

DIPLOMARBEIT

Untersuchung von Wasserproben aus der Industrie auf
freilebende Amöben

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Ute Scheikl
Matrikel-Nummer:	9304046
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Biologie A 437 /Anthropologie A 442
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Doz. Dr. Julia Walochnik Univ.-Prof. Dr. Christine Frank

Wien, im September 2009

1	EINLEITUNG.....	4
1.1	Historisches zur Amöbenforschung	4
1.2	Bakterielle Endozytobionten freilebender Amöben (FLA) – historisches	6
1.3	Systematik und Phylogenie der FLA	10
1.4	Akanthamöben, Hartmannellen und Nöglerien	12
1.4.1	Lebenszyklus und Morphologie.....	12
1.4.1.1	Acanthamoeba	12
1.4.1.2	Hartmannella	14
1.4.1.3	Naegleria	15
1.4.2	Ernährung.....	16
1.4.3	Ökologie und Verbreitung.....	16
1.4.4	Medizinische Relevanz.....	18
1.4.4.1	Acanthamoeba-Keratitis (AK)	18
1.4.4.2	Hautläsionen und Pneumonie verursacht durch Acanthamoeba spp.	20
1.4.4.3	Granulomatöse Amöbenenzephalitis (GAE).....	21
1.4.4.4	Primäre Amöbenmeningoenzephalitis (PAME)	23
1.4.5	Interaktionen mit Bakterien	26
1.5	Legionellen.....	29
1.5.1	Biologie, Phylogenie und Ökologie von <i>L. pneumophila</i>	29
1.5.2	Die Rolle der FLA für die Persistenz von Legionellen in der Umwelt	30
1.5.3	Die Rolle der FLA für die Virulenz <i>L. pneumophila</i>	32
1.5.4	Pathomechanismus.....	32
1.5.4.1	Der infektiöse Zyklus in Amöben und Makrophagen	32
1.5.5	Medizinische Bedeutung der Legionellen	34
1.6	Fragestellung	35
2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	Probengewinnung	37
2.1.1	Wasserproben	37
2.2	Referenzstämme	37
2.2.1	Acanthamoeba-Isolate	38
2.2.2	Hartmannella-Isolat	38
2.2.3	Naegleria-Isolat	38
2.3	Herstellung des PYG-Mediums	38
2.4	Kultivierung	39
2.4.1	Wasserproben	39
2.4.2	Referenzstämme	40
2.5	Morphologische Identifizierung.....	40
2.6	DNA Isolierung	41

2.6.1	DNA Isolierung von den Kulturplatten	41
2.6.2	DNA Isolierung von den Filterstanzen.....	41
2.7	Messung der DNA-Konzentration	41
2.8	Primer-Design für die Gattung <i>Hartmannella</i>	41
2.9	Etablierung der PCR	43
2.9.1	Titration-PCR.....	43
2.9.2	<i>Acanthamoeba</i> -PCR	44
2.9.3	<i>Hartmannella</i> -PCR	45
2.9.4	<i>Naegleria</i> -PCR	46
2.10	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	46
2.10.1	Herstellung des Agarosegels	46
2.11	Aufreinigen der PCR-Produkte.....	47
2.12	Sequenzieren	47
2.13	Datenbearbeitung.....	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Erste morphologische Differenzierung	49
3.2	Kultur und Identifizierung der Acanthamöben	51
3.2.1	Morphologie.....	51
3.2.2	Molekularbiologie	52
3.3	Kultur und Identifizierung der Hartmannellen.....	54
3.3.1	Morphologie.....	54
3.3.2	Molekularbiologie	54
3.4	Filterstanzen – DNA-Konzentration.....	57
3.5	Filterstanzen – <i>Acanthamoeba</i>	59
3.5.1	JDP-PCR.....	59
3.5.2	Nested-PCR	60
3.6	Filterstanzen – <i>Hartmannella</i>	64
3.7	Filterstanzen – <i>Naegleria</i>	65
3.8	Sequenzieren	66
3.8.1	<i>Acanthamoeba</i> – Genotypisierung.....	66
3.8.2	<i>Hartmannella</i> – Typisierung	68
3.8.3	<i>Naegleria</i> – Typisierung	70
3.9	FLA und Legionellen in den Wasserproben	70
4	DISKUSSION	73
4.1	Vorkommen von FLA in Industrierwässern	73
4.2	Artenspektrum und Parameter in den Wasserproben.....	74
4.3	Sensitivität der Kultur und des molekularbiologischen Nachweises	78

4.3.1	Kultivierung.....	78
4.3.2	<i>Acanthamoeba</i> -PCR	78
4.3.3	<i>Hartmannella</i> -PCR	80
4.3.4	<i>Naegleria</i> -PCR	81
4.4	Sequenzieren	81
4.5	Schlussfolgerungen.....	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	ANHANG.....	90
6.1	Kurzzusammenfassung.....	90
6.2	Abstract	90
6.3	Abkürzungsverzeichnis	92
6.4	Glossar	94
6.5	Literaturverzeichnis	101
6.6	Curriculum vitae	115
6.7	Danksagung	116

1 EINLEITUNG

1.1 Historisches zur Amöbenforschung

Seit DUJARDIN 1835 Süßwasser-Amöben und Foraminiferen in der Klasse der sogenannten Rhizopoda („Wurzelfüßer“) vereinte, wurde die Klassifizierung der Amöben immer wieder geändert und überarbeitet. Erst durch die Möglichkeit molekularbiologischer und elektronenoptischer Methoden konnten grundlegende Erkenntnisse über die Phylogenie der Amöben gewonnen werden.

Aufgrund von licht- und elektronenmikroskopischen Daten etablierte PAGE (1987, 1991) ein neues System für die nackten Rhizopoden. Er unterteilte die vormals acht Klassen der Rhizopoda (LEVINE et al. 1980) in fünf. Dabei vereinte er alle nackten, lobosen (mit „lappenförmigen“ Pseudopodien), nichtsporenbildenden Amöben ohne Flagellatenstadium in der Klasse Lobosea CARPENTER 1861 und der Unterklasse Gymnamoebia. Diese beinhaltete unter anderem die Familien Acanthamoebidae, Hartmannellidae und Entamoebidae incertae sedis. Die Familie Vahlkampfiidae mit der Gattung *Naegleria* stellte PAGE hingegen zu der neuen Klasse Heterolobosea PAGE & BLANTON 1985, die unter anderem durch das Vorkommen von Flagellatenstadien gekennzeichnet ist.

Die ersten molekularbiologischen Daten bestätigten die Annahme der Polyphylie der Lobosea und Heterolobosea, in Übereinstimmung mit ihren morphologischen Unterschieden (PAGE & BLANTON 1985, CLARK & CROSS 1988). Durch Vergleiche der Gensequenzen der kleinen rRNA-Untereinheit fand man bald heraus, dass sich beide Amöben-Gruppen unabhängig voneinander entwickelt haben (BOLIVAR et al. 2001).

CAVALIER-SMITH reduzierte in „A revised six-kingdom system of life“ (1998) das Regnum Protozoa von 18 (CAVALIER-SMITH 1993) auf 13 Phyla und überarbeitete auch das Phylum Rhizopoda erneut. Aus den Rhizopoda wurde das neue Phylum Cercozoa, aus dem manche „Rhizopoden“ entfernt wurden, das dafür aber um einige Flagellaten ergänzt wurde. Die lobosen Amöben innerhalb des Subphylums Lobosa vereinigte er hingegen im Phylum Amoebozoa. Die Entamöben wurden aufgrund vorangegangener molekularbiologischer Vergleiche (SOGIN 1989) aus den Lobosea ausgeschlossen und in

ein eigenes Phylum Entamoebia gestellt (CAVALIER-SMITH 1993).

Zu dieser Zeit erstellten HAUSMANN & HÜLSMANN (1996) eine systematische Gliederung der Protozoa, die die nächsten Jahre Gültigkeit haben sollte. In diesem Schema wurde die Gruppe der Amoebozoa als Metakaryota incertae sedis in die Filosea, die Acarpomyxea und die Lobosea unterteilt. Letztere enthielt die Gruppe der Gymnamoebia in denen die Gattungen *Acanthamoeba*, *Balamuthia* und *Entamoeba* vereint werden.

2001 konnten BOLIVAR et al. anhand von SSU („small-subunit“) rRNA-Sequenzen sechs unterschiedliche Gymnamoebia-Linien differenzieren. Obwohl sie nicht morphologisch übereinstimmen, führt eine dieser Linien zu den Gattungen *Acanthamoeba* und *Balamuthia* in der Familie Acanthamoebidae. Eine andere Linie in der Nähe dieser Familie wird durch die Gattungen *Hartmannella* und *Echinamoeba* repräsentiert, die ebenfalls keine wesentlichen morphologischen Übereinstimmungen aufweisen.

Molekularbiologische Vergleiche verschiedener Gene (SSU rRNA, Aktin) und die Analyse von Proteindaten ließen die Vermutung zu, dass die Lobosea gemeinsam mit den Mycetozoa monophyletischen Ursprungs sein könnten.

In dem Bestreben die SSU rRNA-Phylogenie mit den morphologischen Merkmalen abzustimmen, kreierten CAVALIER-SMITH et al. (2004) für das Phylum Amoebozoa ein System bestehend aus sieben Klassen und 20 Ordnungen. Die Familie Hartmannellidae wurde dabei innerhalb der Ordnung Euamoebida der Klasse Lobosea unterstellt, wohingegen die Familien Acanthamoebidae und Balamuthiidae innerhalb der Ordnung Centramoebida in der Klasse Variosea vereint wurden. Beide Klassen wurden in das Subphylum Protamoebae gestellt.

Die hier angewendete und derzeit gültige Klassifizierung wurde nach ADL et al. (2005) modifiziert wobei die Amöben drei verschiedenen Phyla zugerechnet werden: den Amoebozoa, Excavata und Rhizaria (Abb. 2). Das Schema von ADL basiert sowohl auf Ergebnissen aus der Ultrastrukturforschung seit 1980, als auch auf molekular-phylogenetischen Studien.

1.2 Bakterielle Endozytobionten freilebender Amöben (FLA) – historisches

Durch die Anwendung der Lichtmikroskopie war die Tatsache, dass auch Protozoen durch Parasiten infiziert sein können bereits im frühen 19. Jahrhundert bekannt. In Illustrationen wurden von Bakterien befallene „Rhizopoda“, „Mastigophora“ und „Infusoria“ von Autoren wie Müller (1856) oder Carter (1856-1857) dargestellt (SASSUCHIN 1934).

Die erste dokumentierte Beobachtung einer bakteriellen Infektion bei Amöben erfolgte 1907 durch den englischen Biologen WENYON. Bei der Untersuchung von Amöben, die er aus dem Caecum von Mäusen isoliert hatte entdeckte er kokkoide Bakterien in den Nahrungsvakuolen.

NÄGLER beobachtete 1910 bei der Untersuchung von „Limax-Amöben“ in Plattenkultur, dass „Micrococci“ die Amöben infizierten, sich in den Zellen replizierten und diese anschließend sogar lysierten.

Das Phänomen, dass parasitische Protozoen und andere Parasiten selbst parasitiert werden können wurde als „Hyperparasitismus“ bezeichnet. Biologen wie SASSUCHIN (1934), die auf diesem Gebiet Forschung betrieben, stellten fest, dass Protozoen bakterielle Parasiten wie Nahrungspartikel durch ihren „Mund“ in Nahrungsvakuolen aufnehmen, aber nicht verdauen. Auch er beschrieb den Befall von kultivierten Amöben durch Cocci, ihre Vermehrung im Zytoplasma und die anschließende Lyse der Wirtszelle.

1956 beschrieb DROZANSKI eine fatale Infektion mit obligat intrazellulären Bakterien bei Akanthamöben, die er aus dem Erdboden isoliert hatte. Die Bakterien konnten nicht ausserhalb der Amöbenzelle kultiviert werden. In weiterer Folge fand DROZANSKI heraus, dass diese Bakterien auch eine Reihe anderer Amöbenspezies infizieren konnte. 1963 isolierte DROZANSKI abermals FLA aus Erde, wobei er große Mengen an stäbchenförmigen Bakterien im Zytoplasma entdeckte, die sich in den Nahrungsvakuolen replizierten und letztendlich ihre Wirtszellen lysierten. Da sich auch diese pathogenen Bakterien nicht extrazellulär vermehren konnten, stellte er axenische Kulturen infizierter Amöben her. Durch die Herstellung gefärbter Präparate konnten die Amöbenpathogene unter dem Fluoreszenzmikroskop schließlich genauer untersucht werden.

Bakterien, die in FLA leben ohne ihre Wirtszelle zu lysieren oder von dieser verdaut zu werden, wurden zum ersten Mal 1975 von PROCA-CIOBANU et al. beschrieben. Er entdeckte die intrazellulären Symbionten im Zuge der elektronenmikroskopischen Untersuchung eines *Acanthamoeba castellanii*-Stammes.

Richtig intensiviert wurden die Forschungen an Endozytobionten freilebender Amöben erst durch ein Ereignis das zeigte, dass diese Bakterien nicht nur für ihre einzelligen Wirte pathogen sein konnten.

1976 kam es unter 182 Teilnehmern des jährlichen Treffens der US-Kriegsveteranenvereinigung („American Legion Convention“) in Philadelphia zu einem plötzlichen epidemischen Ausbruch einer schweren Pneumonie. 75% der Teilnehmer waren zwischen 40 und 69 Jahren alt und die meisten wiesen in Folge ihrer Krankengeschichte (chronische Lungenerkrankung, Arteriosklerose, etc.) eine gewisse Immunsuppression auf. 29 Patienten starben an den Folgen dieser Lungenentzündung, die als „Legionärskrankheit“ bekannt wurde (FRASER et al. 1977). Wie sich später herausstellte, war die Klimaanlage die Quelle der Infektion. Nachdem Meerschweinchen mit nekrotischem Lungengewebe eines an der Legionärskrankheit verstorbenen Patienten infiziert wurden, konnten bald darauf gramnegative Bakterien isoliert werden (MCDADE et al. 1977). Diese wurden als Erreger der Pneumonie erkannt und konnten nun auch mit sporadischen Pneumonieausbrüchen in der Vergangenheit in Verbindung gebracht werden. Zunächst konnten diese Bakterien systematisch jedoch nicht genauer zugeordnet werden. Die eigentliche Klassifizierung als *Legionella pneumophila* und die Etablierung der Gattung *Legionella* erfolgten erst 3 Jahre nach dem großen Pneumonieausbruch in Philadelphia (BRENNER et al. 1979). 1980 kultivierte ROWBOTHAM *L. pneumophila* in einem speziellen Medium und stellte aufgrund des Wachstumsverhaltens fest, dass es sich bei diesem Bakterium wahrscheinlich nicht um eine primär freilebende Spezies handelte. Da bereits bekannt war, dass sich diese Legionellenspezies in alveolären Makrophagen der Lunge vermehren, beschloss Rowbotham in-vitro Versuche mit ähnlichen Wirtszellen durchzuführen. Da Makrophagen im Prinzip amöboide Zellen darstellen, setzte er für seine Versuche *Acanthamoeba* und *Nagleria* Spezies ein, die häufig aus den gleichen Habitaten wie Legionellen isoliert wurden. So konnte er schließlich zeigen, dass sich *L. pneumophila* intrazellulär in FLA vermehrt und diese auch lysiert. Diese Erkenntnis und die nachfolgenden Untersuchungen ROWBOTHAMS (1983, 1986) lösten intensive Forschungen auf dem Gebiet der Interaktionen pathogener Bakterien und FLA aus.

1991 etablierte DROZANSKI für die 1956 erstmals von ihm beschriebenen gramnegativen, obligat intrazellulären Bakterien schließlich die neue Gattung *Sarcobium* mit der Spezies *Sarcobium lyticum*.

FRITSCHÉ et al. stellten 1993 fest, dass intrazelluläre Bakterien in FLA keine Besonderheit darstellen und „Endosymbionten“ unterschiedlichster Taxa weit verbreitet sind. Er fand bakterielle Endozytobionten in 24% aller klinischen *Acanthamoeba*-Isolate und Umweltisolate.

Es stellte sich heraus, dass die meisten Bakterien, die sich in FLA replizieren potentiell oder nachweislich Humanpathogene sind und Amöben für diese Endozytobionten als Vehikel und Reservoir in der Umwelt dienen. Aus diesem Grund wurde ab Mitte der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts, häufig die Bezeichnung „Trojanische Pferde der mikrobiellen Welt“ („trojan horses“ of the microbial world“) auf FLA angewendet (BARKER & BROWN 1994).

Bei der Untersuchung einer Trinkwasser-Hausinstallation eines Krankenhauses konnten MICHEL et al. (1995) aus 7 (7/37) auf *Pseudomonas aeruginosa* positiven Wasserproben auch *Acanthamoeba* und *Echinamoeba*-Spezies isolieren. Dabei fanden sie heraus, dass *P. aeruginosa* die FLA natürlich infiziert und sich intrazellulär repliziert, wobei die Amöben und ihre Zysten die pathogenen Bakterien vor Desinfektion durch Chlor schützen.

HOOKEY et al. (1996) beschäftigten sich mit 16S rRNA-Analyse der Legionellaceae und ordneten so *Sarcobium lyticum* (DROZANSKI 1991) als *Legionella lytica* der Gattung *Legionella* zu.

