

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 267–274

Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene (Vorstand: Prof. Dr. W. Bommer) der Universität Göttingen

Epidemiologie und Pathogenität freilebender Amöben aus Hallenbädern in Südniedersachsen

A. Kuhlencord, W. Bommer

Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist das Interesse an kleinen freilebenden Amöben oder Limax-Amöben gewachsen, seitdem man weiß, daß nicht nur die bekannten primär parasitären Amöben (*Entamoeba histolytica*) für Menschen und Tiere pathogene Bedeutung haben, sondern daß auch freilebende Amöben der Gattungen *Acanthamoeba* und *Naegleria* in der Lage sind, ernsthafte, fast immer tödlich verlaufende Erkrankungen des Zentralnervensystems sowie therapieresistente Augeninfektionen mit Verlust der Sehkraft hervorzurufen. Bis heute sind 50 Fälle von Erkrankungen durch Akanthamöben in der Literatur beschrieben worden, davon 35 Infektionen des Zentralnervensystems in Form einer Meningoenzephalitis und 13 Infektionen des Auges mit dem Bild einer Keratokonjunktivitis. Aus allen Kontinenten wurde über Akanthamöbeninfektionen berichtet (Abb. 1), was darauf hindeutet, daß es sich um eine weit verbreitete, nicht nur auf bestimmte Regionen beschränkte Erkrankung handelt und vermuten läßt, daß manche Infektionen bisher übersehen worden sind.



Abb. 1: Akanthamöbeninfektionen (bis 1985 beschriebene Fälle)

Methoden

Die Hallenbäder wurden außer auf das Vorhandensein von Amöben auf folgende Parameter hin untersucht: pH-Wert, Chlorgehalt, Temperatur, Wasserkeim- und Coliformengehalt des Wassers, Anzahl und Art der Besucher und Filtersysteme.

Zur Isolierung der Limax-Amöben wurden nach Filtration der Wasserproben die Membranfilter (0,45 µm Porenweite) mit der Rückstandsseite auf eine mit lebenden *E. coli*-Keimen beschichtete 3%ige NN-Agarplatte gelegt und bei 37° C bis zu 14 Tagen inkubiert (DE JONCKHEERE 1981, JANITSCHKE et al. 1980).

Zur Differenzierung zwischen *Naegleria spp.* und *Acanthamoeba spp.* untersuchten wir die isolierten Limax-Amöbenstämme nach den Kriterien von PAGE (1967 a, 1967 b, 1976).

Die Limax-Amöbenstämme wurden in verschiedenen axenischen Medien kultiviert (GRIFFITHS et al. 1978; JENSEN et al. 1970; KUHLENCORD 1985), bevor sie unterschiedlichen Pathogenitätstests unterzogen wurden, um eine bakterielle Beeinflussung der Tests zu vermeiden.

Der Temperaturtoleranztest wurde in Anlehnung an GRIFFIN (1972) durchgeführt.

Auf zytopathogene Effekte wurden die Limax-Amöbenstämme in vier verschiedenen Zelllinien (BHK-21, HEp-2, HQ-80b, 1300 Neuro 2a) untersucht (KUHLENCORD 1985).

Zur Bestimmung der Tierpathogenität wurden weißen Mäusen mit einem Gewicht von 15 bis 20 Gramm 300.000 Trophozoiten in 0,03 ml 0,9%iger NaCl-Lösung intrazerebral injiziert oder 1.000.000 bzw. 200.000 Trophozoiten in 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung intranasal inokuliert. Die nach der Inokulation gestorbenen sowie die nach vier Wochen getöteten Mäuse wurden unter sterilen Kautelen kraniotomiert, die Gehirne mit einem sterilen Löffel entnommen und auf einer mit *E. coli* beschichteten NN-Agarplatte ausgestrichen und später auf Akanthamöbenwachstum untersucht.

