sich alle drei Bakterienarten aus den Zysten von *A. rhyssodes* rückisolieren. Nach Kokultivierung bei 30°C hingegen konnte nur *E. coli* in den Zysten von *A. rhyssodes* überleben. Aus *Hartmannella cantabrigiensis* ließ sich *Ps. aeruginosa* rückisolieren, allerdings auch

nur, wenn die Kokultur bei 37°C inkubiert worden war. Aus *Acanthamoeba lugdunensis* konnte keine der drei Bakterienspezies rückisoliert werden.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsansätze waren ident.

Diskussion

Aktive Patogenität

Die aktive Pathogenität der Amöben, d. h. die Fähigkeit, menschliches Gewebe zu penetrieren, wird vor allem mit drei Faktoren korreliert, nämlich der Motilität im Agar, der Fortbewegungsgeschwindigkeit (17) und der Thermophilie (8, 14, 18).

Im Fortbewegungsverhalten war allen drei Isolaten gemeinsam, daß sich die Trophoziten nicht einzeln, sondern als Amöbenfront entlang der Bakteriensuspensionslinien bewegten. Dieses Phänomen konnten auch schon THONG UND FERRANTE (1986) in einer ähnlichen, an *Naegleria* spp. durchgeführten Studie beobachten. Vermutlich ist dies darin begründet, daß die Amöben sich an einer Stelle, wo viele Nahrungsorganismen zur Verfügung stehen, explosiv vermehren und erst dann in andere Regionen auswandern, wenn Nährstoffknappheit herrscht. Dies verdeutlicht, daß bei freilebenden Amöben die Fortbewegung eng mit der Nahrungsaufnahme gekoppelt ist. Die Fähigkeit zur schnellen Fortbewegung wiederum, und zwar insbesondere bei Körpertemperatur des Wirts, erlaubt den Amöben die rasche Ausbreitung im Wirt und somit das Entstehen eines akuten Krankheitsgeschehens. Für die rasche Ausbreitung der durch Limax-Amöben hervorgerufenen Krankheiten ist große Beweglichkeit sehr wesentlich (1).

Acanthamoeba lugdunensis und *Acanthamoeba rhyodes*, welche beide als Keratitis-Erreger gelten, zeigten im Gegensatz zum Genus *Hartmannella*, welche nach PAGE (1991) keine pathogenen Vertreter enthält, außerdem die Fähigkeit, in den Agar einzudringen. Es könnte also auch bei *Acanthamoeba* tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Motilität im Agar und der Fähigkeit, menschliches Gewebe zu penetrieren, bestehen, wie dies schon bei *Naegleria* (17) beobachtet werden konnte.

Unter den zwei untersuchten *Acanthamoeba*-Isolaten zeigte die thermophilere auch die weit- aus höhere Fortbewegungsgeschwindigkeit.

Es ist durchaus möglich, daß dies als Ausdruck potentieller Pathogenität zu deuten ist.

Beweisen konnten wir das bei unseren Stämmen nicht, weil kein Tierversuch zur Feststellung der Pathogenität durchgeführt wurde. Im übrigen ist die Korrelation zwischen Thermophilie und Pathogenität durchaus nicht unumstritten (9).

Passive Pathogenität

Offenbar ist sowohl die Eignung der Amöben als Transportwirte für Bakterien, als auch die Fähigkeit der Bakterien, in Zysten freilebender Amöben zu überleben, sehr spezies-spezifisch.

Unter den untersuchten Amöbenisolaten erwies sich *Acanthamoeba rhyodes* als am besten geeignet, Bakterien als Wirtsorganismus zu dienen. Dies manifestierte sich auch darin, daß sich *A. rhyodes*, im Gegensatz zu den zwei anderen Spezies, nur sehr schwer in axenische Kultur hatte bringen lassen. 3%ige HCl wirkt sowohl auf Bakterien als auch auf Amöben-Trophoziten und unreife Amöbenzysten letal, nicht jedoch auf reife Amöbenzysten. In Amöbenzysten eingeschlossene Bakterien werden somit durch die sehr resistenten Zystenwänden der Einwirkung der Säure entzogen. Möglicherweise ist die Eignung von Amöben als Wirtsorganismus für Bakterien unter anderem durch die Fähigkeit, mit intrazellulär lebenden Bakterien reife Zysten zu bilden, charakterisiert. KILVINGTON UND PRICE (1990) konnten demonstrieren, daß mit *Legionella pneumophila* infizierte *Acanthamoeba polyphaga*-Trophoziten in wesentlich geringerem Maße Zysten ausbilden, als nicht infizierte Amöben.

In den Zysten von *Hartmannella cantabrigiensis* konnte bei 37°C Kokultivierungstemperatur zwar *Pseudomonas aeruginosa* überleben, nicht aber die anderen beiden Bakterienspezies. Es muß also demnach nicht nur von der Fähigkeit der Amöben, den Bakterien als Wirtsorganismus zu dienen, sondern auch von der Fähigkeit der Bakterien, die Amöben zu infizieren und in den Amöben

zu überleben, gesprochen werden. Jedenfalls scheint Phagozytose nicht der primäre Mechanismus zu sein, durch den Bakterien Amöben infizieren.