Seitdem wurde eine ganze Reihe pathogener, potentiell pathogener oder apathogener Bakterienspezies in FLA identifiziert. Dabei handelt es sich sowohl um obligate Endosymbionten, wie die von ROWBOTHAM (1983, 1986) entdeckten „*Legionella*-like amebal pathogens“ (LLAPs), die nur in Amöben kultiviert werden können als auch um fakultativ intrazelluläre Bakterien wie *L. pneumophila* oder *Burkholderia pickettii* (Tab. 2). Durch vergleichende 16S rRNA-Sequenzanalyse in Kombination mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonden konnten inzwischen die meisten dieser Endozytobionten phylogenetisch eingeordnet werden. Dabei stellte sich heraus, dass intrazelluläre Bakterien freilebender Amöben ganz neuen evolutionären Linien innerhalb der Domäne Bacteria angehören (HORN & WAGNER 2004, MOLMERET et

al. 2005, SCHMITZ-ESSER et al. 2008). Vertreter dieser neuen Gruppen finden sich bislang in den Klassen Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacteroidetes und Chlamydiae (Abb. 1), wobei viele dieser neuen Spezies mit bekannten intrazellulären Pathogenen von Mensch und Tier nah verwandt sind.

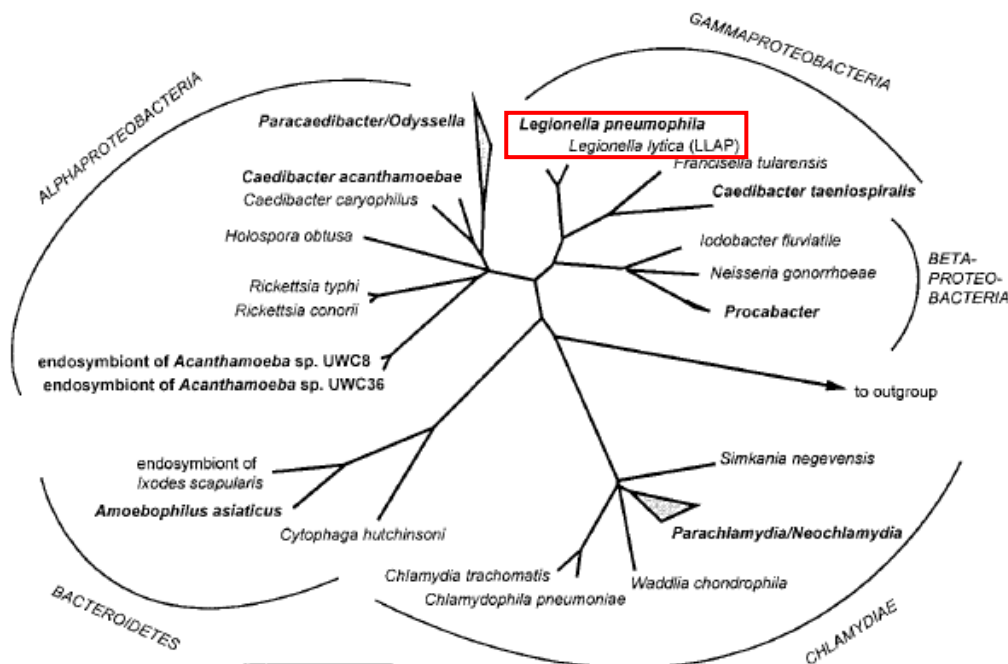


Abb. 1: Phylogenetischer Baum basierend auf 16S rRNA-Analyse: Zuordnung *L. pneumophila* und obligater endosymbiontischer Bakterien freilebender Amöben. Barren: 10% geschätzte evolutionäre Distanz, aus MOLMERET et al. (2005).

1.3 Systematik und Phylogenie der FLA



Abb. 2: Exemplarischer Stammbaum der Eukaryota unter besonderer Berücksichtigung der „Amöben“ aus WALOCHNIK & ASPÖCK (2007).

Das neu überarbeitete Phylum Amoebozoa (Abb. 2) stellt nach ADL et al (2005) die Schwestergruppe der Opisthokonta dar, welche die Gruppen der Fungi und der Metazoa umfasst. Gemeinsam bilden die beiden Phyla die Unikonta, die ein Flagellum ausbilden. Im Phylum Amoebozoa werden nun neben anderen Taxa die Lobosea und die Variosea mit den Mycetozoa, den Schleimpilzen, vereint. Nach der Klassifizierung von CAVALIER-SMITH et al. (2004) wird dabei die Familie der Hartmannellidae VOLKONSKY, 1931, den Lobosea und die Familie der Acanthamoebidae SAWYER & GRIFFIN, 1975, den Variosea unterstellt. Die mitochondrienlosen Entamoebidae werden hingegen den sogenannten „Archamoebea“ zugeordnet. Obwohl es als relativ gesichert gilt, dass die Amoebozoa eine monophyletische Gruppe bilden (CAVALIER-SMITH et al. 2004, NIKOLAEV et al. 2005, SMIRNOV et al. 2005), gibt es auch neuere Studien, die diese Theorie nur begrenzt unterstützen (YOON et al. 2008). Die Taxa innerhalb der Übergruppe Amoebozoa sind tatsächlich äußerst heterogen und ihre genetische Divergenz ist teilweise erheblich größer als zwischen Tieren und Pilzen (WALOCHNIK & ASPÖCK 2007). Trotzdem gibt es gewisse morphologische Gemeinsamkeiten der Amoebozoa wie etwa die tubulären Cristae der Mitochondrien, die Ausbildung von flachen, meist lobosen Pseudopodien im Amöbenstadium und zumeist das Fehlen eines begeißelten Stadiums.

Die Phyla Excavata und Rhizaria werden mit zwei weiteren Gruppen zu den Bikonta vereint, die im Gegensatz zu den Unikonta im Allgemeinen 2 Flagellen besitzen. Zu den Rhizaria gehören unter anderem die Foraminifera und Radiolaria, welche typische Schalen bzw. Silikatskelette ausbilden können. Die Excavata umfassen sieben Gruppen, darunter die Heterolobosea PAGE & BLANTON 1985, die ihrerseits aus drei großen Gruppen bestehen. Eine davon ist die Familie der Vahlkampfiidae, welcher auch die Gattung *Naegleria* ALEXEIEFF 1912 zugeordnet wird. Morphologisch zeichnen sich die Heterolobosea durch die Ausbildung eines zwei- bis viergeißeligen Flagellatenstadiums aus. Ihre Mitochondrien weisen typische flache, meist scheibenförmige Cristae auf. Auch andere bekannte Parasiten gehören dem Phylum Excavata an, wie z.B. *Giardia*, *Trichomonas*, *Leishmania* oder *Trypanosomas*. Die bis vor kurzem gültige Meinung, dass es sich bei den Excavata um die primitivsten Vertreter der Eukaryota handelt, ist inzwischen so gut wie widerlegt. Vermeintlich archaische morphologische Merkmale wie etwa Mitochondrienlosigkeit erwiesen sich als sekundäre Anpassungen. Die neuesten molekularbiologischen Daten weisen darauf hin, dass diese Gruppe großteils monophyletischen Ursprungs ist und sogar nahe an die Basis der Eukaryoten zu stellen ist (HAMPL et al. 2009). Das bedeutet, dass alle Eukaryota das erste Endosymbiose-Ereignis durchmachten und ursprünglich Mitochondrien besaßen, die Abspaltung der Excavata aber früher erfolgte als bei den anderen 5 Phyla (DACKS et al. 2008).

Vormals als primitiv geltende und für die Taxonomie genutzten Merkmale wie das Vorhandensein eines mehrgeißeligen Flagellatenstadiums oder eine anaerobe Lebensweise, erwiesen sich als sekundäre hochspezialisierte Anpassungen, insbesondere an die parasitische Lebensweise (EMBLEY & MARTIN 2006).

Der Begriff „Freilebende Amöben“ (FLA) wurde eingeführt, um diese von den obligat parasitischen Amöben, wie *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN 1903) abzugrenzen. Da dieser Terminus völlig unterschiedliche und nicht näher miteinander verwandte Organismen zusammenfasst, kommt ihm keinerlei systematische Bedeutung zu. Die Bezeichnung „freilebende Amöben“ eignet sich aber gut um Amöben mit vergleichbarer medizinischer Relevanz, wie etwa *Acanthamoeba* und *Naegleria* zusammenzufassen deren primärer Lebensraum die Umwelt ist (ASPÖCK 1994, WALOCHNIK & ASPÖCK 2002, WALOCHNIK & ASPÖCK 2007).

1.4 Akanthamöben, Hartmannellen und Nöglerien

1.4.1 Lebenszyklus und Morphologie

1.4.1.1 *Acanthamoeba*

Akanthamöben treten in 2 verschiedenen Stadien auf: als vegetatives Trophozoiten- oder Fressstadium (Abb. 3A) und als Zystenstadium, ihrer Dauerform (Abb. 3B, C, D). Die Trophozoiten bilden an ihrer Zelloberfläche charakteristische, lange, stachelförmige, hyaline Fortsätze, sog. Akanthopodien aus. In ihrer Größe variieren die Zellen je nach Art zwischen 15 und 50 µm. Sichtbare Zellorganellen sind der einzelne Nukleus mit dem prominenten Nukleolus, zahlreiche Nahrungsvakuolen und eine deutlich erkennbare kontraktile Vakuole. Weiters findet man Organellen, die typisch für höhere Eukaryoten sind, wie den Golgi-Apparat, glattes und raues endoplasmatisches Reticulum (ER), freie Ribosomen, Mitochondrien, Lysosomen und Mikrotubuli. Die 10 bis 25 µm großen Zysten sind doppelwandig, wobei die Endozyste mit „Endozystenarmen“ die Ektozyste an den charakteristischen Poren berührt, welche jeweils durch ein Operculum verschlossen sind. Die Endozyste kann rund, polygonal oder sternförmig sein (Abb. 3B, C, D) und die Zahl der Endozystenarme ist variabel. Dennoch werden diese Merkmale zur Speziesdifferenzierung herangezogen. Die Ektozyste hat eine faltige Struktur und kann Vertiefungen an den Poren aufweisen, welche auch als Ostiole bezeichnet werden (PAGE & SIEMENSMA 1991).

Die Gattung *Acanthamoeba* wurde von PUSSARD & PONS (1977) aufgrund der Morphologie und Größe der Zysten in drei Gruppen unterteilt. Basierend auf diesen morphologischen Kriterien wurden bislang 24 *Acanthamoeba*-Arten identifiziert (Abb. 3B, C, D, Tab. 1).

Tab. 1: Klassifizierung der Acanthamoeba-Spezies nach PUSSARD & PONS (1977), aus WALOCHNIK & ASPÖCK (2002), modifiziert nach MARCIANO-CABRAL & CABRAL (2003).

I	II	III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. divisionensis</i>	<i>A. healyi</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. griffini</i>	<i>A. jacobsi</i>
<i>A. pearcei</i>	<i>A. hatchetti</i>	<i>A. lenticulata</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. palestinensis</i>
	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. paradiisionensis</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. polyphaga</i>	
	<i>A. quina</i>	
	<i>A. rhyodes</i>	
	<i>A. stvensoni</i>	
	<i>A. triangulairs</i>	

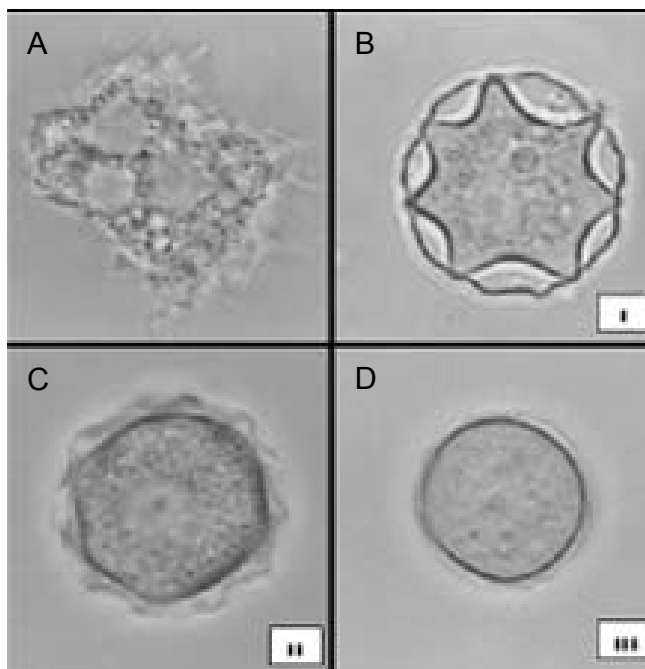


Abb. 3: Acanthamoeba Trophozoit (A) und Zysten: Gruppe I (B), Gruppe II (C), Gruppe III (D), aus WALOCHNIK & ASPÖCK 2002.

Da jedoch eine Bestimmung bis zum Art-Niveau, basierend auf rein morphologischen Kriterien unzureichend erscheint, ist die Validität dieser 24 Spezies umstritten. Die Gruppeneinteilung hingegen hält durchaus auch den molekularbiologischen Untersuchungen stand (BOOTON et al. 2005).

Die morphologische Gruppe I zeichnet sich durch sehr große Trophozoiten und Zysten aus. Der mittlere Durchmesser der Zysten beträgt mehr als 18 μm . Die Ektozyste hat eine glatte Struktur und ist deutlich von der Endozyste abgegrenzt. Die Endozyste bildet durch

mindestens 5 Endozystenarme eine mehr oder weniger sternförmige Struktur (Abb. 3B). Die Opercula sind nicht in die Ektozyste eingesenkt. Die Vertreter der Gruppe I gelten bislang als nicht pathogen.

Gruppe II beinhaltet die meisten *Acanthamoeba*-Spezies und ist auch jene Gruppe, die am häufigsten isoliert wird. Der Zystendurchmesser liegt meist unter 18 µm. Die Ektozyste ist oft weit von der Endozyste getrennt, kann dick oder dünn sein und ist zumeist faltig. Die Endozyste hingegen ist in ihrer Form sehr variabel und kann rund, oval, dreieckig oder auch sternförmig sein (Abb. 3C). Die Opercula liegen meist in Vertiefungen.

Die Zysten der Gruppe III weisen ebenfalls einen Durchmesser unter 18 µm auf. Die sehr dünne Ektozyste und auch die Endozyste sind meist rundlich und liegen nah beieinander (Abb. 3D).

1.4.1.2 *Hartmannella*

Hartmannellen weisen ebenso wie die Acanthamoeben einen Wechsel zwischen Trophozoiten- und Zystenstadium auf. Die nicht eruptiven Trophozoiten haben eine zylindrische Form und sind oftmals viermal so lang wie breit, in einem Größenbereich von 16-37 µm. Sie sind monopodial und bilden meist keine Pseudopodien aus (Abb. 4A). Deutlich zu sehen ist eine hyaline Kappe am Vorderende und manchmal mehr als eine kontraktile Vakuole. Der einzelne Zellkern besitzt einen zentralen Nukleolus.

Die rundlichen Zysten der Gattung *Hartmannella* sind mit einem Durchmesser von nur 4-13 µm deutlich kleiner als die der *Acanthamoeba*.

Die Zysten sind ebenfalls doppelwandig, wobei die Ekto- und Endozyste entweder teilweise getrennt sind oder so nah aneinander liegen, dass es den Anschein hat als wäre die Zystenwand nur einfach. Außerdem sind die Wände dünner als bei Acanthamoeben-Zysten (Abb. 4B).

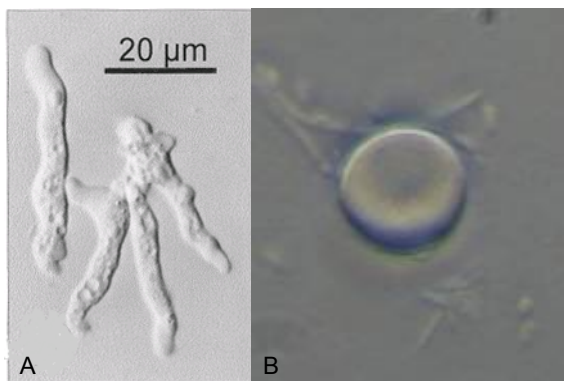


Abb. 4: Trophozoiten (A) von *Hartmannella vermiformis* (DYKOVÁ et al. 2005) und Zyste (B) von *Hartmannella* sp. (orig.).

1.4.1.3 *Naegleria*

Näglerien weisen zusätzlich zum Trophozoiten- und Zystenstadium (Abb. 5A, B) noch ein zweigeißeliges Flagellatenstadium (Abb. 5C) auf. Dieses geht unter bestimmten ungünstigen Bedingungen wie einem plötzlichen Abfall der Elektrolyten und Nahrungsmangel vorübergehend aus den amöboiden Trophozoiten hervor. Solche Bedingungen für Flagellaten herrschen z.B. in destilliertem Wasser oder treten beim Auswaschen des Bodens durch Regen auf. Diese Form teilt sich nicht und nimmt keine Nahrung auf, sondern dient der raschen Verbreitung. Die durchschnittliche Länge der Flagellaten beträgt 15 bis 20 µm und ihre Gestalt ist oft birnenförmig. Die amöboiden Formen sind zylindrisch, zwischen 7 und 35 µm lang, mit einem breiten Vorderende und einem schmaler zulaufenden Hinterende (Uroid). Mehrere kontraktile Vakuolen sind sichtbar. Sie bewegen sich eruptiv mit einer Fortbewegungsgeschwindigkeit von mehr als der vierfachen Körperlänge pro Minute und sind damit meistens schneller als andere kleine Amöben (z.B. Hartmannellidae). Außerdem machen sie im Gegensatz zu den sonst sehr ähnlich anmutenden Hartmannellen eine promitotische Zellteilung durch. Die Trophozoiten stellen das infektiöse Stadium dar. Nur diese Form kann sich unter widrigen Umweltbedingungen in eine Zyste umwandeln, aus welcher nach der Exzystierung wiederum ein Trophozoit frei wird. Die Zysten der Näglerien sind rundlich bis oval und haben je nach Art einen Durchmesser von 7 bis 19 µm. Sie sind doppelwandig und bestehen aus einer dicken Endozyste und einer dünnen, anliegenden Ektozyste. Die Zystenwand kann je nach Art eine raue, glatte oder eckige Oberfläche aufweisen, wobei die Poren typischerweise zugestopft sind. Näglerien sind normalerweise einkernig, können aber auch einen oder mehrere überzählige Kerne besitzen. Sowohl bei den Trophozoiten als auch bei den Zysten ist bei den meisten Arten deutlich zu sehen, dass der Nukleus von einer perinukleären Schicht grober Körnchen umgeben ist (Abb. 5B).