Ebenfalls wurden einige Gehirne histologisch aufgearbeitet. Die histologischen Gewebsschnitte wurden mit spezifischen immunhistologischen Methoden gefärbt, um die Akanthamöben sicher zu identifizieren (KUHLENCORD 1985). Zum Vergleich wurde eine Acridin-Orange-Färbung (CURSONS 1981) sowie eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (BURCK 1981) durchgeführt.

Ergebnisse

Im April 1982 wurden 100 Hallenbäder untersucht. In 34 Hallenbädern (34%) wurden Limax-Amöben nachgewiesen. Im Dezember 1983 wurden 60 dieser Bäder ein zweites Mal untersucht, Limax-Amöben ließen sich in 21 Schwimmbädern (35%) nachweisen. Von einigen Bädern wurde zusätzlich das Füllwasser untersucht. Limax-Amöben konnten hieraus nicht isoliert werden. Bei allen isolierten Stämmen handelte es sich um *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria*-Arten konnten in keinem der Hallenbäder nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß in den meisten Bädern, in denen bei der ersten Untersuchung Akanthamöben nachgewiesen werden konnten, bei der zweiten Untersuchung keine Akanthamöben mehr nachweisbar waren und umgekehrt. Nur aus 6 Hallenbädern konnten in beiden Untersuchungen Akanthamöben isoliert werden (Abb. 2). Eine Korrelation zwischen pH-Wert, Chlor-, Wasserkeim- oder Coliformengehalt und dem Vorkommen von Akanthamöben konnte nicht festgestellt werden. Selbst bei einem Gehalt an freiem Chlor von 1,6 mg/l konnten Akanthamöben isoliert werden.

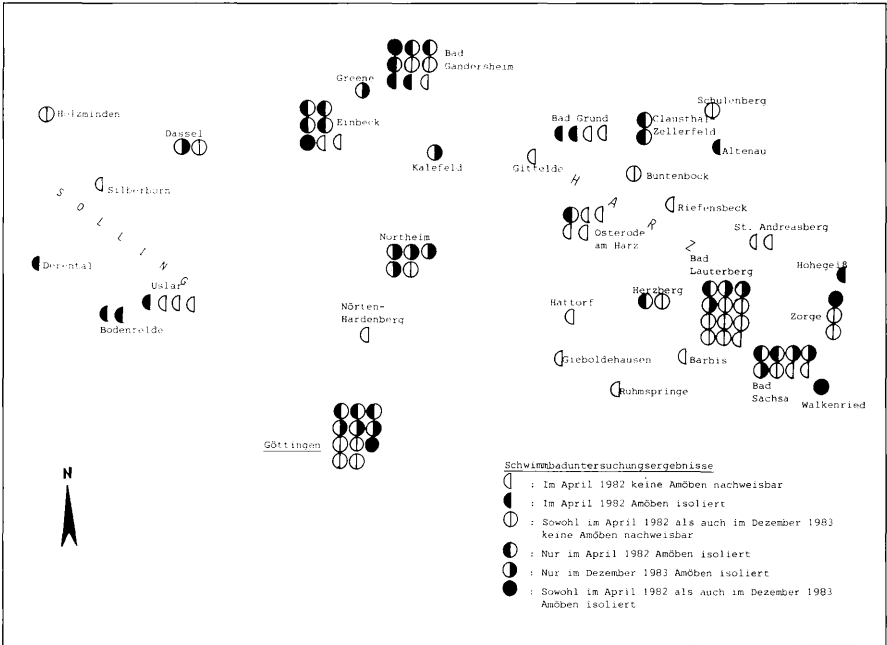


Abb. 2: Schwimmbaduntersuchungsergebnisse April 1982 und Dezember 1983

Die Frequentierung der Schwimmbäder korrelierte dagegen mit dem Acanthamöbenvorkommen. In großen Bädern mit Besucherzahlen von über 50 pro Tag wurden zu ca. 50% Acanthamöben nachgewiesen, in kleineren Bädern mit weniger als 50 Besuchern pro Tag nur in ca. 25 bis 33%.

