

Prüfung der Pathogenität thermophiler Naegleria- und Acanthamoeba-stämme aus verschiedenen Gewässerarten

Rolf Michel¹ und Johan F. De Jonckheere²

1 = Ernst-Rodenwaldt-Institut Koblenz, BRD, Institutsleiter: Dr. med. H. Blenk

2 = Instituut voor Hygiene en Epidemiologie Brüssel, Belgien

Einleitung

Bei Umgebungsuntersuchungen auf kleine, freilebende Amöben wurden Trink- und Brauchwässer, aber auch natürliche Gewässer mit durchschnittlich erhöhter Temperatur berücksichtigt, da erhöhte Wassertemperaturen die Ansiedlung bzw. Vermehrung pathogener Amöbenstämme (GRIFFIN, 1972); CHANG, 1974) begünstigen.

Der Präferenz von erwärmten Gewässerarten entspricht auch die Temperaturleranz pathogener Amöbenarten bzw. -stämme. So vermehrt sich *Naegleria fowleri*, Erreger der primären Amöbenmeningoencephalitis (PAME) noch bei +45° C (GRIFFIN, 1972; CHANG, 1974), *Naegleria australiensis* bei +42° C (DE JONCKHEERE, 1981) und pathogene Acanthamöbenstämme, Erreger der granulomatösen Meningoenzephalitis (GAE) zeigen noch bei +40° C (DE JONCKHEERE, 1980) ein gutes Wachstum.

Diese Toleranz pathogener Amöbenstämme gegenüber erhöhten Temperaturen wurde in einem Temperaturleranztest zur Vorauswahl möglicher pathogener Varianten aus der Vielzahl isolierter Stämme nutzbar gemacht.

Die auf diese Weise ermittelten verdächtigen Stämme wurden sämtlich dem Mäuseinokulationstest (MIT) unterzogen, da auch eine Reihe apathogener Amöbenstämme thermophil sind und sich, wie z. B. *N. lovaniensis*, noch bei +45 Grad Celsius vermehren können.

Methoden

Zur Anzüchtung aus Wasser- und Schlammproben aus verschiedenen Habitaten wurden 1,2% NN-Agarplatten (non nutrient agar) nach Page (1967) verwendet, die zuvor mit einer Suspension lebender *Enterobacter cloacae* bestrichen wurden. Aus den sich bei +30° C bzw. +37° C vermehrenden Mischpopulationen von Amöben wurden einzelne morphologisch unterscheidbare Stämme isoliert und einer Artbestimmung nach Page unterzogen.

Nach Durchführung von Temperaturleranztests (GRIFFIN, 1972, CHANG, 1974, DE JONCKHEERE, 1981) mit den *Naegleria*- und Acanthamöbenstämmen bei 42°–44° C wurden die so ermittelten thermophilen Stämme im Mäuseinokulationstest (MIT) auf ihre mögliche Pathogenität geprüft. Dazu wurden mindestens 20.000 Trophozoiten in 0,02 ml NMRI-Mäusen von 8–14 g intranasal instilliert. Nach Erkrankung bzw. Tod der infizierten Tiere gilt die Pathogenität des untersuchten Amöbenstammes als erwiesen.

Ergebnisse

Untersuchung von wasserführenden Systemen aus zahnärztlichen Behandlungseinheiten

a) im Bundeswehrbereich

Aus 215 Wasserproben von 49 ZBE wurden 7 (3,3%) Naeglerien und 6 (2,8%) Akanthamöbenstämme neben zahlreichen weiteren Amöbenarten isoliert (JUST und MICHEL, 1983). Keiner der isolierten Naeglerienstämme vermehrte sich bei +42° C, so daß es sich in allen Fällen um *N. gruberi* handelte. Dagegen erwiesen sich 5 der 6 Akanthamöbenstämme als thermotolerant. Zwei dieser Stämme von *A. castellanii* führten zur Erkrankung und zum Tod von 2–5 von 6 infizierten Mäusen, aus deren Gehirn und Lungen sich teilweise Amöben anzüchten ließen. Die erkrankten Tiere zeigten meist typische neurologische Symptome wie schiefe Kopfhaltung, unkoordiniertes Putzen und „Im-Kreis-Laufen“. Ein weiterer thermophiler Stamm ließ sich aus dem Gehirn völlig gesund erscheinender Mäuse 3 Monate nach der Infektion herauszüchten. Dieser Stamm erwies sich somit als invasiv aber nicht pathogen. Der einzige nicht thermophile Stamm von *A. polyphaga* erwies sich ebenfalls als invasiv, ohne Symptome einer Erkrankung hervorzurufen.

b) im zivilen Bereich

Der einzige aus 30 Wasserproben von 10 ZBE isolierte Akanthamöbenstamm vermehrte sich nicht mehr bei +40° C und wurde daher nicht weiter untersucht. Aus sämtlichen Wasserproben ließen sich dagegen ein oder mehrere Arten kleiner, freilebender Amöben anzüchten, die nicht zu der Gattung *Naegleria* bzw. *Acanthamoeba* gehören.