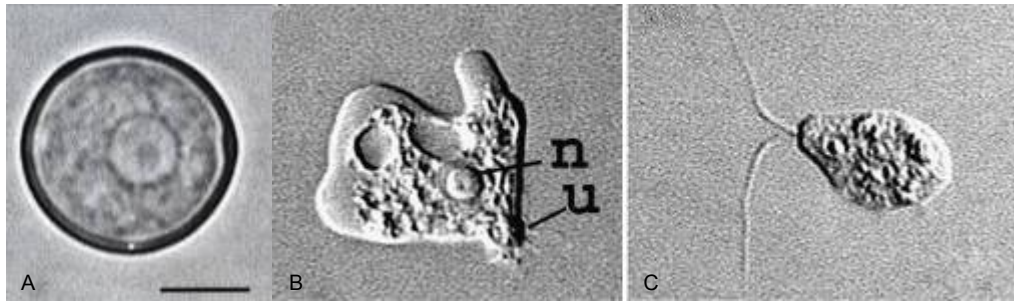


Abb. 5: Zyste von *Naegleria* (A). Messbarrren: 10 μm (WALOCHNIK & ASPÖCK 2002), *Naegleria fowleri* Trophozoit (B) und Flagellat (C). n=Nukleus, u=Uroid. Beide Bilder x 1000. (VISVESVARA et al. 2007).

1.4.2 Ernährung

Die Art der Fortbewegung ist bei allen Amöben eng mit dem Vorgang der Nahrungsaufnahme verbunden. Diese erfolgt nur im Trophozoitenstadium meist über Pseudopodien und stellt eine typische Phagozytose dar. Potentielle Nahrungsorganismen sind Bakterien, Algen, Hefen oder Pilze, die zunächst mit der Amöbenzelle in Kontakt kommen. Dies führt zu einer Invagination der Zellmembran wodurch ein Phagosom entsteht, welches mit einem Lysosom fusioniert. Die darin enthaltenen Lysozyme führen schließlich zum Verdau der aufgenommenen Nahrung. Die Exkretion und die Regulation des Wasserhaushaltes erfolgen hingegen über die Füllung und Entleerung der pulsierenden Vakuolen. Zusätzlich kann auch die Aufnahme von in Flüssigkeit gelösten Nährstoffen durch Pinozytose erfolgen.

Eine besondere Form der Nahrungsaufnahme – typisch für die Vertreter der Gattung *Acanthamoeba* und auch *Naegleria* – ist die Ausbildung sogenannter "food cups". Dabei handelt es sich um temporäre Strukturen an der Zelloberfläche über die Nahrungsorganismen oder Gewebe des infizierten Wirts aufgenommen (MARCIANO-CABRAL 1988) und anschließend wieder in Phagolysosomen verdaut werden (MARCIANO-CABRAL & CABRAL 2003).

1.4.3 Ökologie und Verbreitung

Akanthamöben, Hartmannellen und Näglerien sind ubiquitäre, primär frei lebende, aerobe Protozoen und ausgesprochene Kosmopoliten. Sie besiedeln vor allem Feuchthabitate wie Teiche, Flüsse, Tümpel, Seen und feuchte Erde, wo sie aufgrund ihrer Ernährung eine wichtige Rolle in der Regulierung der Bakterienpopulation spielen. Akanthamöben sind außerdem tolerant gegenüber sehr unterschiedlichen Osmolaritäten und können daher sogar im Meer- bzw. Brackwasser oder auch destilliertem Wasser vorkommen. Aufgrund ihrer extremen Widerstandsfähigkeit gegen Trockenheit, konnten insbesondere

Zysten von Akanthamöben bereits mehrmals aus Staub, Luft und sogar aus heißem Wüstensand isoliert werden (WEEKERS et al. 1993, RODRÍGUEZ-ZARAGOZA 1994, MICHEL et al. 1995). Hartmannellen und Akanthamöben sind aber nicht nur extrem resistent gegenüber Trockenheit sondern auch gegenüber Temperaturextremen und Desinfektionsmitteln. *Acanthamoeba*-Zysten können beispielsweise Chlor-Konzentrationen von bis zu 50 mg/L überleben (KILVINGTON & PRICE 1990). Das Temperaturtoleranzspektrum innerhalb dessen die meisten FLA überleben können, reicht von über 40°C bis unter 2°C. Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass sich vor allem Vertreter der Gattungen *Acanthamoeba* und *Hartmannella* auch in künstlichen, anthropogenen Habitaten nachweisen lassen. Solche künstlichen Feuchthabitate sind etwa Trinkwasser-Aufbereitungsanlagen, Abwässer, offene Kühltürme, Hydrotherapiebecken, Schwimmbäder (CASEMORE 1977), Luftbefeuchter, Dentaleinheiten (MICHEL & JUST 1984), Kontaktlinse, Kontaktlinsen-Pflegesysteme, Augenwasch-Stationen, Sandkästen, Klimaanlage, Dialysegeräte oder sogar abgefülltes Mineralwasser (MERGERYAN 1991). Darüber hinaus wurde *Acanthamoeba* aus Pflanzen und aus einer Reihe von Tieren isoliert, so aus Fischen Amphibien, Reptilien und Säugetieren (MARCIANO-CABRAL 2003). In klinischen Proben wie humanem Hirn- und Lungengewebe, in Hautläsionen immunsupprimierter Patienten und in der Kornea des Auges konnten Akanthamöben ebenso nachgewiesen werden wie in der Nasen- und Rachenschleimhaut offensichtlich gesunder Menschen. Akanthamöben und Nöglerien werden nach PAGE (1974) auch als sogenannte „amphizoische“ Organismen bezeichnet, da sie die Fähigkeit besitzen, sowohl als frei lebende Amöben als auch als pathogene Parasiten zu existieren (siehe Kap. 1.4.4).

Die Meinungen darüber ob Spezies der Gattung *Hartmannella* ebenfalls pathogen sein können gehen bislang auseinander (siehe Kap.1.4.4). Für einige *Hartmannella*-Stämme konnte eine extrem hohe Temperaturtoleranz nachgewiesen werden. ROHR et al. gelang es 1998 vier verschiedene Stämme aus einem Heißwassersystem zu isolieren und anschließend bei 53°C zu kultivieren.

Die Gattung *Naegleria* ist zwar ebenfalls weltweit, und hauptsächlich im Süßwasser, verbreitet, aber sie wird aus oben erwähnten, künstlichen Habitaten weitaus seltener isoliert. In feuchtem Milieu können zwar auch *Naegleria*-Zysten lange Zeit überdauern, aber gegen Austrocknung und Desinfektionsmittel sind sie im Allgemeinen nicht resistent. Außerdem sind sie auch weniger tolerant gegenüber niedrigen Temperaturen. Viele Nöglerien sind thermophil, insbesondere die humanpathogene Art *N. fowleri*, deren Wachstumsoptimum bei Temperaturen zwischen 37°C und 42°C liegt. Überleben können die meisten *Naegleria*-Spezies zwar bei Temperaturen von bis zu 45°C (GRIFFIN 1972),

die Untergrenze für das Wachstum liegt aber bei ungefähr 20°C. Aufgrund ihrer Thermophilie kann man daher verschiedenste Vertreter der Gattung *Naegleria* auch aus künstlich erwärmten, jedoch unzureichend desinfizierten Gewässern, wie etwa Schwimmbädern oder Kühlwasserauslässen, isolieren.

Bislang wurden bereits über 30 Vertreter von *Naegleria*-Spezies aus Umweltproben isoliert, wobei nur die Art *Naegleria fowleri* aus dem Menschen isoliert werden konnte. Zwar können zwei weitere Spezies, *N. australiensis* und *N. italica*, unter Laborbedingungen bei Labortieren Infektionen auslösen, aber eine Assoziation mit Infektionen beim Menschen konnte bislang nicht nachgewiesen werden (DE JONCKHEERE 2002).

1.4.4 Medizinische Relevanz

CULBERTSON et al. (1958) etablierten die medizinische Relevanz dieser FLA, indem es gelang, eine Akanthamöbe (später *A. culbertsoni* benannt) als Verursacher von Meningoenzephalitis in Affen und Mäusen nachzuweisen.

Die primär freilebenden Akanthamöben und Nöglerien sind fakultativ pathogene Organismen, die durch Zufall in den menschlichen Organismus gelangen können, wo sie sich unter bestimmten Voraussetzungen vermehren und – unter Umständen sogar tödliche – Infektionen verursachen können. Die Gattung *Acanthamoeba* ist der Erreger der *Acanthamoeba*-Keratitis (AK), von Infektionen der Lunge, der Haut und anderer Organe und der Granulomatösen Amöbenenzephalitis (GAE), welche allerdings auch durch die Amöbenspezies *Balamuthia mandrillaris* verursacht werden kann. *Naegleria fowleri* ist hingegen der einzig bekannte Erreger der Primären Amöbenmeningoenzephalitis (PAME).

1.4.4.1 *Acanthamoeba*-Keratitis (AK)

Vertreter der Gattung *Acanthamoeba* können beim Immungesunden die sogenannte *Acanthamoeba*-Keratitis (AK) verursachen. Es handelt sich dabei um eine schwere Hornhaut-Entzündung, die meist posttraumatisch erfolgt und normalerweise mit dem Tragen von weichen Kontaktlinsen assoziiert ist. Diese durch Akanthamöben verursachte Keratitis wurde erstmals 1974 von NAGINGTON et al. beschrieben aber erst Mitte der 1980er Jahre wurde das Auftreten der AK auch mit dem Tragen von weichen Kontaktlinsen assoziiert, als MOORE et al. (1985) *Acanthamoeba* aus der Kontaktlinsen-Pfegelösung eines Keratitis-Patienten kultivieren konnten. In Österreich wurde der erste

Fall einer AK im Jahre 1989 von HUBER-SPITZY et al. dokumentiert. Der Trophozoit stellt das invasive bzw. infektiöse Stadium dar.

In Industrieländern tritt AK nur wenigen Fällen (10-15%) auch bei Nicht-Kontaktlinsenträgern auf (ILLINGWORTH & COOK 1998). In Entwicklungs- und Schwellenländern wie z.B. in Indien, treten dagegen durchaus AK-Fälle auf, die nicht mit dem Tragen von Kontaktlinsen assoziiert sind, sondern durch ein Kornea-Trauma oder durch Kontakt mit kontaminiertem Wasser ausgelöst wurden (SHARMA et al. 2000, 2004). Als Erreger der AK wurden verschiedene Spezies der Gattung *Acanthamoeba* beschrieben: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhysodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. griffini*. Allerdings ist keine dieser Arten grundsätzlich als pathogen einzustufen, da jede sowohl pathogene als auch apathogene Vertreter enthält (SCHAUMBERG et al. 1998, WALOCHNIK & ASPÖCK 2005). Die meisten Keratitis-Erreger gehören zwar zur morphologischen Gruppe II und zum Genotyp T4, aber auch die Genotypen T2, T3, T5, T6, T11 und T15 wurden bereits mit AK assoziiert (STOTHARD et al. 1998, WALOCHNIK et al. 2000a, KHAN et al. 2002, MAGSHOOD et al. 2005, KHAN 2006, DI CAVE et al. 2009, LEDEE 2009). Die Amöben gelangen meist über die Luft, Leitungswasser oder kontaminierte Kochsalzlösung zunächst in einen Kontaktlinsenbehälter und kommen dann durch das Einsetzen der Kontaktlinsen in das Auge, wo sie sich mit ihren Akanthopodien an die Oberfläche des Hornautepithels anheften können (NIEDERKORN et al. 1999). Über Mikroläsionen in der Kornea, die durch Reibung der Linse an der Hornhaut entstehen, können die Amöben leichter eindringen. Eine Verletzung der Hornhaut scheint aber keine Voraussetzung für die Etablierung der AK zu sein, da Akanthamöben auch aktiv in Zwischenzellräume eindringen können (BADENOCH et al. 1995, WALOCHNIK 2004, WALOCHNIK & ASPÖCK 2005).

Nach einer Inkubationszeit von einigen Tagen bis Wochen treten die ersten Anzeichen einer AK auf, wobei meistens nur ein Auge betroffen ist. Mikroerosionen des Kornea-Epithels führen zu hoher Lichtempfindlichkeit, Tränenfluss, starker Rötung und okulären Schmerzen. Diese relativ unspezifischen Symptome im ersten Stadium der Erkrankung führen oftmals zu einer Verwechslung mit einer *Herpes simplex*-Keratitis. Im nächsten Stadium treten, mikrozystische Ödeme, Trübungen des Auges und oftmals Infiltrierung des darunter liegende Stromas auf, was zu Nekrosen und schweren Entzündungen führt. Dieses klinische Erscheinungsbild ähnelt wiederum dem einer Pilz-Keratitis oder einer Adenovirus-Infektion, weshalb ebenfalls Fehldiagnosen möglich sind. Sekundärinfektionen mit Bakterien können die Diagnose zusätzlich erschweren (MARTINEZ & VISVESVARA 1997, ILLINGWORTH & COOK 1998, SCHAUMBERG et al. 1998, DART et al. 2009, in Druck). Die Infektion kann subakut bis chronisch verlaufen. Oftmals

verschwinden die Symptome monatelang ganz, nur um dann in Form eines schnell fortschreitenden, chronischen Kornea-Abszesses wiederzukehren. In dieser Phase kann ein 360° Ringinfiltrat ausgebildet sein, das ein äußerst wichtiges, diagnostisches Merkmal darstellt (ILLINGWORTH & COOK 1998). Erfolgt keine Behandlung, kommt es zur Perforation der Kornea, was schließlich zum Sehverlust oder gar dem Verlust des Auges führen kann. Wenn eine AK nicht vollständig mit geeigneten Therapeutika ausgeheilt wurde, kann es selbst nach einer Kornea-Transplantation zu einem Wiederaufflammen der Infektion kommen, da die Zysten im Stroma überdauern können (KILVINGTON et al. 1990, MARTINEZ & VISVESVARA 1997).

Bei rechtzeitiger Diagnose kann die AK erfolgreich behandelt werden. In der Therapie wird üblicherweise eine Kombination eines kationischen Antiseptikums wie Polyhexamethylen Biguanid (PHMB) oder Chlorhexidin und einem aromatischen Diamidin wie etwa Propamidin Isothionat (Brolene) empfohlen (SCHAUMBERG et al. 1998, DART et al. 2009, in Druck). Falls zusätzlich eine Koinfektion mit Bakterien vorliegt oder zu erwarten ist, wird zusätzlich mit Antibiotika wie Chloramphenicol behandelt (PEREZ-SANTONJA et al. 2003). Die Diagnose erfolgt zunächst durch lichtmikroskopische Untersuchungen von Hornhautgeschabseln oder unter Lokalanästhesie entnommenem Corneaepithel. Zusätzlich werden auch die Kontaktlinsen und Kontaklinsebehälter untersucht (ILLINGWORTH & COOK 1998).

Das übliche Verfahren ist das Inokulieren der Probe auf NonNutrient (NN)-Agar -Agar Platten mit *Escherichia coli*-Suspension (KILVINGTON et al. 1990). Wenn die Erregerdichte im Probenmaterial – vor allem bei einer Frischinfektion – zu gering ist, erfolgt ein molekularbiologischer Nachweis mittels PCR. Diese Methode ist schnell, spezifisch und hochsensitiv. Verschiedene PCR-Methoden sind etabliert (LEHMANN et al. 1998, SCHROEDER et al. 2001).

1.4.4.2 Hautläsionen und Pneumonie verursacht durch *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp., aber auch *Balamuthia mandrillaris*, können bei schwer immunsupprimierten Menschen, beispielsweise AIDS-Patienten, auch andere Infektionen verursachen. Die Infektion erfolgt über Wasser oder Luft und der Eintritt der Erreger erfolgt an den sogenannten Primärfoci (Haut oder Lunge), wo sie Hautläsionen und Pneumonien verursachen. Gelangen die Amöben von dort schließlich in den Blutkreislauf können auch andere Organe infiziert werden. Beschrieben wurden Infektionen der Bauchspeicheldrüse, der Genitalien, der Niere und außerdem Osteomyelitis,

Endophthalmitis, Otitis, Sinusitis und Infektionen des Gehirns (GAE), (MARTINEZ & VISVESVARA 1997).

1.4.4.3 Granulomatöse Amöbenenzephalitis (GAE)

Bei der Granulomatöse Amöbenenzephalitis (GAE) handelt es sich um eine chronische oder subakut verlaufende Entzündung des Gehirns und der Meningen. 1958 konnten CULBERTSON et al. bereits im Tierversuch Acanthamoeben aus den Gehirnen von infizierten Affen und Mäusen isolieren (CULBERTSON et al. 1959). JAGER & STAMM konnten 1972 erstmals bei einem Menschen den Erreger einer ZNS-Infektion als Spezies der Gattung *Acanthamoeba* identifizieren. Die erste Beschreibung der histopathologischen Mechanismen einer solchen *Acanthamoeba*-Infektion erfolgte 1980 durch MARTINEZ. Er war es auch, der den Begriff der GAE vorschlug, um diese Infektion des ZNS von der durch *Naegleria fowleri* verursachten PAME abzugrenzen.