23 isolierte Acanthamöbenstämme wurden einem Temperaturtoleranztest unterzogen. Kein Stamm zeigte ein Wachstum bei 42° C. Entsprechend zu GRIFFIN (1972) dürfte keiner dieser Stämme pathogen sein, denn virulente Stämme sollten bei dieser Temperatur ein Wachstum zeigen.

Alle 23 Acanthamöbenstämme erwiesen sich jedoch in vier unterschiedlichen Zellkulturen als pathogen, ohne daß sich Unterschiede zwischen den Zelllinien ergaben. Der zytopathogene Effekt zeigte sich in Form einer beginnenden Diskontinuität des Zellrasens, einem leichten Schrumpfen und Abrunden der Zellen und einer Pyknose des Nukleus. Diesem folgte eine völlige Destruktion des Zellrasens.

Nach der intrazerebralen Injektion von 300.000 Amöben pro Maus starben die meisten Mäuse innerhalb von drei bis acht Tagen. 17 der 23 intrazerebral injizierten Stämme führten zu einer Enzephalitis und zum Tod. Sowohl aus den Gehirnen der gestorbenen als auch der nach vier Wochen getöteten Mäuse konnten Acanthamöben rückisoliert werden. Nach intranasaler Inokulation von 1.000.000 Amöben pro Maus hatten wiederum 17 der 23 inokulierten Acanthamöbenstämme eine tödliche Wirkung. In den Gehirnen der gestorbenen Mäuse konnten Acanthamöben nachgewiesen werden. Die klinisch gesund gebliebenen Tiere wurden vier Wochen post inoculationem getötet und kraniotomiert. Erstaunlicherweise ließen sich zwei der Acanthamöbenstämme aus den Gehirnen dieser Mäuse isolieren. Die beiden Stämme erwiesen sich demzufolge als invasiv, ohne Krankheitserscheinungen hervorzurufen. Bei der intranasalen Inoku-

lation von 200.000 Amöben pro Maus führten nur zwei der applizierten Stämme zu einer Enzephalitis mit letalem Ausgang. Sechs weitere Stämme waren wiederum invasiv, ohne klinisch auffällige Symptome hervorzurufen.

In den Gehirnen von intranasal inokulierten Mäusen, die an einer Enzephalitis erkrankt waren, ließen sich die Akanthamöben am besten nach indirekter Immunfluoreszenz-Markierung mit spezifischen Antikörpern auffinden (Abb. 3 u. 4). Bei allen histologisch untersuchten Mausgehirnen konnten Akanthamöben lediglich im Bulbus und Tractus olfactorius sowie in dem angrenzenden Lobus frontalis nachgewiesen werden, nie jedoch in anderen Teilen des Zentralnervensystems. Auch in den mit Acridin-Orange gefärbten Hirnschnitten ließen sich die Akanthamöben leicht auffinden. Sie fluoreszierten rot-organisch im Gegensatz zum Hirngewebe, welches eine grüne Fluoreszenz zeigte. Auch nach dieser Färbung stellten sich die Amöben nur im Bulbus und Tractus olfactorius bzw. im angrenzenden Lobus frontalis dar. In den Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten ließen sich die Amöben nur mit großen Schwierigkeiten auffinden. Diese Färbung erwies sich somit als Screening-Methode ungeeignet.

Diskussion

Die Untersuchungen ergaben, daß zum jeweiligen Zeitpunkt mindestens ein Drittel der untersuchten Schwimmbäder mit *Acanthameba* spp. kontaminiert waren. Auch andere Autoren (DE JONCKHEERE 1979b; ESTERMANN et al. 1984; JANITSCHKE et al. 1980) konnten in den Schwimmbädern in größerem Umfang Akanthamöben nachweisen. *Naegleria*-Arten konnten in keinem Fall gefunden werden, wohl wegen ihrer bekannten Empfindlichkeit gegenüber Chlor (DE JONCKHEERE und VAN DE VOORDE 1976; PERRINE et al. 1980). Auch in vitro zeigten sich Akanthamöben äußerst chlorresistent (PERRINE et al. 1980), so daß ihre weite Verbreitung auch in gechlorten