Sehr auffällig war außerdem der Einfluß der Kokultivierungstemperatur auf das Zustandekommen einer solchen Wechselbeziehung. Dies mag unter anderem auch damit zusammenhängen, daß humanpathogene Bakterienspezies bei 37°C wesentlich besseres Wachstum zeigen als bei 30°C. BARKER UND BROWN (1994) sehen die Temperatur als einen ganz wesentlichen Faktor für das Überleben von Bakterien in Wirtszellen, was sie auch darin begründen, daß die Virulenz von Bakterien vermutlich temperaturabhängig ist. MILLER et al. (1989) sehen Temperatur sogar als einen Hauptfaktor bei der Regulierung bakterieller Pathogenität.

Zusammenfassung

Anhand von drei, nach ihrem Temperaturverhalten ausgewählten Amöben-Isolaten (*Acanthamoeba lugdunensis*, *Acanthamoeba rhyssodes* und *Hartmannella cantabrigiensis*) und 16 verschiedenen, aus Patientenmaterial des Wiener AKH isolierten Bakterienstämmen, sollte untersucht werden, ob Motilität und Wachstumsverhalten freilebender Amöben mit deren pathogenem Potential korrelieren und welche Faktoren bei der Fähigkeit freilebender Amöben, Bakterien als Wirtsorganismus zu dienen, von Bedeutung sind.

Es zeigte sich, daß sich die drei verschiedenen Isolate in Temperaturtoleranz, Fortbewegungsgeschwindigkeit und Motilität im Agar, unabhängig von den dargebotenen Nahrungsorganismen, sehr deutlich voneinander unterscheiden und daß diese Faktoren möglicherweise Rückschlüsse auf eine potentielle Pathogenität der Amöben zulassen. *Acanthamoeba lugdunensis* und *Acanthamoeba rhyssodes*, welche beide als potentielle Pathogene angesehen werden (6), zeigten die Fähigkeit, in den Agar einzudringen. *Hartmannella cantabrigiensis* hingegen bewegte sich ausschließlich auf der Agaroberfläche fort. Tatsächlich scheint das Genus *Hartmannella* keine humanpathogenen Vertreter aufzuweisen (15). Außerdem erwies sich die Fortbewegungsgeschwindigkeit als ein sehr spezifisches Merkmal — *Acanthamoeba rhyssodes* bewegte sich, unabhängig von der dargebotenen Nahrungsbakterienspezies, stets etwa doppelt so schnell fort wie *Acanthamoeba lugdunensis*. Die Motilität der Amöben war zudem stets temperaturabhängig. *Hartmannella cantabrigiensis* zeigte sogar eine markante Temperaturabhängigkeit: auf allen Bakterienstämmen bewegte sie sich bei 37°C mit nahezu der doppelten Geschwindigkeit als bei 30°C.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Annahme, daß sich ein erheblicher Anteil der freilebenden Amöben — in dieser Studie zwei von drei untersuchten Isolaten, nämlich *Acanthamoeba rhyssodes* und *Hartmannella cantabrigiensis* — als Transportwirte für Bakterien eignet und daß die Fähigkeit, Bakterien als Wirt zu dienen, mit der Temperaturtoleranz korreliert. Grundsätzlich ließen sich nach 37°C Kokultivierungstemperatur wesentlich mehr Bakterien aus den Amöbenzysten rückisolieren als nach 30°C Kokultivierungstemperatur. Dies ist vermutlich nicht zuletzt darin begründet, daß humanpathogene Bakterien 37°C als Wachstumstemperatur bevorzugen. *Acanthamoeba lugdunensis* eignete sich in keinem Fall als Wirtsorganismus für Bakterien, was auch damit in Zusammenhang stehen mag, daß dieses Isolat bei 37°C kein Wachstum zeigte.

Schlüsselwörter

Limax-Amöben, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, passive Pathogenität.

Summary

Comparative studies on the behaviour of Limax-amoebae (Acanthamoeba and Hartmannella) on cultures of 16 different Gram-negative bacteria.

Basing upon three different species of free-living amoebae (*Acanthamoeba lugdunensis*, *Acanthamoeba rhyssodes* and *Hartmannella cantabrigiensis*) and 16 different Gram-negative species of bacteria isolated from clinical specimens it was investigated, whether motility and growth rate of free-living amoebae do correlate to their potential pathogenicity and which factors might contribute to the capability of free-living amoebae to harbour bacteria inside their cysts.