Als opportunistische Erreger der GAE wurden bislang die Spezies *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. mauritaniensis*, *A. palestinensis*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis*, *A. royreba*, *A. divionensis*, *A. rhysodes*, *A. healyi*, *A. lenticulata*, *A. jacobsi*, *A. terricola* und *A. griffini* identifiziert (MARTINEZ & VISVESVARA 1997, WALOCHNIK & ASPÖCK 2005). Wie bei AK ist auch bei GAE T4 der vorherrschende Genotyp. Es wurden aber auch schon die Genotypen T1, T10 und T12 als Erreger der GAE beschrieben (BOOTON et al. 2005, KHAN 2006, MCKELLAR 2006).

Die Infektion erfolgt über die Lunge, durch das Einatmen von Zysten aus der Luft oder über Hautläsionen (siehe Kap. 1.4.4.2). Anschließend erreichen die Amöben über den Blutweg das ZNS. Aber auch die Nasenschleimhaut kann als Eintrittspforte für Trophozoiten dienen. Auf diesem Weg können die Amöben über das olfaktorische Neuroepithel und den Bulbus olfactorius direkt in das Gehirn gelangen (MARTINEZ 1985, MARTINEZ & VISVESVARA 1997). Dieser Invasionsweg ist jedoch eher typisch für Infektionen mit *Naegleria fowleri* (siehe Kap.1.4.4.4) und spielt bei GAE wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle.

Da es sich bei GAE um eine opportunistische Infektion handelt, sind normalerweise nur Menschen mit geschwächtem Immunsystem betroffen. Prädisponierende Faktoren können z.B. Organtransplantationen, Splenektomie, Lebererkrankungen, Nieren-Fehlfunktion, Alkoholismus, Diabetes mellitus, Tuberkulose, Steroid-Behandlung, Chemotherapie, Störung der Blutbildung und vor allem HIV-Infektion sein. GAE-Fälle bei immunkompetenten Kindern und Erwachsenen, die durch *Acanthamoeba* verursacht wurden, sind relativ selten. SINGHAL et al. etwa berichteten 2001 von 3 offensichtlich

immungesunden indischen Kindern mit chronischer Meningitis, verursacht durch *Acanthamoeba*. Ein Kind starb aufgrund nekrotisierender Granulome im Gehirn, während die beiden anderen erfolgreich therapiert werden konnten. Die wenigen Fälle von GAE bei immungesunden Kindern und älteren Menschen wurden meist mit *Balamuthia mandrillaris* assoziiert (VISVESVARA et al. 2007, DENNEY 2008).

Nach der Invasion des ZNS durch die Amöben erfolgt ihre Ausbreitung im Gehirn zentrifugal, das heißt, sie dringen von den tieferen Schichten an die Oberfläche, wobei sie das Gewebe zerstören. Die Pathomechanismen der Amöben beruhen dabei hauptsächlich auf Zytolyse, Phagozytose und dem Auslösen der Apoptose (ALIZADEH et al. 1994, KHAN 2001, KHAN 2003).

Die Symptome sind vor allem zu Beginn relativ unspezifisch. Klinische Anzeichen sind leichtes Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Verwirrung, Lethargie, visuelle Störungen, Krämpfe, Hemiparese, Nackensteife, cerebelläre Ataxie, Lähmung der Gehirnnerven, erhöhter intrakranialer Druck, Bewusstseinsstrübung und schließlich Koma (MARTINEZ & VISVESVARA 1997, MARCIANO-CABRAL & CABRAL 2003, VISVESVARA et al. 2007).

Die klinischen Symptome der GAE können bakterielle Leptomeningitis, tuberkuläre Meningitis, virale Enzephalitis, Gehirntumore oder Abszesse vortäuschen und müssen daher in der Differentialdiagnostik berücksichtigt werden (MARTINEZ et al. 1980, MARTINEZ & VISVESVARA 1997, KHAN 2006). Bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) lassen zwar Anomalien erkennen, ermöglichen aber keine definitive Diagnose der GAE (MARCIANO-CABRAL & CABRAL 2003).

Die pathologischen Erscheinungen, die mit GAE assoziiert werden, sind zerebrale Hemisphärenödeme und multifocale nekrotische Läsionen in Mittelhirn, Hirnstamm, Thalamus, Corpus callosum und Cerebellum. Außerdem wird im Cortex oft ein chronisch entzündliches Exsudat beobachtet, dass vorwiegend aus polymorphkernigen Leukozyten und mononuklearen Zellen besteht. Im nekrotischen, zerebralen Gewebe findet man sowohl Trophozoiten als auch Zysten der Akanthamöben (MARTINEZ & VISVESVARA 1997, MARCIANO-CABRAL & CABRAL 2003).

Die Krankheit entwickelt sich langsam, über Wochen oder Monate. Die Diagnose einer solchen Infektion ist schwer und die Prognose, vor allem für AIDS-Patienten, schlecht. Post mortem kann häufig eine Einbeziehung anderer Organe wie Haut, Lunge, Trachea, Leber, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Prostata, Lymphknoten, Myometrium und Knochenmark beobachtet werden (MARTINEZ & VISVESVARA 1997).

Sowohl Trophozoiten als auch Zysten der Akanthamöben sind – meist perivaskulär – im Gehirngewebe lokalisiert und oft nur postmortem in einer Biopsie nachweisbar. In

Biopsiematerial vom Gehirn oder von Hautläsionen sind die Trophozoiten und Zysten im Phasenkontrast meist gut zu erkennen. Vor allem die Zysten kann man in histologischen Schnitten durch geeignete Färbungen wie etwa Lactophenol-Cottonblue (LPCB) oder Haematoxylin-Eosin (HE) sichtbar machen. Im Liquor sind Acanthamoeben dagegen nur selten zu finden und wenn, dann in sehr geringer Dichte. Auch eine solche Probe kann gefärbt werden nachdem sie abzentrifugiert und auf einen Objektträger aufgebracht wurde.

Der direkte Erregernachweis gilt jedoch – auch bei der PAME – als einzig zuverlässiges diagnostisches Mittel. Falls kein Gewebematerial entnommen werden kann, sondern nur Liquor als Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht wird ein molekularbiologischer Nachweis durch etablierte PCR-Methoden (SCHROEDER et al. 2001) angestrebt. Mit entnommenem Liquor oder Gewebe können zusätzlich Kulturen auf NN-Agar Platten mit *E. coli* angelegt werden. Innerhalb von 12 bis 24 Stunden Inkubation bei etwa 30°C können bereits *Acanthamoeba*-Trophozoiten beobachtet werden. Die Kultur wird eine Woche lang täglich auf Acanthamoeben untersucht.

Außerdem können mit Gewebeproben Immunofluoreszenztests durchgeführt werden und im Patientenserum kann mit Hilfe indirekter Immunofluoreszenz (IIF) ein erhöhter Titer *Acanthamoeba*-spezifischer Antikörper detektiert werden. Andere immunochemische Methoden, die in der GAE-Diagnostik Verwendung finden, sind Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Western Immunoblot Analyse (MARTINEZ & VISVESVARA 1997, SCHUSTER 2002, WALOCHNIK & ASPÖCK 2005, ROCHA-AZEVEDO 2009).

Da einer GAE meist eine Immunsuppression zu Grunde liegt und diese eine rechtzeitige Diagnose zusätzlich erschwert, werden die meisten Fälle erst post mortem diagnostiziert. Eine wirklich effektive Therapie gibt es derzeit noch nicht. Bislang wurden Präparate wie Ketoconazol, orales Fluconazol, Sulfadiazin, intravenöses Pentamidin, Amphotericin B, Azithromycin oder Rifampin – teilweise auch in Kombination – verwendet. Die Therapie zeigt zwar teilweise Erfolg, hat aber auch ernste Nebenwirkungen (MARTINEZ 1991, WALOCHNIK & ASPÖCK 2002, KHAN 2006, MCKELLAR 2006). Vor kurzem wurde allerdings der erste GAE-Fall in Österreich diagnostiziert, wobei dieser Patient erfolgreich mit Miltefosin (WALOCHNIK et al. 2002) und Amikacin behandelt werden konnte (2008, AICHELBURG et al. 2008).

1.4.4.4 Primäre Amöbenmeningoenzephalitis (PAME)

1965 konnten FOWLER & CARTER erstmals nachweisen, dass Amöben der Gattung

Naegleria für Meningoenzephalitiden bei Kindern in Südastralien verantwortlich waren. BUTT (1966) schuf für diese Krankheit den Terminus „Primäre Amöben Meningoenzephalitis“ (PAM), um sie von der bei *E. histolytica*-Infektionen sekundär auftretenden Amöbenenzephalitis zu unterscheiden.

Zwischen 1962 und 1965 starben in Tschechien 16 Kinder nach dem Besuch desselben Schwimmbades. Die nachfolgenden Untersuchungen des pathologischen Gehirngewebes ergaben, dass es sich um eine massive Infektion durch „Limax-Amöben“ handelte. Diese stimmten morphologisch jedoch nicht mit einem der bekannten pathologischen *A. castellanii*-Stämme überein, sondern konnten der Gattung *Naegleria* zugeordnet werden (CERVA & NOVAK 1968).

Im Gegensatz zu pathogenen Spezies der Gattung *Acanthamoeba* handelt es sich bei *N. fowleri* um ein Humanpathogen, das auch beim Immungesunden zur Krankheit führt. Das für den Menschen infektiöse Stadium ist wie bei der Gattung *Acanthamoeba* der Trophozoit.

Die häufigsten Quellen für PAME-Infektionen sind unzureichend chlorierte, warme, künstliche Gewässer (Schwimmbäder) oder warme, stehende Gewässer wie etwa Badeteiche. Die Invasion erfolgt, indem die Näglerien durch das Wasser in die Nase und von dort über das olfaktorische Neuroepithel direkt in das Gehirn gelangen, wo sie sich zentripetal, d.h. von der Oberfläche in die tieferen Regionen, ausbreiten. Aufgrund ihres Schwimmverhaltens sind vor allem Kinder von einer PAME-Infektion betroffen.

Nach einer im Vergleich zur GAE sehr kurzen Inkubationszeit von 2 bis 7 Tagen treten die ersten Symptome auf. Diese umfassen unter anderem starke Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit und Erbrechen, bald gefolgt von Lethargie, Verwirrung und Halsstarre.

Charakteristische pathologische Erscheinungsbilder sind großflächige Gewebeschäden und Entzündungen. Die Trophozoiten lysieren und verdauen Zellen wie Erythrozyten und Nervenzellen, wodurch es zu zahlreichen örtlich begrenzten nekrotischen Hirnblutungen kommt. Die zerebralen Hemisphären sind meist stark geschwollen, was einen erhöhten intrakranialen Druck zur Folge hat. Letztendlich fällt der Patient ins Koma und stirbt nur ein bis vierzehn Tage später (MARCIANO-CABRAL & CABRAL 2007, MARTINEZ & VISVESVARA 1997).

Da die Krankheit so schnell fortschreitet und sich in der Symptomatik zu Beginn kaum von einer bakteriellen Meningoenzephalitis unterscheidet, ist eine rechtzeitige Diagnose sehr schwer. CT oder MRT zeigen eher unspezifische Läsionen. Prämortal erfolgt der Erregernachweis aus dem Liquor. Durch Phasenkontrastmikroskopie können teilweise schon in der Initialprobe die sehr beweglichen *Naegleria fowleri*-Trophozoiten oder sogar Flagellatenformen sichtbar gemacht werden. Für den direkten Nachweis von *N. fowleri*

aus klinischen Proben sind spezifische und hochsensitive PCR-Methoden etabliert worden, wie etwa eine Nested-PCR (REVEILLER et al. 2002, Schild et al. 2007) oder eine Multiplex-PCR für den simultanen Nachweis von *Acanthamoeba* spp, *B. mandrillaris* und *N. fowleri* (QVARNSTROM et al. 2006). Zusätzlich steht auch ein kommerziell erhältlicher „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) zum Nachweis von *N. fowleri*-Antigen zur Verfügung (Sparagano et al. 1993).

Üblicherweise werden postmortem Gewebebiopsien durchgeführt. Ein wichtiger Unterschied zur GAE ist dabei, dass die Näglerien im Gewebe keine Zysten bilden. Sowohl mit Biopsiematerial als auch mit Liquorproben können Kultivierungsversuche durchgeführt werden. Eine Möglichkeit ist das Aufbringen des Untersuchungsmaterials auf Säuger-Zelllinien (z.B. Verozellen, Fibroblasten) und Inkubation bei 37°C. Anwesende *N. fowleri*-Zellen vermehren sich und zerstören die Zellschicht innerhalb von 24 bis 48 Stunden. Eine andere Option ist die Kultivierung auf 1,5%, mit *E. coli* beschichteten NN-Agarplatten. Die Trophozoiten fressen die Bakterien und vermehren sich. Falls die morphologische Bestimmung jedoch nicht eindeutig ausfällt, kann der sogenannte Enflagellationstest durchgeführt werden. Hierbei wird die Kulturplatte nach 48 Stunden mit Saline überschichtet und meist schon nach einer Stunde werden unter dem Invertmikroskop Flagellatenformen sichtbar, die sich schnell fortbewegen (WALOCHNIK & ASPÖCK 2005, ROCHA-AZEVEDO 2009).

In der Therapie ist das Mittel der Wahl Amphotericin B in Kombination mit anderen Antimykotika wie Rifampin (SEIDEL et al. 1982, MARCIANO-CABRAL & CABRAL 2007, ROCHA-AZEVEDO 2009). 2005 konnten VARGAS-ZEPEDA et al. mit einer intravenösen Injektion von Amphotericin B mit Fluconazol, gefolgt von einer oralen Einnahme von Rifampin, erfolgreich ein 10-jähriges, an PAME erkranktes Kind behandeln.

Der Gattung *Hartmannella* kommt wahrscheinlich nur als Überträger tatsächlich oder potentiell humanpathogener Bakterien, insbesondere von *Legionella pneumophila*, medizinische Bedeutung zu. In manchen Studien wird insbesondere *Hartmannella vermiformis* auch als potentieller Erreger von Keratitis erwähnt (KENNEDY et al. 1995, AITKEN et al. 1996, INOUE et al. 1998). Einmal konnten diese Amöben sogar aus dem Liquor eines Patienten mit Meningoenzephalitis und Bronchopneumonie isoliert werden (CENTENO et al. 1996). De jonckheere & Brown (1998a, 1998b) hielten jedoch dagegen, dass die untersuchten Proben wohl eher mit *Hartmannella* kontaminiert waren und, dass die Pathogenität der isolierten Spezies nicht nachgewiesen wurde. Allerdings konnte *H. vermiformis* bereits aus Hautläsionen von Fischen isoliert werden und bestimmte Eigenschaften, wie etwa die hohe Temperaturtoleranz weisen darauf hin, dass es sich bei

dieser FLA um ein potentiell Pathogen handelt (DYKOVÁ et al. 2005). Bislang gibt es jedoch keinen Beweis, dass diese Amöbenattung humanpathogen ist.

1.4.5 Interaktionen mit Bakterien

Akanthamöben, Nöglerien und u.a. Hartmannellen spielen nicht nur als aktive Pathogene eine wichtige Rolle sondern auch als passive Pathogene, indem sie als Überträger einer ganzen Reihe humanpathogener Bakterien fungieren (Tab. 2). Seit DROZANSKI (1956), PROCA-CIOBANU et al. (1975) oder ROWBOTHAM (1980) ist bekannt, dass eine Vielzahl von Bakterienspezies als Endozytobionten bzw. Endosymbionten in Amöben überleben kann. Dabei sind aber grundsätzlich nicht alle Vertreter der freilebenden Amöben in gleichem Ausmaß als Wirtsorganismen geeignet. Während etwa jedes vierte *Acanthamoeba*-Isolat intrazelluläre Bakterien aufweist (FRITSCHÉ et al. 1993), findet man natürlich infizierte Nöglerien eher selten (MICHEL et al. 2000, Declerck et al. 2005). Meist gelangen die Bakterien im Zuge der Nahrungsaufnahme durch Phagozytose in die Zelle, wo sie durch Verschmelzung der phagozytotischen Vakuolen mit Lysosomen schließlich verdaut werden. Neben Bakterien, die als Nahrung dienen und einigen obligat intrazellulär lebenden Bakterien, gibt es auch eine ganze Reihe von Bakterienspezies, die in der Lage sind die Phagozytose durch eine Amöbenzelle zu überleben (Tab. 2). Solche Organismen haben Mechanismen entwickelt, um die Phagosom-Lysosom-Verschmelzung zu verhindern oder aus der phagozytotischen Vakuole auszubrechen und im Zytoplasma weiter zu leben (FRITSCHÉ et al. 1993). Wie auch aus Tab. 2 ersichtlich ist, verfolgen diese fakultativen Endozytobionten in der Wirtszelle drei grundsätzliche Strategien: Vermehrung und anschließendes Lysieren der Amöbenzelle (z.B. *Legionella* spp., *Listeria monocytogenes*), Vermehrung ohne Zellyse (z.B. *Vibrio cholerae*) oder Überleben ohne Vermehrung (z.B. *Mycobacteria leprae*). Die Vermehrung der pathogenen, obligat intrazellulären Bakterien wie etwa *Chlamydia*, *Coxiella*, *Mycoplasma* und *Rickettsia* kann ausschließlich in der Wirtszelle erfolgen. Dass sie nicht außerhalb ihrer Wirtszelle kultiviert werden können, erschwert ihre Identifizierung.