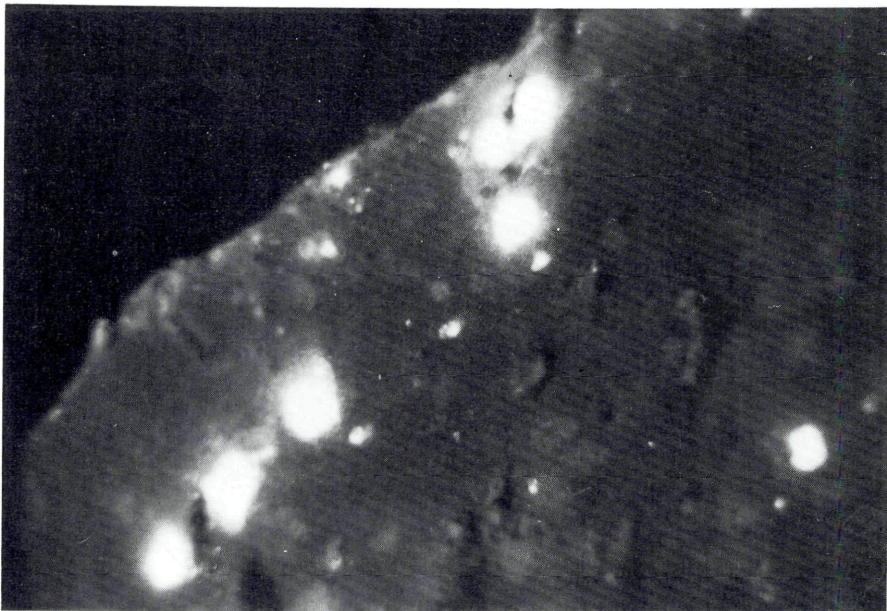


Abb. 3: Immunhistologische Darstellung der Akanthamöben im angrenzenden Lobus frontalis (1000 x)

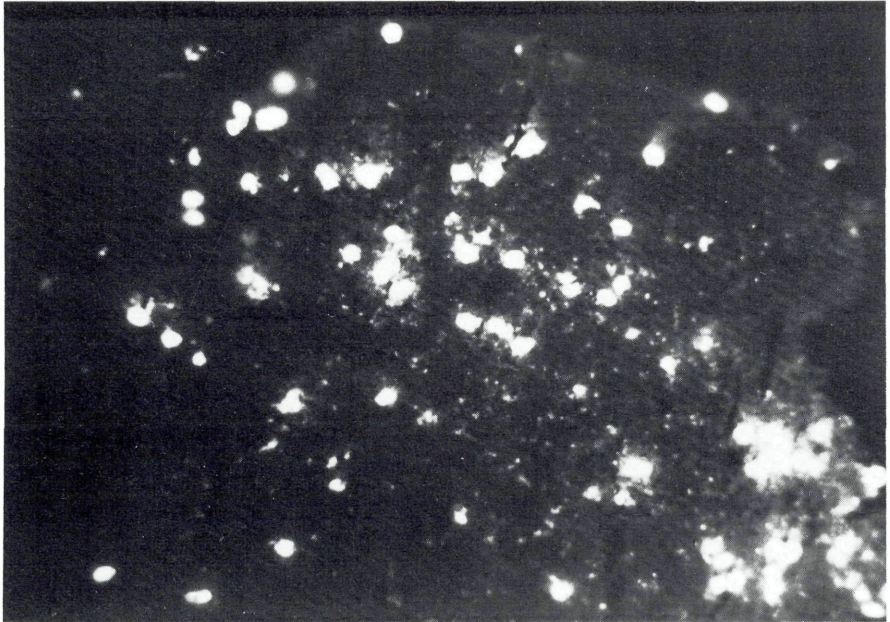


Abb. 4: Immunhistologische Darstellung der Akanthamoeben im Bulbus olfactoris (400 x)

Schwimmbädern nicht verwundert. Eine Korrelation zwischen der Frequentierung der Schwimmbäder und dem Vorkommen von Akanthamoeben läßt im Zusammenhang mit den Untersuchungsergebnissen des Füllwassers auf eine exogene Kontamination durch die Benutzer schließen. Diese könnten nach LAWANDE (1983) Akanthamoebenzysten, die sich z. B. aus der Luft an Haut und Haaren verfangen haben, besonders nach nicht ausreichender vorheriger Körperwäsche, ins Schwimmbad eintragen oder auch Amöben, die den Oronasopharyngealraum besiedeln (MICHEL et al. 1982; RIVERA et al. 1984), beim Tauchen oder Schwimmen ins Wasser abgeben.