In this study the three different isolates did significantly vary in their temperature tolerance, migration rate and their motility inside the agar, which supports the assumption that these factors might be important as indicators for the pathogenicity of free-living amoebae. *Acanthamoeba lugdunensis* and *Acanthamoeba rhyssodes*, which both are regarded as potential pathogens (6), showed the ability to penetrate the agar. *Hartmannella cantabrigiensis*, belonging to the apparently non-pathogenic genus *Hartmannella* (15), did not invade the agar, but only moved on the agar-surface. Also the migration rate of each amoeba was very specific; *Acanthamoeba rhyssodes* moved two times as fast as *Acanthamoeba lugdunensis* regardless of the offered food-organism (bacterial species). Moreover, the migration rate was apparently always determined by the cultivation temperature – from all bacteria offered *Hartmannella cantabrigiensis* showed approximately the double migration rate at 37°C compared to its migration rate at 30°C.

The results of this study support the assumption that a majority of the free-living amoebae - in this study two of three examined isolates, namely *Acanthamoeba rhyssodes* and *Hartmannella cantabrigiensis* – is capable of harbouring bacterial human pathogens and that the host potential seems to correlate to the temperature tolerance. Generally at 37°C cocultivation temperature considerably more bacteria could be reisolated from the cysts of the amoebae than at 30°C. This observation might be explained by the fact that bacterial human-pathogens prefer 37°C as growth temperature. The *Acanthamoeba lugdunensis* isolate, which did not show any growth at 37°C was not at all accepted as a host.

Key words Limax-amoebae, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, passive pathogenicity.

Literatur

1. ASPÖCK, H. (1994): Protozoen als Erreger von Krankheiten des Menschen: Übersicht und aktuelle Probleme in Mitteleuropa. In: Die Urtiere. Eine verborgene Welt. Katalog OÖ. Landesmuseum, N. F. 219-266. Linz.
2. BADENOCH, P. R., A. M. JOHNSON, P. E. CHRISTY, D. J. COSTER (1990): Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a *Corynebacterium* in the rat cornea. Arch. Ophthalmol. 108, 107-112.
3. CULBERTSON, C. G., J. W. SMITH & J. R. MINNER (1958): *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. Science 127, 1506.
4. CURSONS, R. T. M. & T. J. BROWN (1978): Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. J. Clin. Pathol. 31, 1-11.
5. DE JONCKHEERE, J. F. (1977): Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non-pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 33, 751-757.
6. FERRANTE, A. (1991): Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. Parasite Immunol. 13 (1), 31-47.
7. FIELDS, B. S., S. R. UTLEY FIELDS, J. N. CHIN LOY, E. H. WHITE, W. L. STEFFENS, E. B. SHOTTS (1993): Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*. J. of Infect. Diseases 167, 1146-1150.
8. GRIFFIN, J. L. (1972): Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae. Science 178, 869-870.
9. JANITSCHKE, K., H. WERNER & G. MÜLLER (1980): Das Vorkommen von freilebenden Amöben mit möglichen pathogenen Eigenschaften in Schwimmbädern. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. B 170, 108-122.

10. KILVINGTON, S. & J. PRICE (1990):
Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure.
J. Appl. Bacteriol. 68, 519-525.
11. LARKIN, D. & D. EASTY (1990):
External eye flora as nutrient source for *Acanthamoeba*.
Grafe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 228, 458-460.
12. LASTOVICA, A. J. (1980):
Isolation, distribution and disease potential of *Naegleria* and *Acanthamoeba* (Order: Amoebida) in South Africa.
Trans. Roy. Soc. South Africa 44, 269-278.
13. MILLER, J. F., J. J. MEKALANOS & S. FALKOW (1989):
Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence.
Science 243, 916-922.
14. OCKERT, G. (1993):
Übersichtsreferat: Vorkommen, Parasitismus und pathogenetische Potenz freilebender Amöben.
Appl. Parasit. 34, 77-88.
15. PAGE, F. C. (1991): *Nackte Rhizopoda*.
In: Page, F. C. & F. J. Siemensma (1991): *Nackte Rhizopoda und Heliozoa*. D. Matthes (Hrsg.),
Protozoenfauna, Band 2. G. Fischer, Stuttgart.
16. RIVERA, F., F. LARES, E. RAMIREZ, P. BONILLA, S. RODRIGUEZ, A. LABASTIDA,
R. ORTIZ, D. HERNANDEZ (1991):
Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico City.
Rev. of Infect. Diseases 13 (Suppl. 5), 388-389.
17. THONG, Y. & A. FERRANTE (1986):
Migration patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp.
Infect. and Immun. 51, (No. 1), 177-180.
18. WARHUST, D. C. (1958):
Pathogenic free-living amoebae.
Parasitology Today. 1, 24-28.

Korrespondenzadresse Mag. Julia Walochnik
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene 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: 1997

Band/Volume: [19](#)

Autor(en)/Author(s): Walochnik Julia, Picher O., Aspöck Christoph, Ullmann M., Aspöck Horst

Artikel/Article: [Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten von "Limax-Amöben" \(*Acanthamoeba* und *Hartmannella*\) auf Kulturen verschiedener gramnegativer Bakterienspezies 21-28](#)