Die pathogenen, fakultativ intrazellulären Bakterien zu denen etwa *Brucella*, *Francisella*, *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* zählen (Tab. 2), können sich sowohl innerhalb als auch außerhalb der Amöbenzelle vermehren (ABD 2006, ISMAIL et al. 2002). Für solche Bakterienspezies stellen die FLA ein wichtiges Reservoir dar. Durch die oftmals extrem widerstandsfähigen Zysten der Amöben sind die Bakterien außerdem in der Lage, selbst Umweltbedingungen zu überleben, die für sie normalerweise letal wären, so z.B. die Einwirkung von Desinfektionsmitteln und

Antibiotika. Die ubiquitären Amöben mit ihren widerstandsfähigen Zysten sind daher für solche Endozytobionten sehr geeignete Vehikel für ihre Verbreitung in der Umwelt und spielen oftmals als Vektoren eine Rolle in der Übertragung. Außerdem kann die Vermehrung in Amöbenzellen die Virulenz von pathogenen Bakterien steigern und neben einer Resistenz gegenüber Wasserchlorierung sogar zu einer Resistenz gegen Antibiotika führen (BARKER et al. 1995, KING et al. 1988).

Tab. 2: Endozytobiontische Bakterien in Acanthamoeben, Hartmannellen und Nöglerien, modifiziert nach BARKER & BROWN (1994), GREUB & RAOULT (2004), HORN & WAGNER (2004), SNELLING et al. (2006)

Bakterienspezies	Interaktion	Lebensweise	Wirtszelle	Pathogenität	Literaturquelle
<i>Afiplia felis</i>	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	potentiell	La Scola & Raoult 1999
<i>Amoebophilus asiaticus</i> ^b	Vermehrung	obligat intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	unbekannt	Horn et al. 2001
<i>Burkholderia cepacia</i>	Vermehrung, Zell-Lyse	extrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Marolda et al. 1999, Landers et al. 2000
<i>Burkholderia pickettii</i> *	Vermehrung, Zell-Lyse	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	potentiell	Michel & Hauröder 1997
<i>Campylobacter jejuni</i>	Vermehrung?	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Snelling et al. 2005
<i>Campylobacter coli</i>					
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Essig et al. 1997
<i>Coxiella burnetii</i>	Vermehrung	obligat intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	La Scola & Raoult 2001
<i>Cytophaga</i> sp. ^b *	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Müller K.D. et al. 1999
<i>Escherichia coli</i> O157	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Barker et al. 1999
<i>Francisella tularensis</i>	Vermehrung, Zell-Lyse	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Gustafsson 1989, Abd et al. 2003
<i>Helicobacter pylori</i>	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Winiecka-Krunell et al. 2002
<i>Legionella pneumophila</i> *	Vermehrung, Zell-Lyse	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Hartmannella</i> , <i>Naegleria</i>	pathogen	Robotham 1980
<i>Legionella</i> -like amoebal pathogens (LLAP)*	Vermehrung, Zell-Lyse	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i> <i>Hartmannella</i>	potentiell	Drozanski 1956, Adeleke et al. 2001
<i>Legionella lytica</i> * (LLAP3)	Vermehrung	obligat intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i> <i>Hartmannella</i>	potentiell	Drozanski 1991, Hookey et al. 1996
<i>Listeria monocytogenes</i>	Vermehrung, Zell-Lyse	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Ly & Muller 1990
<i>Mycobacterium avium</i>	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Krishna Prasad & Gupta 1978, Steinert et al. 1998
<i>Mycobacterium leprae</i>	Überleben	obligat intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Jadin 1975
<i>Neochlamydia hartmannellae</i> ^a *	Vermehrung, Zell-Lyse	obligat intrazellulär	<i>Hartmannella</i>	potentielle	Horn et al. 2000
Opportunistische Mykobakterien	Vermehrung, Zell-Lyse	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	potentiell	Krishnan-Prasad & Gupta 1978, Cirillo et al. 1997
<i>Paracaedibacter symbiosus</i> *	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	unbekannt	Horn et al. 1999
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> ^a *	Vermehrung, Zell-Lyse	obligat intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	potentiell	Amann et al. 1997
<i>Procabacter acanthamoeba</i>	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	unbekannt	Horn et al. 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Vermehrung	extrazellulär	<i>Acanthamoeba</i> <i>Hartmannella</i>	pathogen	Michel et al. 1995.
<i>Rickettsia</i> -like*	Vermehrung	obligat intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	potentiell	Fritsche et al. 1999
<i>Salmonella enterica</i>	Vermehrung, Zell-Lyse	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Tezcan-Merdol et al. 2004
<i>Shigella sonnei</i>	Überleben, Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	King et al. 1988
<i>Simkania negevensis</i> ^a	Vermehrung	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Kahane et al. 2001
<i>Vibrio cholerae</i>	Vermehrung	extrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	Thom et al. 1992
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Überleben, Vermehrung (auch extrazellulär)	fakultativ intrazellulär	<i>Acanthamoeba</i>	pathogen	King et al. 1988

^a Chlamydia-like, Familie Parachlamydiaceae

^b CFB-Gruppe (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides)

* Natürlich in FLA vorkommende Endozytobionten

Einige dieser endozytobiontischen Bakterien (z.B. *Chlamydia*-ähnliche und *Rickettsia*-ähnliche Bakterien) sind so nah mit humanpathogenen Bakterien (*Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp.) verwandt, dass sie als potentiell pathogen (Tab. 2) eingestuft werden müssen (HORN & WAGNER 2004).

Eine weitaus untergeordnetere Rolle als Wirte spielen FLA für andere Protozoen wie etwa die obligat intrazellulären Mikrosporidien (VIVARES 2001), die sich auch intranukleär entwickeln können. Es handelt sich um opportunistische Pathogene, die beim Menschen mit Immunsuppression, wie etwa bei AIDS-Patienten, Infektionen verursachen können (BIGLIARDI & SACCHI 2001). Aus FLA wurden allerdings nur apathogene Mikrosporidien-ähnliche Organismen isoliert (MICHEL et al. 2000). Auch das bislang größte bekannte Virus, das Mimivirus, parasitiert in FLA und wurde 2003 von LA SCOLA et al. in Acanthamoeben entdeckt.

1.5 Legionellen

1.5.1 Biologie, Phylogenie und Ökologie von *L. pneumophila*

Legionella pneumophila ist ein obligat aerobes, gramnegatives, nicht-sporenbildendes, stäbchenförmiges Bakterium. Es ist ungefähr 2-20 µm lang, 0,3-1 µm dick und kann in feuchtem Medium eine monopolare Begeißelung aufweisen (Abb. 6). *L. pneumophila* kann sich fakultativ intrazellulär sowohl in Makrophagen, Monozyten und Epithelzellen (HORWITZ 1983), als auch in FLA und Ciliaten vermehren. Da Legionellen aber auch als frei lebende Organismen existieren, lassen sie sich in Kokultur mit Amöben, insbesondere *Acanthamoeba* und *Hartmannella*, gut kultivieren. Ebenso wie FLA sind auch Legionellen ubiquitär verbreitet und daher sowohl in Biofilmen natürlicher Feuchthabitate als auch in künstlichen Habitaten, wie etwa Kühltürmen, vorzufinden. Allerdings sind sie frei lebend gegen Austrocknung und Desinfektionsmittel sehr empfindlich. Legionellen wachsen bei warmen Temperaturen zwischen 25 und 50°C, wobei die optimale Wachstumstemperatur zwischen 35°C und 37°C liegt (KATZ et al. 1987). Überleben können diese Bakterien innerhalb eines Temperaturspektrums von ungefähr 6-60°C, wobei sie bei Temperaturen über 60°C meist rasch absterben.

Im Labor kann man extrazelluläre Legionellen nicht auf bakteriologischen Standardmedien züchten, da sie obligat L-Cystein, Methionin und Eisenphosphat benötigen. Man verwendet daher für die Kultivierung „buffered charcoal-yeast extract“- (BCYE) Agar in CO₂-Atmosphäre.



Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Legionella pneumophila*. PACY, King's College London.

Legionella gehört zum Phylum der Proteobacteria (Gruppe der Gamma-Proteobacteria), zur Ordnung der Legionellales und stellt die einzige Gattung in der Familie der Legionellaceae dar. Die Gattung *Legionella* BRENNER 1979, beinhaltet derzeit 56 Spezies und drei Subspezies, welche wiederum in 71 Serogruppen unterteilt werden*. Bei *Legionella pneumophila* unterscheidet man 16 Serogruppen, wobei die Serogruppe 1 bislang mit den meisten Fällen von Erkrankungen beim Menschen assoziiert wurde. Außerdem wird diese Art auch am häufigsten aus feuchter Umgebung isoliert (MARSTON et al. 1994). Bislang wurden insgesamt 21 Legionellenspezies als pathogen eingestuft.

1.5.2 Die Rolle der FLA für die Persistenz von Legionellen in der Umwelt

In Amöben replizierte *L. pneumophila* entwickeln eine ausgesprochen hohe Toleranz gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen wie Schwankungen in der Temperatur, der Osmolarität und dem pH-Wert. Sehr wichtig im Zusammenhang mit Wasserhygiene ist die Tatsache, dass solche intrazellulär gewachsenen Legionellen eine hohe Resistenz gegen chemische Desinfektionsmittel und Biozide aufweisen (BARKER et al. 1992). FLA der Gattungen *Hartmannella* und *Acanthamoeba* sind die natürlichen Wirte der Legionellen.

-
- * http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?bnu_no=515933

Die Gattung *Hartmannella* ist wegen ihrer hohen Temperaturtoleranz die dominante FLA in Heißwassersystemen (ROHR et al. 1998). Akanthamoebenzysten sind z.T. auch in stark chloriertem Wasser zu finden, da sie äußerst resistent gegen Chlor sind (KILVINGTON & PRICE 1990). Neue in-vitro Versuche weisen darauf hin, dass gegen Chlorierung empfindlichere *H. vermiformis*-Zellen in chloriertem Wasser chlorresistente *Legionella*-Phänotypen freisetzen, allerdings in viel geringeren Mengen als *A. castellanii* (DONLAN et al. 2005, CHANG et al. 2008). Die Intrazelluläre Vermehrung z.B. in *Acanthamoeba polyphaga* erhöht wiederum die Resistenz gegen andere chemische Biozide (BARKER et al. 1992).

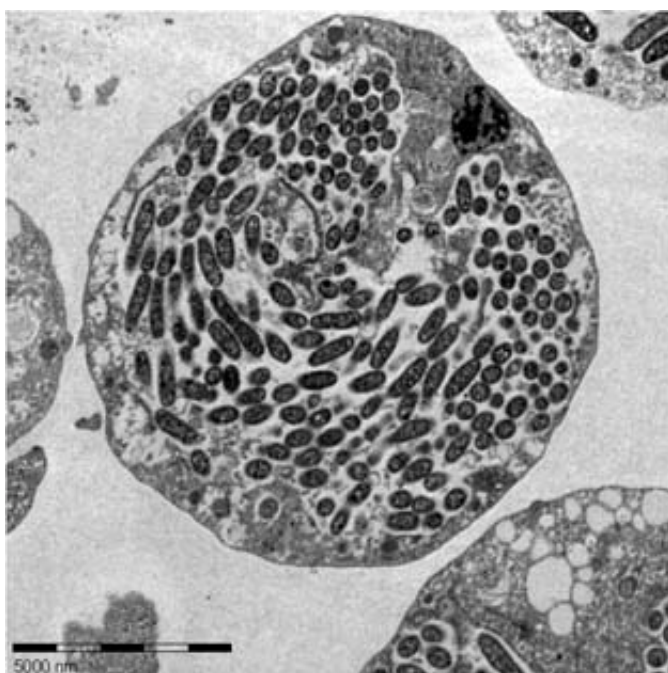


Abb. 7: *Hartmannella vermiformis* gefüllt mit *Legionella pneumophila*, Photoquelle: HOLLAND/ÖZEL, Robert Koch-Institut.

Wie sich gezeigt hat, erfordert die Infektion von Trophozoiten durch *L. pneumophila* Temperaturen von über 25°C (SMITH-SOMMERVILLE et al. 1991, OHNO et al. 2008). Bei ca. 35°C ist *L. pneumophila* in der Lage, sich intrazellulär zu vermehren und die Amöbenzelle zu lysieren (BERK et al. 1998), wohingegen die Bakterien bei Temperaturen unter 20°C von ihrer Wirtszelle verdaut werden können. Anhand von Untersuchungen von *Acanthamoeba castellanii* in Ko-Kultur fand man heraus, dass die Amöbenzellen besonders vor ihrer Enzystierung große Mengen an mit *L. pneumophila* gefüllten Vesikeln an ihre Umwelt abgeben können (BERK et al. 1998, BOUYER 2007, OHNO et al. 2008). Diese Bakterien sind jedoch ebenso in der Lage, in der Zyste zu überdauern.

1.5.3 Die Rolle der FLA für die Virulenz *L. pneumophila*

ROWBOTHAM konnte 1980 erstmals zeigen, dass sich Legionellen unter Laborbedingungen in den Trophozoiten von FLA vermehren können. In weiterer Folge postulierte er, dass FLA nicht nur ein natürliches Reservoir für diese Bakterien darstellen, sondern auch eine Rolle in der Vermehrung und Verbreitung von Legionellen in Wassersystemen spielen und schließlich auch in der Übertragung auf den Menschen. ROWBOTHAM (1980) vermutete auch richtig, dass nicht die eingeatmeten freilebenden Legionellen den Menschen infizieren, sondern inhalierte, mit Legionellen gefüllte Amöben bzw. deren ausgestoßene Vesikel. Nachfolgende, jahrelange Forschungen bestätigten schließlich, dass die Vermehrung in FLA – insbesondere in Akanthamöben und Hartmannellen – die Voraussetzung für eine Infektion durch Legionellen darstellt (ABU KWAIK et al. 1998). CIRILLO et al. konnten 1994 zeigen, dass in Kokultur mit *A. castellanii* gezüchtete *L. pneumophila* eine deutlich gesteigerte Invasivität für Epithelzellen und Makrophagen aufweisen. Bestimmte Virulenzeigenschaften der Legionellen wie Biozid- und Kälteresistenz (BARKER et al. 1992), Antibiotikaresistenz wie etwa gegen Erythromycin (BARKER et al. 1995), Motilität (ROWBOTHAM 1986) und ein invasiver Phänotyp (CIRILLO et al. 1994) werden also erst durch das Leben in der Amöbenzelle selektiert. Selbst die freigesetzten Vesikel bieten einen Schutz, da sie sowohl wiederholtes Einfrieren und Auftauen als auch Ultraschall widerstehen können (BERK 1998). Außerdem exprimieren Legionellen eine hohe Zahl an Proteinen, die starke Ähnlichkeit mit eukaryotischen Proteinen aufweisen. Diese Fähigkeit zur „molekularen Mimikry“ weist auf eine lange Koevolution mit Süßwasserprotozoen hin (CAZALET et al. 2004, BRÜGGEMANN et al. 2006).

1.5.4 Pathomechanismus

Legionella vermehrt sich intrazellulär in freilebenden Amöben ebenso wie in menschlichen Makrophagen (ROWBOTHAM 1980), wobei der Infektionsprozess nahezu derselbe ist.

1.5.4.1 Der infektiöse Zyklus in Amöben und Makrophagen

Das Besondere an der Aufnahme von Legionellen und *Legionella*-ähnlichen Bakterien durch die Amöbenzelle, ist ein Mechanismus, durch den diese Bakterien in der Lage sind, aktiv in die Amöbenzelle einzudringen. Bei Kontakt des motilen, begeißelten Bakteriums mit der potentiellen Wirtszelle kommt es zu einer rezeptorgesteuerten Endozytose. Hartmannellen und Akanthamöben führen dabei eine besondere Form der Endozytose,

die sog. "coiling phagocytosis" (Abb. 8) aus (ABU KWAIK 1996, BOZUE & JOHNSON 1996). Bei menschlichen Makrophagen, Monozyten und Epithelzellen erfolgt die Phagozytose ähnlich und wird über spezifische Rezeptoren der Komplementfaktoren C1 und C3 vermittelt. Das *Legionella*-Oberflächenprotein MOMP (major outer membrane protein), ein Porin, bindet zuerst an den C3-Rezeptor und anschließend an die Rezeptoren CR1 und CR3, wodurch die Phagozytose schließlich eingeleitet wird (PAYNE & HORWITZ 1987, BELLINGER-KAWAHARA & HORWITZ 1990).

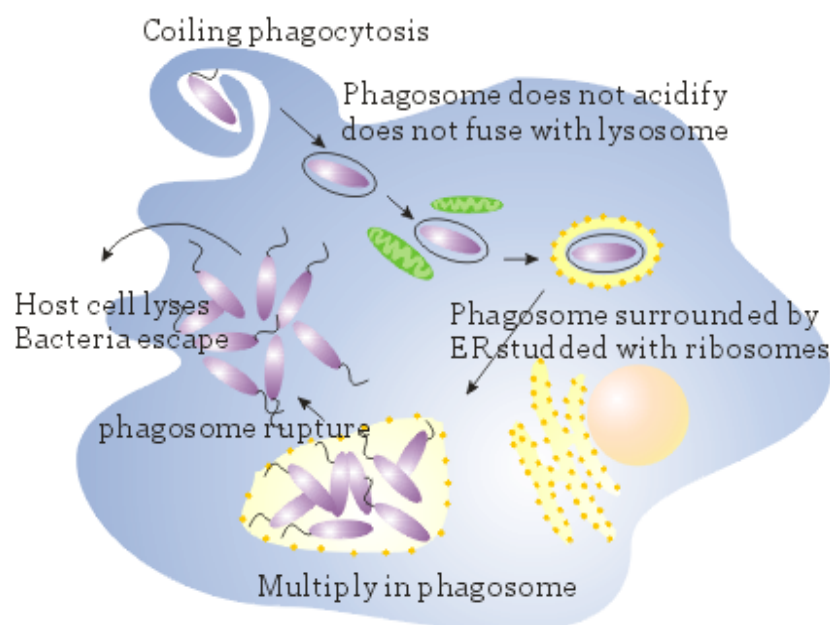


Abb. 8: Schema des Lebenszyklus von *L. pneumophila* in Makrophagen. Aus SWANSON & HAMMER (2000).