Wie schon geschildert, ergaben die verschiedenen Pathogenitätstests unterschiedliche Resultate. Ganz im Gegensatz zu GRIFFIN (1972) sowie zu MICHEL und DE JONCKHEERE (1984), die von einer wesentlichen Erleichterung der Suche nach pathogenen Varianten durch die Ermittlung thermophiler Stämme sprachen, konnten deren Ergebnisse in Bezug auf die aus Hallenbädern in Südniedersachsen stammenden Akanthamoebenstämme nicht reproduziert werden.

CHANG (1974) stellte eine Korrelation zwischen Mauspathogenität und zytopathogenem Effekt in Zellkulturen fest. Jedoch war es uns ebenso wie BROWN et al. (1982), DE JONCKHEERE (1979a) und JANITSCHKE et al. (1980) nicht möglich, eine derartige Korrelation zu beobachten. Eine Übertragung zytopathischer Effekte auf die Tierpathogenität scheint auf Grund unserer Resultate sowie unter dem Gesichtspunkt, daß es sich bei den betreffenden Kulturen um karzinomatös veränderte und in vitro kultivierte Zelllinien handelt, die gegenüber Zellen in vivo eine andere Resistenzlage haben könnten, nicht möglich zu sein.

Eine intrazerebrale Applikation von Akanthamoeben ist sicher nicht physiologisch, doch kann man aus dem Angehen der Infektion eine gewisse Adaptationsfähigkeit der Akanthamoeben an das Hirngewebe ableiten. Die intranasale Inokulation entspricht

dem physiologischen Infektionsweg, wie er z. B. beim Schwimmen möglich ist. Die Anzahl der Amöben, die den Mäusen inokuliert wurde, ist relativ schwer mit einer möglichen Infektionsdosis beim Menschen zu vergleichen. Bei der intranasalen Applikation kommt noch die Frage hinzu, wieviele der inokulierten Amöben einen Kontakt zu den Epithelien der Nasenschleimhaut hatten und wie lange dieser Kontakt andauerte, ferner wie hoch der Anteil der aspirierten Amöben wirklich ist und wieviele davon wieder expektoriert wurden. Diese unbestimmten Faktoren lassen nicht bei allen Mäusen eine konstante Infektionsdosis erwarten.