Trinkwasserhochbehälter

Ergänzend zu mikrobiologischen Untersuchungen des Einflusses der Kunstharzinnenbeschichtung von Trinkwasserhochbehältern auf das Vorkommen und die Vermehrung von verschiedenen Keimen (SCHOENEN et al., 1982) wurde versucht, im mikrobiellen Bewuchs dieser Behälter kleine, freilebende Amöben nachzuweisen.

Unter zahlreichen Amöbenarten, anderen Protozoen und Metazoen wurden insgesamt 3 Naeglerien- und 8 Akanthamöbenstämme isoliert. Die Naeglerien entwickelten sich nur unterhalb von +40° C, z. T. nicht einmal mehr bei +37° C, während sich 5 der 8 Akanthamöbenstämme noch bei +40° C auf Agarplatten vermehrten.

Die Situation in den einzelnen Behältern stellt sich folgendermaßen dar:

Aus einem mit Epoxid beschichteten Hochbehälter wurden 3 von 4 Akanthamöbenstämmen als thermophil ermittelt, von denen sich einer (Stamm C₃) als hochpathogen erwies. Sämtliche Mäuse starben 5–6 Tage nach intranasaler Instillation mit diesem Stamm. Der aus diesem Behälter angezüchtete Naegleriastamm war nicht thermophil, also apathogen.

2 thermophile von insgesamt 4 isolierten Akanthamöbenstämmen, die nicht zur Erkrankung der infizierten Mäuse führten, wurden in einem PVC-beschichteten Behälter nachgewiesen. Ein *A. polyphaga*-Stamm erwies sich jedoch als invasiv, da bei 4 von 6 klinisch unauffälligen Mäusen 3 Monate nach der Infektion kulturell Amöben aus dem Gehirn nachgewiesen wurden.

Auf verschiedenen Materialien, die zur Besiedlung in einem geflüßten Hochbehälter ausgelegt waren, wurden neben zahlreichen weiteren Amöbenarten auch 2 Naegleria-stämme isoliert, die sich jedoch bei +42° C nicht vermehrten. In den schleimigen Belägen wurden zahlreiche weitere Organismen bestimmt, wie z. B. Wasserflöhe der Gattung Pleuroxus, die neben Ziliaten, Nematoden, Kopepoden, Testazeen und vielen weiteren Arten gefunden wurden.

Trinkwassertank an Bord eines Schiffes der Bundesmarine

Aus den Abstrichen von der kunststoffbeschichteten Wandung eines Tanks wurden ausschließlich 4 Acanthamoeba-Stämme isoliert. Lediglich ein Stamm von *A. castellanii* erwies sich als thermophil. Der MIT verlief jedoch negativ.

Kühlwasserkanal im Bereich von Braunkohlekraftwerken

Als Beispiel für thermisch belastete Oberflächengewässer wurde der Kühlwasserkanal eines Kraftwerkes im Erftkreis mit einer Durchschnittstemperatur von +29° C untersucht. Wegen der zu erwartenden Artenfülle freier Gewässer wurde lediglich auf das Vorkommen von Naeglerien und Acanthamoeben geachtet. Von 10 thermophilen Naeglerienstämmen vermehrten sich 8 noch bei +42° C und 2 zunächst noch bei +44° C. Die 10 übrigen Stämme waren nicht thermophil und sind daher als *N. gruberi* anzusehen.

Von den sich noch bei +42° C aber nicht mehr bei +44° C vermehrenden 8 Stämmen erwiesen sich 6 als pathogen, 2 als apathogen für Versuchsmäuse. Es starb im Vergleich zu einer *N. fowleri*-Infektion nur ein wechselnder Prozentsatz der infizierten Mäuse mit einer zeitlichen Verzögerung. Typische Symptome waren auch hier schiefe Kopfhaltung, unkoordinierte Putz- und Drehbewegungen.