Daneben existiert auch ein Komplement-unabhängiger Mechanismus, der es *Legionella* ebenfalls erlaubt, an phagozytierende Zellen zu binden (GIBSON et al. 1994). Nach dem Eintritt in die Wirtszelle werden die Bakterien in Phagosomen aufgenommen, die von rauem endoplasmatischem Reticulum (rER) umgeben sind. Eine Lyse des Eindringlings findet jedoch nicht statt, da *Legionella* über ein spezifisches Sekretionssystem verfügt, das die Fusion des Phagosoms mit einem Lysosom unterbindet (ALBERT-WEISSENBERGER et al. 2007). Innerhalb dieser „Nische“ ihres Wirts tritt das Bakterium nun in die replikative, säureresistente und unbegeißelte Phase ein. Danach können die Legionellen aus dem Phagosom in das Zytoplasma gelangen, um schließlich ihre Wirtszelle zu lysieren.

1.5.5 Medizinische Bedeutung der Legionellen

Die Infektion erfolgt durch das Einatmen von Aerosolen unter 5 µm Größe, die mit infektiösen Bakterien gefüllt sind (FIELDS et al. 2002). Diese dringen zunächst in die Epithelzellen des Respirationstraktes ein, replizieren sich und lysieren die Zellen. Danach gelangen sie in die Alveolen wo sie von alveolären Makrophagen phagozytiert werden. Nach Durchlaufen des Zyklus (Abb. 8) zerstört *L. pneumophila* schließlich die Makrophagen. Zusätzlich werden Proteasen und Phospholipasen sezerniert, wodurch die „Legionärskrankheit“ – eine multifokale, nekrotisierende Pneumonie – entsteht. Eine weitaus mildere und selbstlimitierende Form der Legionellen-Infektion stellt dagegen das sogenannte Pontiac-Fieber dar, das auch durch andere Legionella-Arten hervorgerufen werden kann. Die Symptome ähneln denen einer Grippe mit Fieber, Müdigkeit, Kopfschmerzen wobei es zu keiner Pneumonie kommt. Die Inkubationszeit beträgt ein bis drei Tage (KAYSER et al. 2005).

Seit dem ersten bekannten Ausbruch der Legionärskrankheit 1976 (FRASER et al. 1977), wurde weltweit regelmäßig von ähnlichen Vorfällen unterschiedlichen Ausmaßes aber auch von sporadischen Infektionen in Krankenhäusern und Urlaubsorten berichtet. Die häufigsten Infektionsquellen stellen dabei Kühltürme, Wasserverteilungssysteme und Klimaanlage großer Gebäude, wie etwa von Spitälern oder Hotels, dar. Beim bislang größten Ausbruch der Legionärskrankheit wurden 2001 in Spanien ungefähr 650 Menschen infiziert (GARCIA-FULGUEIRAS et al. 2003). Die Quelle war auch hier ein Kühlturm des örtlichen Krankenhauses.

In Österreich wurden zwischen 1996 und 2008, 687 Legionella-Infektionen gemeldet. Davon wurden annähernd 16% (108/687) der Fälle im Jahr 2007 und ca. 15% (100/687) der Fälle im Jahr 2008 registriert. In beiden Jahren starben dabei jeweils 10% (11/108 und 10/100) der infizierten Menschen. Die detektierten Infektionsquellen in den Jahren 1996-2008, waren Wasserverteilungssysteme von Krankenhäusern, Campingplätzen und Hotels im In- und Ausland und verschiedene Expositionsquellen im Haushalt oder am Arbeitsplatz (AGES 2008, 2009). Im Gegensatz zu anderen europäischen Ländern, gab es in der österreichischen Industrie bislang noch keine gemeldeten Legionella-Infektionen.

In Frankreich etwa erkrankten 2003 ungefähr 86 Menschen, von denen 18 starben (NGUYEN et al. 2006). Infektionsquelle war ein industrieller Kühlturm eines Petrochemie-Betriebes. Ebenfalls über einen industriellen Kühlturm infizierten sich 2004 in Lidköping in Schweden 32 Personen, zwei davon tödlich (HJORTH et al. 2007). Auch in Norwegen kam es 2005 bei etwa 56 Menschen, die Aerosole eines industriellen Luftwäschers einer

Ligninproduktion eingeatmet hatten, zum Ausbruch der Legionärskrankheit. Dabei starben 10 Patienten (NYGÅRD 2005, NYGÅRD et al.2008).

1.6 Fragestellung

Nicht nur Thermalbäder, Hotels oder Spitäler sind regelmäßig von Legionellose-Ausbrüchen betroffen, sondern ebenso Industriezweige, in denen Arbeitsprozesse an ein System von Wasserkreisläufen gekoppelt sind. Hier ist die Gefahr des Auftretens von Legionellen in gesundheitlich bedenklichen Konzentrationen besonders groß. Infektionsquellen im industriellen Bereich stellen vor allem Kühltürme, Kondensatoren, Luftwäscher und Luftbefeuchter dar. Insbesondere in der Holz- und Papierindustrie aber auch in anderen Industriezweigen gab es in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren immer wieder Vorfälle. (siehe Kap. 1.5.5).

Papierfabriken im Speziellen versuchen schon seit langem durch Prozess-Optimierung die Abwassermengen und Schmutzfrachten zu reduzieren. Aus diesem Grund wurden sukzessive Wasserkreisläufe eingeeengt und geschlossen, wodurch die Abwassermenge teilweise stark verringert werden konnte. Eine Folge der eingeeengten Kreisläufe ist jedoch eine höhere Konzentration der organischen und anorganischen Inhaltsstoffe sowie ein Anstieg der Temperatur und in Folge dessen ein verstärktes Wachstum der Mikroorganismen.

Aus naheliegenden Gründen rückten solche wasserführenden Risikosysteme–auch in Österreich – immer mehr in den Fokus des Arbeitsschutzes und der allgemeinen Gesundheitsvorsorge. Die Allgemeine Unfallversicherungsanstalt (AUVA) initiierte daher 2007 die Untersuchung von Prozesswasser-Proben auf Legionellen aus über 2000 österreichischen Betrieben. Das Projekt wurde in Kooperation mit dem EICHEM Kompetenzzentrum für Angewandte Elektrochemie GmbH, der Hygienic Water Consulting GmbH (HWC), der Abteilung für Wasserhygiene und der Abteilung für Medizinische Parasitologie des Klinischen Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, der Medizinischen Universität Wien durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten dabei Wasserproben aus der Papierindustrie auf das Vorliegen potentieller Legionellen-Vektoren untersucht werden. Das Ziel der Studie bestand in der qualitativen Erfassung von FLA, insbesondere von *Akanthamöben*- und *Hartmannellenspezies* in Wasserproben, speziell in Legionellen-positiven Wasserproben. Näglerien sollten vor allem aufgrund ihrer Humanpathogenität zusätzlich erfaßt werden.

Folgende Arbeitsschritte waren zur Behandlung dieser Problemstellung erforderlich:

Die Filtrierung der Wasserproben und Etablierung eines geeigneten Anreicherungsverfahrens mit anschließender Kultivierung potentiell vorhandener FLA von Filtern.

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus den Reinkulturen und von Filterstanzen.

Die Detektion und morphologische Differenzierung kultivierter Amöben durch Phasenkontrastmikroskopie und die anschließende Herstellung von Reinkulturen aller detektierbaren Amöben.

Die Etablierung jeweils eines *Acanthamoeba*- und eines *Naegleria*-spezifischen PCR-Systems unter Verwendung von Primern, die im 18S rRNA Gen binden. Für die Akanthamöben-PCR sollten in der Labordiagnostik übliche, hoch sensitive Standardprimer (SCHROEDER et al. 2001) verwendet werden. Für die Nöglerien-PCR sollten die bei uns im Labor etablierten und in der Routine eingesetzten Primer verwendet werden.

Das Design von spezifischen Primern und die anschließende Etablierung eines neuen PCR-System für die Gattung *Hartmannella*. Wie auch bei *Acanthamoeba* und *Naegleria* sollte hierfür das 18S rRNA Gen als Markermolekül herangezogen werden.

Der molekularbiologische Nachweis der relevanten Amöbengenera aus den Filterstanzen mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

Die Identifizierung der aus den Kulturen isolierten Amöben durch PCR und anschließende Sequenzierung und Genotypisierung der *Acanthamoeba*-Arten.

Durch den Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Daten der Abteilung für Wasserhygiene sollte festgestellt werden, ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Legionellen und diesen Amöbenspezies besteht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Probengewinnung

Untersucht wurden die Wassersysteme von 16 Betrieben der Papierindustrie in Österreich. Es wurden insgesamt 28 Prozesswasser-Proben entnommen und auf das Vorkommen von freilebenden Amöben untersucht.

2.1.1 Wasserproben

Jeweils ein Liter Wasser wurde mit sterilen Plastikgefäßen dem Wasserkreislauf entnommen und anschließend ins Labor gebracht. Im Labor wurden von jeder Wasserprobe 100 ml über sterile Zellulose-Azetatfilter (0,8 µm Porendurchmesser, 12,5 cm² Filtrationsfläche, Sartorius Deutschland) mit einer Wasserstrahlpumpe filtriert (Abb. 9). Anschließend wurden die Filter mit einer sterilen Pinzette in sterile Petrischalen überführt. Danach wurden aus jedem Filter 3 Proben ausgestanzt (6 mm Durchmesser, Harris UNI-CORE™ Stanze) und für die DNA-Isolierung in je einem 1,5 ml Eppi eingefroren.



Abb. 9: Filtration der Wasserproben mit einer Wasserstrahlpumpe.

2.2 Referenzstämme

Die für die Etablierung der PCR verwendeten Amöbenstämme werden bereits seit Jahren in der Abteilung für Parasitologie, am Hygieneinstitut Wien, sowohl auf NN-Agar-Platten

als auch in axenischem Flüssigmedium kultiviert (Tab. 3).

Tab. 3: *Acanthamoeba*-, *Hartmannella*-, und *Naegleria*-Referenzstämme.

Stamm	Art/ morphologische Gruppe	Genotyp	Pathogenität	Herkunft	Quelle
1BU	<i>A. castellanii</i> Gr. II	T4	pathogen	Kornea-Epithel	WALOCHNIK et al. 2000b
4CI	<i>A. polyphaga</i> Gr. II	T4	apathogen	Kontaktlinsenbehälter	WALOCHNIK et al. 2000b
R04	<i>A. sp.</i> Gr. II	T4	apathogen	Donaudelta	WALOCHNIK (nicht publiziert)
N-DMLG	<i>N. clarki</i>		apathogen	Gartenteich	MICHEL et al. 1999
HC	<i>H. cantabrigiensis</i>		apathogen	Krankenhaus-Leitungswasser	WALOCHNIK 1997

2.2.1 *Acanthamoeba*-Isolate

Als Referenzstämme für die Etablierung der *Acanthamoeba*-PCR wurden die Isolate 1BU, 4CI und R04 eingesetzt (Tab. 3). 1BU wurde aus dem Kornea-Epithel eines *Acanthamoeba*-Keratitis Patienten isoliert, weshalb dieser Stamm als pathogen eingestuft wird (WALOCHNIK et al. 2000b). Das 4CI-Isolat stammt aus dem Kontaktlinsenbehälter einer asymptomatischen Person (WALOCHNIK et al. 2000b) und R04 wurde aus dem Donaudenteich isoliert.

2.2.2 *Hartmannella*-Isolat

Das Isolat HC stammt aus dem Leitungswasser eines Wiener Krankenhauses (WALOCHNIK 1997) und wurde als *Hartmannella cantabrigiensis* identifiziert (Tab. 3).

2.2.3 *Naegleria*-Isolat

Als Referenzstamm für die Detektion der Nöglerien wurde der aus einem Gartenteich isolierte Stamm N-DMLG (MICHEL et al. 1999) herangezogen (Tab. 3), bei dem es sich um die Art *Naegleria clarki* handelt (WALOCHNIK et al. 2005).

2.3 Herstellung des PYG-Mediums

Proteose-Pepton-Yeast-Glukose (PYG) ist das Standardmedium zur Kultivierung von

Akanthamöben (VISVESVARA & BALAMUTH 1975).

Die Herstellung von einem Liter dieses axenischen Flüssigmediums verlief folgendermaßen: 10 g Proteose-Pepton, 10 g Hefe Extrakt, 5 g NaCl, 0,7 g Na₂HPO₄, 0,7 g KH₂PO₄, 5 g Glukose und 10 ml Antibiotikum-Antimykotikum wurden in 990 ml ddH₂O gelöst und auf dem Magnetrührer gemischt bis das Medium klar war. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe einer 1000 ml Filterflasche steril abfiltriert und danach bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4 Kultivierung

2.4.1 Wasserproben

Für die Kultivierung der Amöben von den Filtern wurden NN-Agarplatten verwendet, die mit Hilfe eines Drigalskispatels mit einer *Escherichia coli*-Suspension beschichtet wurden. Die Zellulose-Azetat Filter wurden mit einer sterilen Pinzette, mit der Oberfläche nach unten, zentral auf den Agar aufgebracht (Abb. 10). Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und bei Raumtemperatur inkubiert. Meist waren nach spätestens 4 Tagen schon Trophozystenstadien der Amöben unter dem Invertmikroskop zu sehen. Die detektierten Amöben wurden sofort auf frische Agarplatten umgesetzt, um Reinkulturen, frei von Ziliaten und Pilzen, herzustellen. Da sich in vielen Proben unterschiedliche Amöbenspezies befanden, wurden diese nach morphologischer Unterscheidung separat umgesetzt und kloniert.

Von den zu detektierenden Gattungen *Hartmannella*, *Acanthamoeba* und *Naegleria* wurde jeweils eine Platte für die DNA-Isolierung abgeerntet und je eine Platte im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, wo die Amöben schnell wieder Zysten bildeten. Diese Platten waren für spätere, neuerliche Zellkultivierung nötig. Die für diese Studie nicht relevanten Amöbenspezies wurden nach morphologischer Identifizierung ebenfalls im Kühlschrank verwahrt.



Abb. 10: NN-Agar Platte mit Filter.

2.4.2 Referenzstämme

Die Akanthamöben-Stämme 1BU, 4CI und R04 wurden in axenischem PYG-Flüssigmedium in 75 cm² Zellkulturflaschen bei Raumtemperatur kultiviert. Dabei wurden zu 18 ml Kulturmedium 2 ml trophozoiten- bzw. zystenreiches Medium pipettiert. Nach neuerlichem Anwachsen wurde das Medium alle drei bis vier Tage gewechselt, um dem Enzystieren der Amöben vorzubeugen.

Der Nöglerien-Stamm N-DMLG und der Hartmannellen-Stamm Hc wurden auf NN-Platten mit *E. coli*-Suspension bei Raumtemperatur gezüchtet.

2.5 Morphologische Identifizierung

Eine erste systematische Zuordnung der Amöben erfolgte anhand morphologischer Charakteristika der Zysten und Trophozoiten. Die Amöben wurden zunächst auf den NN-Agarplatten unter dem Invertmikroskop differenziert. Die unterschiedlichen identifizierten Amöbenspezies wurden später noch zusätzlich unter dem Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse TE200) fotografiert. Um die Bestimmung zu erleichtern wurden Zeichnungen angefertigt und Notizen gemacht (etwa zu geschätzter Größe, Morphologie, Schleimbildung, Bewegung, einzelner oder gehäuftem Auftreten, etc.). Zur genauen Differenzierung der Amöbengattungen wurden die Bestimmungsschlüssel von PAGE und SIEMENSMA (1991) und von PATTERSON (1996) herangezogen.

2.6 DNA Isolierung

2.6.1 DNA Isolierung von den Kulturplatten

Platten mit hoher Trophozoitendichte wurden mit einem sterilen Wattestäbchen durch Abstreifen abgeerntet. Die Zellen wurden vom Wattetupfer gelöst, indem dieser in 1-5 ml physiologischer Kochsalzlösung in einem Falcon-Tube oder einem 1,5 ml Eppi abgespült wurde. Je nach Größe der Trophozoiten wurden diese bei 500 g/5 min (Akanthamöben) oder bei 800 g/5 min (Hartmannellen) abzentrifugiert. Um die DNA-Ausbeute zu optimieren, wurde das entstandene Pellet anschließend bei -20°C eingefroren und die Zellen so zum Platzen gebracht. Später wurde das Pellet dann in 200 µl PBS (100 µl bei einer Verdünnungsreihe) resuspendiert und dann, entsprechend dem „Tissue Protocol“ des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN, die Gesamt-DNA isoliert. Aufgrund der unterschiedlichen Zellgröße und Dichte der Zellkultur wurde die extrahierte Akanthamöben-DNA in 200 µl und die Hartmannellen-DNA in 100 µl AE-Puffer eluiert.

2.6.2 DNA Isolierung von den Filterstanzen

Zu den je 3 aus einem Filter ausgestanzten Proben wurden jeweils 180 µl ATL-Puffer hinzugefügt. Die DNA Isolierung erfolgte dann ebenfalls mit dem QIAamp® DNA Mini Kit, gemäß der Anleitung des „Dried Blood Spot Protocol“ (QIAGEN). Zum Schluss wurde die DNA in 100 µl eluiert

2.7 Messung der DNA-Konzentration

Um sicherzustellen, dass die für die PCR nötige Mindestkonzentration von 2 ng/µl DNA aus den Filterstanzen isoliert werden konnte, wurde die DNA-Konzentration mit einem UV/VIS Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000, 220-750 nm Spektrum, PEQLAB Deutschland) überprüft und die optimalen DNA-Mengen bei der PCR eingesetzt (Tab. 4).