Abgesehen von diesen Schwierigkeiten sollten die Akanthamöbenstämme, die sich im Tierversuch als pathogen erwiesen haben, auch für den Menschen als fakultativ pathogene Akanthamöbenstämme angesehen werden. Die Beobachtung, daß einzelne Akanthamöbenstämme aus Mausgehirnen isoliert werden konnten, ohne daß Krankheitserscheinungen aufgetreten waren, ist nicht zu übersehen. Es ist doch bedenklich, wenn man berücksichtigt, daß mehrere Tausend Menschen täglich in mit Akanthamöben kontaminierten Gewässern schwimmen, tauchen oder baden, und daß sich alle von uns getesteten Stämme in Zellkulturen als pathogen herausstellten und ein hoher Anteil sich im Tierversuch als pathogen erwies. Bekanntlich existieren noch keine therapeutischen Möglichkeiten für die Akanthamöbenmeningoenzephalitis. Um so erstaunlich ist die Tatsache, daß in den europäischen Ländern bisher noch keine Schwimmbadinfektionen durch Akanthamöben beobachtet worden sind. Eine spezifische oder unspezifische Grundimmunität gegenüber Akanthamöben könnte hierfür die Erklärung sein, ferner die aus Unkenntnis unterbliebene Diagnose. Infolge der schwierigen Identifikation der Akanthamöben in histologischen Schnitten können diese auch vom Pathologen leicht übersehen werden, wie bereits BUTT (1966) und andere Autoren berichtet haben. In der Literatur werden zwei mögliche Infektionswege diskutiert: Zum einen die direkte Invasion des Zentralnervensystems über die Mucosa nasalis, zum anderen die hämatogene Streuung von einem Prozeß in der Lunge aus. In allen histologisch aufgearbeiteten Mausgehirnschnitten gelang es uns, nur im Bulbus und Tractus olfactorius sowie in den angrenzenden Teilen des Lobus frontalis Akanthamöben nachzuweisen. In allen anderen Partien des Zentralnervensystems konnten keine Akanthamöben nachgewiesen werden. Eine intra- oder perivaskuläre Lokalisation der Akanthamöben konnten wir in den befallenen Gebieten nicht feststellen, eher befanden sich die Amöben abszeßartig gehäuft in den nekrohämorrhagischen Anteilen des Bulbus und Tractus olfactorius. Diese Ergebnisse sprechen für eine direkte Invasion der Akanthamöben ins Zentralnervensystem via Mucosa nasalis entlang der Fila olfactoria durch die Lamina cribrosa in den Bulbus olfactorius.

Zusammenfassung

Es wurden 100 Hallenbäder auf das Vorhandensein von freilebenden Amöben untersucht. Dabei war es möglich, in 34 Hallenbädern Limax-Amöben der Gattung *Acanthamoeba* zu isolieren. Aus keinem Hallenbad konnten *Naegleria*-Arten angezchtet werden. Um die Pathogenität der Akanthamöben festzustellen, wurden drei verschiedene Tests durchgeführt. Im Temperaturtoleranztest zeigte kein Akanthamöbenstamm Wachstum bei 42° C. In verschiedenen Zellkulturen (BHK-21, HEp-2, HQ-80b, 1300 Neuro 2a) riefen jedoch alle 23 Akanthamöbenstämme einen zytopathogenen Effekt hervor, ohne daß sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien zeigten. Beim Mausinokulationstest waren nach intranasaler Inokulation 17 von 23 getesteten Akanthamöbenstämmen von letaler Wirkung. Aus den Gehirnen der gestorbenen Tiere ließen sich Akanthamöben isolieren. Zusätzlich konnten auch bei den gesund gebliebenen Mäusen zum Teil Akanthamöben im Gehirn nachgewiesen werden. Eine

Korrelation der drei Pathogenitätstests war nicht ersichtlich. Zur Aufklärung des Infektionsweges wurden histologische und immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Alle Ergebnisse sprechen für eine direkte Invasion der Acanthamoeben ins Zentralnervensystem via Mucosa nasalis und Bulbus olfactorius.

Summary

Epidemiology and pathogenicity of free-living amoebae from indoor swimming pools in South-Lower-Saxony

100 indoor swimming pools were examined for the presence of free-living amoebae. *Limax*-amoebae of the genus *Acanthamoeba* could be isolated from 34 swimming pools. *Naegleria* species were not present. Three different tests were done to determine the pathogenicity of the *Acanthamoebae*. No *Acanthamoebae* strain showed proliferation in the temperature-tolerance-test at 42° C. In different cell-cultures (BHK-21, HEp-2, HQ-80b, 1300 Neuro 2a), however, all 23 tested strains caused a cytopathic effect, without differences between the various cell-lines. 17 of the 23 tested *Acanthamoebae* strains had a lethal effect for the mice after intranasal inoculation. *Acanthamoebae* could be isolated in the brains of dead mice. In addition, *Acanthamoebae* could be isolated also from a few brains of mice which remained healthy. A correlation between the results of the different tests of pathogenicity was not obvious. Histological and immunohistological tests were done to clarify the route of infection. All results indicated a direct invasion of the central nervous system by the *Acanthamoebae* via Mucosa nasalis and Bulbus olfactorius.