Aus dieser Gruppe wurden 2 pathogene Stämme und ein apathogener Stamm durch Anwendung serologischer und biochemischer Methoden (Immunfluoreszenz, Untersuchung der Protein- und Isoenzymmuster, Lektinagglutination) im Labor von De Jonckheere in Brüssel als *N. australiensis* identifiziert.

Die medizinische Bedeutung dieser neuen Naeglerienart für den Menschen ist unklar, da bisher lediglich seine Pathogenität für Mäuse festgestellt wurde.

Ein weiterer Stamm verhält sich in seinen Temperaturansprüchen genau so wie *N. australiensis*-Stämme. Die Cysten dieses Stammes jedoch sind resistent und robust, verglichen mit den fragilen und schnell absterbenden Cysten von *N. australiensis*. Da er auch das gleiche saure Phosphatase-Isoenzymmuster wie *N. australiensis* aufwies, ist er als apathogene *N. australiensis*-Variante anzusehen.

Von 2 sich zunächst noch bis +44° C vermehrenden Stämmen war einer mäßig pathogen. Beide zeigten jedoch ebenfalls eine starke Reaktion mit *N. australiensis*-Antiserum in der Immunfluoreszenz.

Im Kühlwasserkanal selbst konnte kein Acanthamoeba-Stamm isoliert werden. Jedoch 50 m unterhalb der Mündung des Kanals in die Erft, einem kleinen Fluß, wurde ein thermophiler und hoch virulenter Acanthamoeba polyphaga-Stamm isoliert. 5 von 6 Mäusen starben 5–6 Tage nach der intranasalen Infektion mit diesem Stamm.

Teich bei Madras in Indien

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen gelang es weiterhin, einen *N. australiensis*-Stamm völlig anderen Ursprungs anzuzüchten; aus dem restlichen Inhalt eines im

Feldversuch in Indien in der Nähe von Madras erprobten Keramik-Taschenfilters, der für eine mikrobiologische Nachuntersuchung im geschlossenen Zustand nach Europa gebracht wurde, konnte unter zahlreichen freilebenden Amöben ein thermophiler Naeglerien-Stamm (Vermehrung bei +42° C) mit mäßiger Virulenz für Mäuse isoliert werden. Die biochemische Charakterisierung ergab, daß es sich auch hier bei diesem Stamm aus den Tropen um *N. australiensis* handelte.

Diskussion

Die Suche nach möglichen pathogenen Varianten wird durch die Ermittlung thermophiler Stämme, wie sie in fast allen untersuchten Habitaten gefunden wurden, wesentlich erleichtert. Thermophile und pathogene Naeglerienstämme konnten dabei nur aus Habitaten mit ständig erhöhten Temperaturen (Kühlwasserkanal und tropische Gewässer) angezüchtet werden. Dagegen konnten einzelne z. T. hochpathogene Akanthamöbenstämme auch aus dauernd sehr kühlem Wasser (Trinkwasserhochbehälter, ca. +10° C) isoliert werden. Eine Präferenz für erhöhte Wassertemperaturen scheint demnach bei pathogenen Akanthamöben nicht so ausgeprägt zu sein, wie bei den beiden pathogenen Naegleria-Arten *N.-fowleri* und *N. australiensis*, so daß es richtiger wäre, im Falle von derartigen Akanthamöben von „eurythermen“ Stämmen anstelle von „thermophilen“ Stämmen zu sprechen.

Besondere Beachtung verdient der Nachweis von pathogenen Akanthamöben in Trinkwasseranlagen und in Kühl- und Spülwasser von zahnärztlichen Einheiten, da diese naturgemäß für eine mögliche Kontamination des Menschen mit diesen Arten in Frage kommen.

Welche praktische Bedeutung jedoch die vorliegenden Funde haben, ist schwer abzuschätzen. Als Voraussetzung für eine Infektion ist sicherlich auch die Anzahl der Amöben pro ml wichtig. Da die vorliegenden orientierenden Untersuchungen sich auf qualitative Angaben beschränken, wären Ergänzungen quantitativer Art wünschenswert.

Naegleria australiensis ist der erste Fund einer pathogenen Naegleria-Art in einem künstlich erwärmten Gewässer in Deutschland, nachdem diese Art erstmals anhand eines in Australien isolierten Stammes beschrieben wurde (DE JONCKHEERE, 1981) und seither in Italien und Frankreich nachgewiesen wurde. Unser Fund der gleichen Art aus einem natürlichen tropischen Gewässer – in Indien – ist von epidemiologischem Interesse:

Möglicherweise ist auch diese Art, wie *N. fowleri*, in tropischen Gebieten weit verbreitet und gelangt von dort in Länder mit gemäßigttem Klima, wo sie sich nur in Thermalgewässern oder künstlich erwärmten Gewässern, wie z. B. von Kraftwerken, halten können. Ebenso wahrscheinlich ist die Annahme, daß die natürlich erwärmten Gewässer oder Quellen seit alters her ökologische Nischen nicht nur für thermophile Naeglerien und Akanthamöben, sondern auch für eine Reihe weiterer Protozoenarten darstellen.