2.8 Primer-Design für die Gattung *Hartmannella*

Für einen molekularbiologischen Nachweis von Amöben der Gattung *Hartmannella* aus den Wasserproben musste zuerst ein geeignetes PCR-System entwickelt werden. Das Ziel war daher das Design von spezifischen Primern, die im 18S rRNA-Gen binden

sollten. Dieses Gen stellt ein geeignetes Markermolekül dar, da es stark konserviert ist und in hoher Kopienzahl vorliegt.

Zu diesem Zweck wurden 18S rRNA-Sequenzen der Gattung *Hartmannella* aus der NCBI (National Center for Biotechnology Information) -Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) heruntergeladen, die geeigneten Sequenzen in das FASTA-Format konvertiert und als Textdatei gespeichert. Die Dateien wurden für den Sequenzvergleich in das Programm ClustalX (THOMPSON et al. 1997) importiert, und ein multiples Alignment der Sequenzen erstellt. Mit dem Programm GENEDOC (NICHOLAS et al. 1997) wurden die alinierten Sequenzen manuell nachbearbeitet und ein optimaler Primerbereich gesucht. Die benötigten Regionen sollten möglichst stark konserviert sein und hohe Basenübereinstimmung zwischen den ausgewählten *Hartmannella*-Sequenzen aufweisen. Bei der Auswahl des Primers wurde außerdem auf ein ausgewogenes GC- und AT-Verhältnis geachtet, und die Länge der Primer sollte 18 bis 22 Basenpaare betragen. Weiters war darauf zu achten, dass am Beginn und am Ende der Primer-Sequenzen ein bis zwei GC-Paare stehen und die Schmelztemperaturen der beiden Primer ungefähr gleich sind.

Zur Entwicklung des Primerpaares wurden folgende 18S rRNA-Sequenzen aus der NCBI-Genbank herangezogen (Abb.11):

Hartmannella vermiformis (Genbanknr.: DQ084366, DYKOVA et al. 2005 und Genbanknr.: AF426157, WALOCHNIK et al. 2002), *Hartmannella cantabrigiensis* (Genbanknr.: AY294147, NIKOLAEV et al. 2005) und *Hartmannella abertawensis* (Genbanknr.: DQ190241, KUIPER et al. 2006).

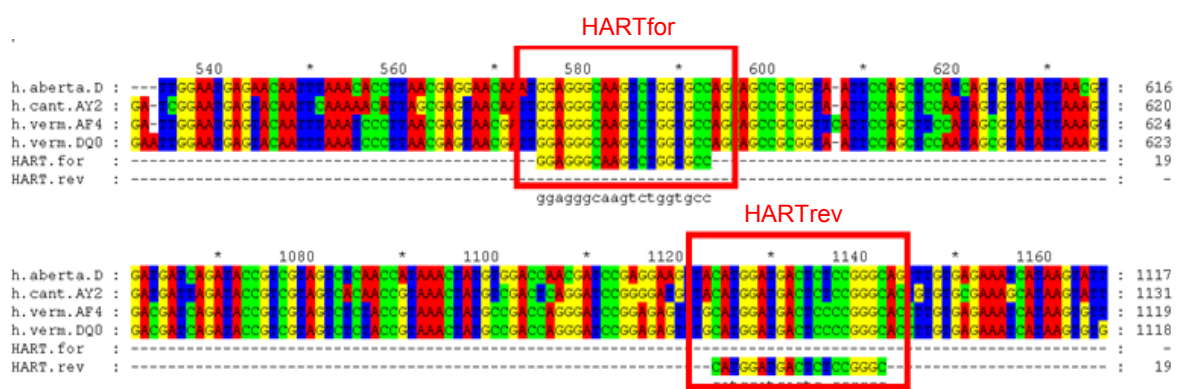


Abb.11: Position der *Hartmannella*-Primer im 18S rRNA-Gen.

Der unspezifische Vorwärtsprimer HARTfor 5'-GGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3' bindet ungefähr zwischen den Basen 559 und 578 und der spezifische Rückwärtsprimer

HARTrev 5'-GCCCGGAGAGTCATCCATG-3' bindet zwischen den Basen 979 und 997.

Die Schmelztemperatur (T_m) des HARTfor-Primers beträgt 63,1°C und die T_m des HARTrev-Primers liegt bei 61°C. Die Länge der beiden Primer beträgt jeweils 19 Basenpaare (bp). Die Annealing-Temperatur der Primer errechnet sich aus der Formel $T_a = (T_{m1} + T_{m2}/2) - 5$ und beträgt 57°C. Die mit diesen Primern amplifizierte Sequenz sollte eine Länge von 520 bp aufweisen.

Mit dem NCBI BLAST-Programm wurde die Ähnlichkeit der Primer-Sequenzen mit allen Sequenzen der Genbank verglichen und so ihre Spezifität überprüft. Auch mögliche Bindungen von HARTfor an HARTrev wurden so ausgeschlossen. Die entwickelten Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (<http://www.eurofinsdna.com>) bestellt.

2.9 Etablierung der PCR

2.9.1 Titrations-PCR

Zunächst wurde für jeden Referenz-Stamm (Tab. 3) eine Verdünnungsreihe von 10^5 bis 1 Zelle/ml hergestellt und anschließend mit der daraus isolierten DNA die jeweils optimale DNA-Menge für die Zellkultur-PCR austitriert (z.B. 1, 3, und 5 µl DNA pro Zell-Verdünnungsstufe). Als Negativkontrolle wurde ddH₂O verwendet und als Positivkontrolle fungierten die jeweiligen Referenzstämme.

Für die Etablierung des PCR-Nachweises von den Filterstanzen wurde zunächst die isolierte DNA aus einer filtrierten Test-Verdünnungsreihe verwendet. Dabei wurden jeweils 100 ml H₂O mit 10^3 , 10^4 und 10^5 Zellen des 1BU-Stammes filtriert. Pro Verdünnungsstufe wurden je 1 und 5 µl isolierte DNA in die PCR eingesetzt. Da der PCR-Nachweis von den Filtern der Wasserproben zu keinem Ergebnis führte, wurde die PCR anschließend noch einmal direkt mit den Proben etabliert. Dabei wurden die in Tab. 4 angeführten DNA Mengen eingesetzt.

Tab. 4: DNA-Konzentrationen und bei der PCR eingesetzte DNA-Mengen.

DNA-Konzentration (ng/μl)	Bei der PCR eingesetzte DNA-Menge (μl)
< 3 ng/μl	10 μl
3 - 7 ng/μl	5 μl
7 - 18 ng/μl	3 μl
> 18 ng/μl	1 μl

Für die Herstellung des PCR-Mastermixes für einen 50 μl Ansatz wurden 5 μl MgCl₂-freier Puffer (Solis Biodyne, 10x), 5 μl MgCl₂ (Solis Biodyne, 25 mM), 11 μl ddH₂O, 1 μl dNTP-Mix (Solis Biodyne, 20 mM each), 5 μl Primer I (1:10 verdünnt, 1 μM), 5 μl Primer II (1:10 verdünnt, 1 μM) und 0,25 μl Polymerase (Solis Biodyne, 5 U/μl) durchgemischt und kurz abzentrifugiert. Zu 31,25 μl Mastermix wurde die entsprechende DNA-Menge pipettiert und dann mit ddH₂O auf ein Volumen von 50 μl aufgefüllt.

2.9.2 *Acanthamoeba*-PCR

Für den molekularbiologischen Nachweis der Acanthamoeben aus der Zellkultur, wurden die Primer JDP1 und JDP2 (SCHROEDER et al. 2001) verwendet, da diese sich in der Diagnostik schon bewährt haben. Der Vorwärtsprimer JDP1 5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3' und der Rückwärtsprimer JDP2 5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3' binden im 18S rRNA-Gen und liefern das Amplimer ASA.S1 (*Acanthamoeba*-specific amplimer S1, nach SCHROEDER et al. 2001) von etwa 423 bis 551 bp Länge, abhängig vom Sequenztyp. Für die PCR mit der isolierten DNA von den Kulturplatten wurden jeweils 1 und 3 μl DNA eingesetzt. Als Positivkontrolle diente A+, ein mit den JDP-Primern amplifiziertes und anschließend kloniertes DNA-Stück aus dem 18S rRNA-Gen eines T4-Genotypen. Das verwendete PCR-Programm umfasste 45 Zyklen mit jeweils 1 min/95°C, 1 min/60°C und 2 min/72°C.

Um die JDP-negativen Proben durch Sequenzieren auf Acanthamoeben zu überprüfen, wurde die PCR zusätzlich mit folgenden Primerpaaren wiederholt:

Primer P1fw (5'-CAAGTCTG GTGCCAGCAGC-3') und P2rev (5'-GACTACGACGGTATCTGATC-3') von WALOCHNIK et al. (2004).

Primer SSU1 (5'-CGACTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3') von GAST et al. (1994) und

P1rev (5'-GCTGCTGGCACCAGACTTG-3') von WALOCHNIK et al (2004).

Bei beiden Primerpaaren wurde jeweils das PCR-Programm „Gastb54“ (1 min/95°C, 2 min/54°C, 3 min/72°C) angewendet. Alle 4 Primer sind sog. Universalprimer, die im 18S rRNA-Gen diverser FLA, Pilze oder sogar Bakterien binden können.

Da sich die JDP-PCR als ungeeignet für den Akanthamöben-Nachweis von den Filterstanzen erwies, wurde zusätzlich eine Nested-PCR etabliert. Bei der ersten PCR wurden die Primer JDP1 und P3rev 5'-CTA AGG GCA TCA CAG ACC TG-3' (WALOCHNIK et al. 2004) eingesetzt. Nach 30 Zyklen (1 min/95°C, 2 min/52°C, 3 min/72°C) entstehen Amplimere von mehr als 800 bp Länge, da die Primer weit außerhalb des gesuchten Bereichs binden.

Mit dem ersten PCR-Produkt wurde eine zweite PCR mit den Primern P2fw 5'-GAT CAG ATA CCG TCG TAG TC-3' (WALOCHNIK et al. 2004) und JDP2 durchgeführt. Auch diese PCR durchläuft 30 Zyklen (1 min/95°C, 2 min/54°C, 3 min/72°C), liefert aber ein sehr viel kürzeres PCR-Produkt von nur etwa 180 bp Länge. Für den ersten PCR-Schritt wurden den gemessenen DNA-Konzentrationen entsprechende Mengen eingesetzt (Tab. 4). Im zweiten Schritt wurden dagegen jeweils 3 µl des ersten PCR-Produktes eingesetzt. Für die Nested-PCR wurden zwei Negativkontrollen benötigt. Die erste Negativkontrolle durchlief beide PCR-Schritte wohingegen die zweite Kontrolle nur bei der zweiten PCR eingesetzt wurde. Als Positivkontrolle wurde die 1:1000 Verdünnung des 4CI-Stammes verwendet.

2.9.3 *Hartmannella*-PCR

Die PCR zum Nachweis der Hartmannellen mit den neu kreierten HART-Primern, wurde zunächst mit einem Temperaturgradienten ausgetestet (51°C, 53°C, 55°C, 57°C und 58°C Hybridisierungstemperatur) und schließlich folgendermaßen etabliert:

Einmal 15 min/95°C (Aufheizen), dann 30 Zyklen mit jeweils 1 min/95°C (Denaturierung), 2 min/58°C (Hybridisierung der Primer), 3 min/72°C (Elongation) und anschließend einmal 7 min/72°C.

Für den PCR-Nachweis aus der Kultur wurden jeweils 3 und 5 µl DNA eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde der Hc-Stamm verwendet.

2.9.4 *Naegleria*-PCR

Für die Nöglerien-PCR wurde der Vorwärtsprimer Nae3-For 5'- CAA ACA CCG TTA TGA CAG GG -3' (SCHILD 2007) aus der Literatur verwendet. Der Rückwärtsprimer NII 5'- AAA TGA TCC CTA CGC AGG TT-3' hingegen ist ein Standardprimer, der in unserem Labor seit Jahren zum Nachweis von Nöglerien verwendet wird. Der PCR-Nachweis erfolgte von den Filterstanzen, wobei wiederum die der gemessenen DNA-Konzentration entsprechenden Mengen DNA eingesetzt wurden. Für die Positivkontrolle wurde der N-DMLG-Stamm (10^5 Zellen/ml) verwendet. Für die DNA-Amplifizierung erwies sich ein PCR-Programm mit 30 Zyklen mit je 1 min/95°C, 2 min/52°C und 3 min/72°C als optimal: Wie die JDP- und HART-Primer binden auch die Nöglerien-Primer im 18S rRNA-Gen, allerdings amplifizieren sie eine kürzere Sequenz von nur ungefähr 230 bp Länge.

2.10 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die in der PCR amplifizierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht.

2.10.1 Herstellung des Agarosegels

Zum Auftrennen sämtlicher PCR-Produkte wurde 2%iges Agarosegel verwendet. Je nach Probenanzahl wurden unterschiedliche Mengen Gel hergestellt. Dabei wurden entweder 50 ml 1x TAE-Puffer (0,04 M Tris-Azetat, 0,001 M EDTA) und 1 g Agarose oder 100 ml 1x TAE-Puffer und 2 g Agarose auf einem Magnetrührer zum Kochen gebracht. In das klare, leicht abgekühlte Gel wurden ca. 7 µl Ethidiumbromid-Lösung (Merck, 1% Lösung in Wasser) pipettiert und durch Schwenken verteilt. Danach wurde das Gel in die Gelkammer gegossen, der Gelkamm eingestellt und das Gel ausgekühlt, bis es hart war. Die PCR-Produkte wurden mit 10x DNA-Laufpuffer vermischt (pro 9 µl PCR-Produkt 1 µl Laufpuffer). Nachdem der Kamm aus dem erhärteten Gel entfernt wurde, wurden die Proben in aufsteigender Konzentration aufgetragen. In den ersten Slot wurden 20 µl Größenmarker (Sigma USA, Step-Ladder, 17 Fragmente, 50-3000 bp, 50 µg/ml, Abb. 12) pipettiert und zuletzt wurden noch jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle aufgetragen. Das fertig präparierte Gel wurde danach in eine der Größe der Gelkammer entsprechende Elektrophoresekammer gelegt, die mit 1x TAE-Puffer befüllt war. Dabei war darauf zu achten, dass die Geloberfläche mit Puffer beschichtet war. Nachdem die

Elektrophoresekammer verschlossen und somit die Kontakte verbunden waren, wurde eine entsprechende Spannung angelegt (50 ml Gel mit 60 – 65 V, 100 ml Gel mit 85 – 90 V und 500 ml Gel mit 180 – 200 V). Durch den farblich markierten Laufpuffer konnte man feststellen, ob die Proben schon weit genug gelaufen waren und der Größenmarker schon gut aufgetrennt war. Unter UV-Licht konnte schließlich der Erfolg der Amplifikation überprüft und gegebenenfalls fotografiert werden. Die ungefähre Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch Vergleich mit dem Step-Ladder-Größenmarker bestimmt (Abb. 12).

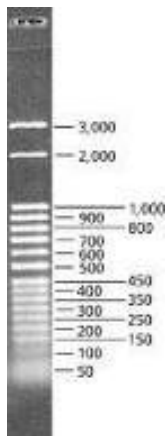


Abb. 12: DNA-Marker (Step-Ladder, Sigma USA).

2.11 Aufreinigen der PCR-Produkte

Die DNA-Banden der PCR-Produkte wurden zunächst unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppi überführt. Bei schwachen Banden, also geringer DNA-Konzentration, wurden 2 bis 3 Banden derselben Probe zusammengeführt und gemeinsam aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare UK). Dabei wurden die PCR-Produkte je nach Stärke der Banden in 15 bis 50 µl Elutions-Puffer aufgenommen.

2.12 Sequenzieren

Mit den aufgereinigten PCR-Produkten wurde eine Sequenzier-PCR durchgeführt. Für jeden Sequenzier-PCR-Ansatz wurden jeweils 1 µl von einem Primer (Vorwärts- oder Rückwärtsprimer, 10 pmol), 2 µl AB-Mix (Applied Biosystems UK, BigDye® Terminator) und 1 bzw. 3 µl aufgereinigtes PCR-Produkt in einem PCR-Eppi vermischt und mit ddH₂O

auf 10 µl aufgefüllt. Die PCR wurde mit 30 Zyklen (96°C/ 30 sek., 50°C/ 15 sek., 60°C/ 3 min) durchgeführt. In weiterer Folge wurde wiederum das Sequenzier-PCR-Produkt aufgereinigt. Um die DNA zu präzipitieren wurden Sequenzier-Eppis mit je 1 µl Natriumacetat/EDTA-Puffer (1,5 M Na-Acetate pH 8, 250 mM EDTA) in einem Kühlblock vorbereitet und die PCR-Produkte dazu pipettiert. Zu den Proben wurden jeweils 33 µl 100%iger Ethanol gegeben und anschließend mindestens 17 min gekühlt. Danach wurde bei 4°C (12000 g/30 min) zentrifugiert und der Überstand rasch verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 70%igem Alkohol gewaschen und nun entweder für später eingefroren, oder die Proben wurden sofort wieder abzentrifugiert (12000 g/10 min). In diesem Fall wurde der Alkohol wieder abpipettiert und die Eppis ca. 5 min zum Trocknen der Pellets offen stehen gelassen. 20 µl Sequenzierreagenz (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Österreich) wurden auf das Pellet pipettiert und die Eppis wurden wieder 5 min offen stehen gelassen. Danach kochte man die Proben 5 min bei 95°C im Thermomixer auf und stellte sie anschließend 5 min auf Eis. Zum Schluss wurden die Deckel der Eppis abgeschnitten und die Proben in den Sequenzierer eingestellt. Bei dem verwendeten Sequenziergerät handelt es sich um einen ABI PRISM 310® (PE Applied Biosystems, Langen, Deutschland), welches die Sequenzen automatisch ermittelt.