Literatur

- BROWN, T. J. et al. (1982): Amoebae from antarctic soil and water. *Appl. Microbiol.* 44, 491–493.
- BURCK, H. C.: *Histologische Technik*, 4. Auflage, Thieme, Stuttgart 1981.
- BUTT, C. G. (1966): Primary amebic meningoencephalitis. *New Engl. J. Med.* 274, 1473–1476.
- CHANG, S. L. (1974): Etiological, pathological, epidemiological and diagnostical considerations of primary amoebic meningoencephalitis. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 3, 135–159.
- CURSONS, R. T. M. (1981): A simple staining method for the detection of amoebae. *N. Z. med. J.* 94, 471.
- DE JONCKHEERE, J. F., VAN DE VOORDE, H. (1976): Differences in destruction of cysts of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Microbiol.* 31, 294–297.
- DE JONCKHEERE, J. F. (1979a): Studies on pathogenic free-living amoebae in swimming pools. *Bull. Inst. Pasteur* 77, 385–392.
- DE JONCKHEERE, J. F. (1979b): Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: a survey in Belgium. *Ann. Microbiol. (Paris)* 130B, 205–212.
- DE JONCKHEERE, J. F. (1981): Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. in thermally polluted discharges and surface water. *J. Protozool.* 28, 56–59.
- ESTERMANN, A. et al. (1984): Determinants of the microbiological characteristics of South Australian swimming pools. *Appl. Microbiol.* 47, 325–328.
- GRIFFIN, J. L. (1972): Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science* 178, 869–870.
- GRIFFITHS, A. J. et al. (1978): Use of physiological characterizations in classification of five species of *Acanthamoeba*. *J. gen. Microbiol.* 107, 211–215.
- JANITSCHKE, K. et al. (1980): Das Vorkommen von freilebenden Amöben mit möglichen pathogenen Eigenschaften in Schwimmbädern. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* B 170, 108–122.

- JENSEN, T. et al. (1970): Axenic cultivation of large populations of *Acanthamoeba* (JBM). *J. Parasit.* 56, 904–906.
- KUHLENCORD, A.: Zur Epidemiologie und Pathogenität von freilebenden Amöben aus Hallenbädern in Südniedersachsen, einschließlich histologischer Untersuchungen zur Klärung der Acanthamöben-meningoenzephalitis. *Med. Diss. Göttingen* 1985.
- LAWANDE, R. V. (1983): Recovery of soil amoebae from the air during the Harmattan in Zaire, Nigeria. *Ann. trop. Med. Parasit.* 77, 45–49.
- MICHEL, R. et al. (1982): Isolierung von freilebenden Amöben durch Gewinnung von Nasenschleimhautabstrichen bei gesunden Probanden. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. B* 176, 155–159.
- MICHEL, R., DE JONCKHEERE, J. F. (1984): Prüfung der Pathogenität thermophiler Neogleria- und Acanthamöbenstämme aus verschiedenen Gewässern. *Mitt. Öst. Ges. Tropenmed. Parasit.* 6, 81–86.
- PAGE, F. C. (1967a): Taxonomic criteria for limax amoeba with description of three new species of Hartmannella and three of Vahlkampfia. *J. Protozool.* 14, 499–521.
- PAGE, F. C. (1967b): Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with description of three species. *J. Protozool.* 14, 709–724.
- PAGE, F. C.: An illustrated key to freshwater and soil amoeba with notes on cultivation and ecology. *Scientific Publication, Ambleside* 1976.
- PERRINE, D. et al. (1980): Activité comparée in vitro du chlore et du brome sur les kystes d'amibes libres. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 174, 287–303.
- RIVERA, F. et al. (1984): Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. *Environ. Res.* 33, 428–440.

ANSCHRIFT DES AUTORS

A. Kuhlencord
Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene
Windausweg 2
D-3400 Göttingen

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: 1986

Band/Volume: [8](#)

Autor(en)/Author(s): Kuhlencord A., Bommer Wolfgang

Artikel/Article: [Epidemiologie und Pathogenität freilebender Amöben aus Hallenbädern in Südniedersachsen. 267-274](#)