Zusammenfassung

Schlamm- und Wasserproben aus verschiedenen wäßrigen Habitaten wurden bezüglich des Vorliegens von potentiellen pathogenen Stämmen von *Naegleria* und *Acanthamoeba* untersucht.

Die pathologischen Stämme wurden nach der Isolation mit Hilfe des Temperaturtoleranztests selektiert. Anschließend wurde mit den thermophilen Stämmen ein Mäuseinokulationstest auf intranasalem Weg durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methoden wurde *Naegleria australiensis* erstmalig in der BRD aus einem künstlich erwärmten Kanal einer Pumpanlage isoliert. Die gleiche Gattung wurde in einem natürlichen wäßrigen Habitat in Indien gefunden. Verschiedene mäusepathogene Stämme von *Acanthamoeba* wurden aus Trinkwasserreservoirs und aus Kühl- und Spülwasser von zahnärztlichen Einheiten isoliert. Einzelne Stämme besaßen invasive Eigenschaften; infizierte Mäuse zeigten jedoch keine Krankheitserscheinungen, obwohl Amöben aus dem Gehirn isoliert werden konnten.

Summary

Evaluation of pathogenic properties of thermophilic *Naegleria* and *Acanthamoeba* strains isolated from different aquatic habitats.

Mud and water samples from different aquatic habitats were inspected for the prevalence of potential pathogenic strains of *Naegleriae* and *Acanthamoebae*.

Pathogenic strains were selected after isolation by testing their temperature tolerance. Subsequently the thermophilic strains were submitted to the mice inoculation test by the intranasal route. Using these methods *Naegleria australiensis* (DE JONCKHEERE, 1981) was isolated for the first time in West Germany by examining a thermally polluted canal from a power plant. The same species was found from a natural aquatic habitat in India. Several strains of *Acanthamoeba* pathogenic for mice were isolated from potable water reservoirs and in cooling and rinsing water from dental treatment units.

Although single strains exhibited invasive capacities, infected mice did not become ill, even if amoebae could be isolated from their brains.

Literatur

- CHANG, S. (1974): Cytopathic and pathogenic differences among geographic strains of pathogenic *Naegleria* and their bearing on the epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis. III. Int. Congr. Parasitol. Proceedings Vol. 1, 187–188, Facta Publication, München
- DE JONCKHEERE, J. F. (1980): Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. Appl. Environm. Microbiol. 39, 681–685
- DE JONCKHEERE, J. F. (1981): *Naegleria australiensis* sp. nov. another pathogenic *Naegleria* from water. Parasitologica XVII, 423–429
- DE JONCKHEERE, J. F., PERNIN, P., SCAGLIA, M., MICHEL, R. (1984): A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* ssp. nov. J. Protozool. 31, 324–331
- GRIFFIN, J. L. (1972): Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic free-living amoebas. Science 178, 869–870

JUST, H.-M., MICHEL, R. (1984): Infektionsgefährdung durch Bakterien, Pilze und Amöben in Kühl- und Spülwasser von Zahnbehandlungseinheiten. Dtsch. Zahnärztl. Z. 39, 54–59

SCHOENEN, D., DOTT, W., THOFERN, E. (1981): Mikrobielle Besiedlung von Auskleidungsmaterialien und Baustoffen im Trinkwasserbereich. 7. Mitteilung: Langzeitbeobachtungen in zwei Reinwasserbehältern mit Epoxidharzauskleidung. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B 173, 346–355

ANSCHRIFTEN DER AUTOREN:

Dr. R. Michel
Ernst-Rodenwaldt-Institut
Viktoriastraße 11–13
5400 Koblenz, BRD

Dr. J. F. De Jonckheere
Instituut voor Hygiene en Epidemiologie
Dept. Mikrobiologie
Juliette Wytmanstraat 14
1050 Brüssel, Belgien

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: 1984

Band/Volume: [6](#)

Autor(en)/Author(s): Michel Rolf, Jonckheere Johan F. De

Artikel/Article: [Prüfung der Pathogenität thermophiler Naegleria- und Acanthamoebastämme aus verschiedenen Gewässerarten. 81-86](#)