2.13 Datenbearbeitung

Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst in die Suche des NCBI-BLAST-Internetprogramms eingegeben und so mit den Sequenzen der publizierten Stämme in der Genbank verglichen. Anschließend wurde im Programm ClustalX (THOMPSON et al. 1997) mit diesen Sequenzen und der 18S rDNA unterschiedlicher Hartmannellen, Nöglerien oder Akanthamoeben-Genotypen ein multiples Alinierungsprojekt erstellt, um die Ergebnisse der Sequenzierung zu veranschaulichen. Die alinierten Sequenzen wurden wiederum in das Programm GENEDOC (NICHOLAS et al. 1997) importiert, um fehlerhafte Basenzuordnungen zu korrigieren, oder fehlende Basen zu ersetzen.

Die jeweils größte Übereinstimmung der erhaltenen Sequenz mit den entsprechenden Referenzsequenzen der Genbank wurden in % ausgedrückt.

3 ERGEBNISSE

Die isolierten FLA auf den NN-Agarplatten wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe der Bestimmungsschlüssel von PAGE und SIEMENSMA (1991) und von PATTERSON (1996) differenziert. Im Zuge dieser ersten Untersuchung der 28 Wasserproben erfolgte eine vorläufige systematische Zuordnung der detektierten Amöben, die in Tab. 5 dargestellt ist.

3.1 Erste morphologische Differenzierung

Von insgesamt 28 untersuchten Wasserproben konnten dabei in 16 Wasserproben von 11 verschiedenen Betrieben FLA gefunden werden. Die Untersuchung ergab zunächst 13 *Acanthamoeba* oder *Hartmannella*-positive Wasserproben, davon 11 *Acanthamoeba*-positive, 6 *Hartmannella*-positive und 4 Proben, die auf beide Amöbengattungen positiv waren (Tab. 5). In keiner der Proben konnte *Naegleria* detektiert werden. In 9 Proben wurden jedoch verschiedene andere freilebende Amöben entdeckt (Tab. 5), die in Abb. 13 zu sehen sind.

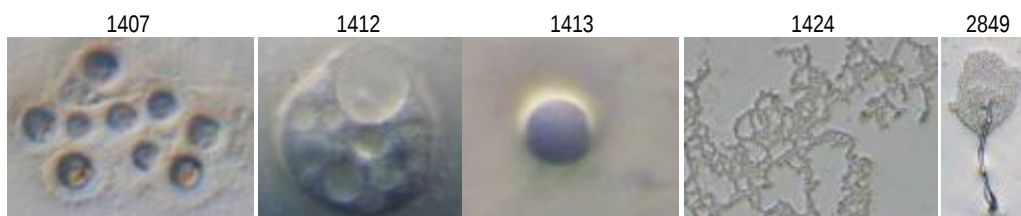


Abb. 13: Fotos diverser FLA aus verschiedenen Wasserproben. Fotografiert wurden die Amöben auf NN-Agarplatten im Phasenkontrast oder auf Objektträgern im Durchlicht. Folgende Familien und Gattungen wurden morphologisch in verschiedenen Wasserproben differenziert: Vahlkampfiidae (1407), Leptomyxiidae (1412), *Echinamoeba* (1413), Nucleariidae (1424) und ein Schleimpilz (Mycetozoa) in 2849.

Tab. 5: Morphologische Differenzierung der FLA in den 28 Wasserproben. 1 = nachgewiesen, 0 = nicht nachgewiesen, HD = Hochdruck, ND = Niederdruck, PM = Papiermaschine.

Betrieb	Proben Nr.	Probenstelle	Beschreibung	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Hartmannella</i> spp.	<i>Naegleria</i> spp.	andere FLA
1	1436	PM3 Spritzwasserbehälter	Kühlwasser für ND-Spritzrohre	0	0	0	0
2	1437	VW-Behälter PM3	Warmwasser für Spritzrohre an PM	0	0	0	0
	1438	PM2 Spritzwasserverteilerrohr	Spritzwasser	0	0	0	0
3	1410	Siebwasserbecken II		1	0	0	0
4	1421	Klarwasser 1	durch Scheibenfilter gefiltertes Prozesswasser	1	0	0	0
5	1406	Filterstation Reinwasser/RRW	Filterstation Reinwasser, Filterpatrone 1, Aufteilung ND- u. HD-Spritzrohre, Spritzwasser	1	0	0	1
	1407	Vorlagebehälter Biowasser/RRW	ND-Spritzrohr 3. Presse, ND-Spritzwasser + Schmierung für Schaber	0	1	0	1
	1413	Klarwasser, Probenehmer Zulauf Biologie	Spritzwasser	1	1	0	1
	2849*	Bioablauf		0	0	0	1
	2850*	RRW KM3 Spritzrohr, Vorlagebehälter		1	0	0	0
6	1408	Siebwasser PM7 und PM8	Verdünnungswasser	0	0	0	0
	1409	Siebwasser PM6 und PM8	Verdünnungswasser	0	0	0	0
7	1411	PM3/Siebwasserkreislauf 1	Waschwasser u. Verdünnungswasser	1	1	0	0
	1412	PM4/Siebwasserkreislauf 1	Waschwasser u. Verdünnungswasser	1	0	0	1
8	1425	Klarfiltratbütte		1	0	0	1
9	1426	Probe 2	Probe1	0	0	0	0
	1427	Probe 1	Probe2	0	0	0	0
10	1444	Spritzwasserbehälter	Spritzwasser	0	0	0	1
11	1392	Rohrleitung Spritzwasser	Ringwasser der Vakuumanlage	1	0	0	0
12	1420	Spritzwasserbehälter	aus erwärmten EK-Wasser, zur Reinigung der Siebe	1	1	0	1
	1419	Spritzwasserbehälter	im Bereich Siebpartie	0	0	0	0
13	1434	PM10 Spritzwasser	Hochdruckspritzrohr Fennsieb / Waschwasser	0	0	0	0
	1435	PM11 Spritzwasser	Warmwasserbehälter / Waschwasser	0	0	0	0
14	1428	Krofta Klarwasser PM9	Rückwasser für PM	0	0	0	0
	1429	Krofta Klarwasser PM4		0	1	0	0
15	1422	PM3 Spritzwasserbehälter	Superklarfiltrat	1	1	0	0
	1423	PM4 Spritzwasserbehälter	Frischwasser	0	0	0	0
16	1424	3 bar Pumpe, ND-Spritzrohr PM3	Spritzwasser	0	0	0	1
Gesamt	28			11	6	0	9

* 2849 und 2850 wurden zu einem späteren Zeitpunkt entnommen und entsprechen den Proben 1407 und 1406.

3.2 Kultur und Identifizierung der Acanthamoeben

3.2.1 Morphologie

Anhand der Morphologie und des Zystendurchmessers wurden zu Beginn zunächst 11 Proben als *Acanthamoeba*-positiv eingestuft (Tab. 5). Da die Ergebnisse zwischen den JDP-PCR-Durchgängen mit diesen Initialproben jedoch schwankten (Tab. 6), wurden die mikroskopischen Untersuchungen wiederholt und die Acanthamoeben mehrmals auf frische Agarplatten umgesetzt. Letztendlich konnten 7 Reinkulturen hergestellt werden (Abb. 14).

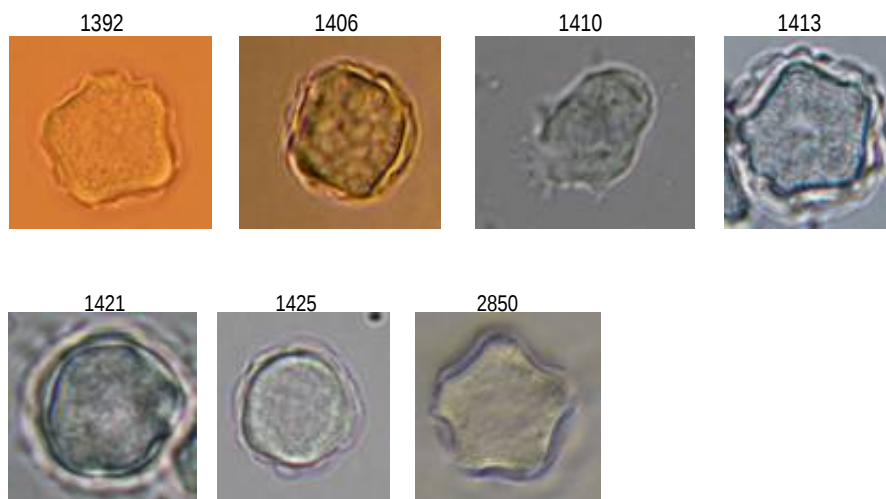


Abb. 14: Fotos der detektierten Acanthamoeben im Phasenkontrast: Zysten von *Acanthamoeba* sp. in den Kulturen der Proben 1392 (Gr. II, *A. castellanii*), 1406 (Gr. II, *A. hatchetti*), 1413 (Gr. II, *A. polyphaga*), 1421 (Gr. III, *A. lenticulata?*), 1425 (Gr. III, *A. lenticulata*) und 2850 (Gr. II, *A. polyphaga*). Das Foto der Probe 1410 zeigt *Acanthamoeba* sp. bei der Exzystierung (orig.).

Die Acanthamoeben in den verbliebenen 7 Reinkulturen wurden morphologisch genauer differenziert und fotografiert (Abb. 14). Aufgrund des Zystendurchmessers von mindestens 15 bis 18 μm und der eckigen bis polygonalen Form, wurden die Acanthamoeben der Proben 1392, 1406, 1413 und 2850 der morphologischen Gruppe II zugeordnet. Bei der etwas kleineren, rundlichen Zyste der Probe 1421 könnte es sich um die Gruppe III handeln, aber auch um eine unreife Zyste der Gruppe II. Die deutlich runde und kleinere Zyste (maximal 15 μm) der Probe 1425 wurde hingegen der Gruppe III zugeordnet. Bei der Acanthamoëbe der Gruppe 1410 war keine genauere Differenzierung möglich.

3.2.2 Molekularbiologie

Für die Genotypisierung mussten zunächst aus den 11 Initialproben (Tab. 5) Reinkulturen hergestellt und DNA isoliert werden. Dann wurde versucht das Genotyp-spezifische JDP-Amplikon mittels JDP-PCR zu amplifizieren. Das gelang trotz mehrfacher Wiederholungen nur in 5 Fällen (siehe Tab. 6).

Auf dem Agarose-Gel waren meist starke Schlieren zu sehen. Um einen Fehler in der DNA-Isolierung auszuschließen, wurden die Kulturen neu angesetzt, die DNA neuerlich isoliert und die PCR mit dem JDP-Programm wiederholt, wobei aber wieder Schlieren auftraten. Zuletzt wurden noch die Reagenzien komplett ausgetauscht und die PCR abermals wiederholt, wodurch die Schlierenbildung jedoch auch nicht vollständig verschwand.

Tab. 6: Ergebnis der JDP-PCR mit den 11 Initialproben. Die 5 grau markierten Proben waren positiv.

Probennummer	Wiederholungen	Anzahl der positiven Ergebnisse
1392	3	3
1406	3	3
1410	5	2
1411	2	0
1412	2	0
1413	5	4
1420	2	0
1421	2	0
1422	2	0
1425	2	0
2850	3	1

Gesamt: 11

Bei 5 von insgesamt 11 Proben zeigten sich zumindest in einem der PCR-Durchgänge Banden auf dem Agarose-Gel. Die PCRs mit Proben, die beim ersten oder zweiten Mal positiv waren, wurden mindestens dreimal wiederholt.

Nach neuerlicher mikroskopischer Untersuchung und Kultivierung, wurde die JDP-PCR mit den 7 verbliebenen *Acanthamoeba*-Reinkulturen (Abb. 14) 1392, 1406, 1410, 1413, 1421, 1425, 2850 wiederholt. Dabei waren 3 Proben positiv (Abb. 15).

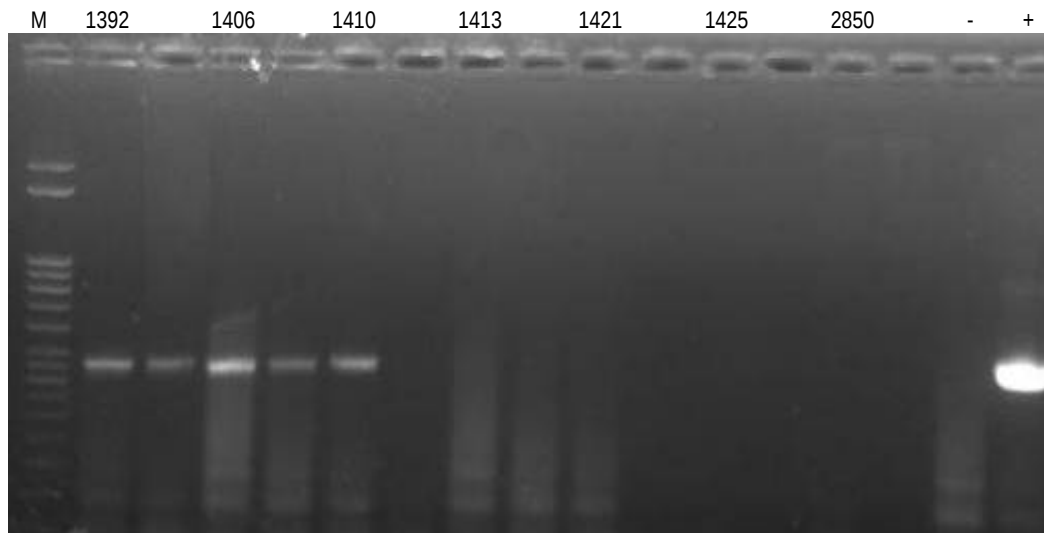


Abb. 15: JDP-PCR mit den 7 *Acanthamoeba* spp.-Kulturen. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle, + = Positivkontrolle (A+). Es wurden jeweils 1 und 3 µl in die PCR eingesetzt. 36 µl PCR-Produkt wurden auf das 2% Agarose-Gel aufgetragen. Die Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt. Die PCR der Proben 1392, 1406 und 1410 war positiv mit Banden zwischen 450 und 500 bp des DNA-Markers.

Nachdem die JDP-PCR mit allen 11 Proben mehrmals wiederholt wurde sollte die Genotypisierung der Acanthamoeben erfolgen. Die zu sequenzierenden JDP-Amplimere stammten sowohl von den Reinkulturen (1392, 1406, 1410) als auch von den Initialproben (1413, 2850). Aufgrund der Variabilität des Amplikons konnte nur eine grobe Genotypisierung erfolgen. Die DNA von 2 Proben (1392 und 1406) konnte jeweils dem *Acanthamoeba*-Genotypen T4 zugeordnet werden (siehe Kap. 3.8.1).

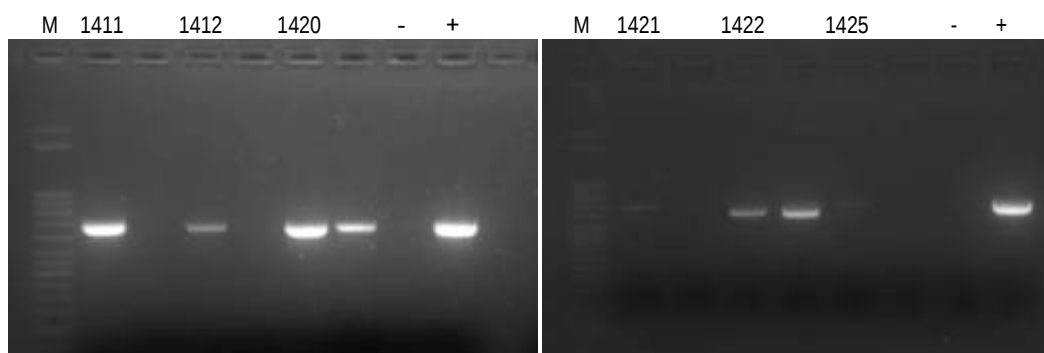


Abb. 16: PCR der JDP-negativen Proben mit den Primern SSU1 und P1rev. M = DNA-Marker, - = Negativ-Kontrolle, + = Positiv-Kontrolle (Stamm R04). Die Nummern 1411 bis 1425 sind die Probennummern. Es wurden jeweils 1 und 3 µl in die PCR eingesetzt. 40 µl PCR-Produkt wurden auf das 2% Agarose-Gel aufgetragen. Die Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt.

Um alle 11 Initialproben aus Tab. 6 zu erfassen, wurde außerdem mit den 6 JDP-negativen Proben (Tab. 6) eine PCR mit Universalprimern durchgeführt (Abb. 16). Die PCR mit dem ersten Primerpaar P1fw und P2rev ergab viele unspezifische Banden. Die PCR mit dem Primerpaar SSU1 und P1rev ergab hingegen jeweils eine deutliche Bande

(Abb. 16). Auch diese Amplimere wurden sequenziert, was jedoch zu keinen verwertbaren Ergebnissen führte.

3.3 Kultur und Identifizierung der Hartmannellen

3.3.1 Morphologie

Nach der ersten Differenzierung wurden zunächst die Initialproben 1407, 1411, 1413, 1420, 1422 und 1429 als *Hartmannella*-positiv beurteilt (Tab. 5). Von allen 6 Proben wurden Reinkulturen hergestellt. Da sich die Systematik der Hartmannellen gerade im Umbruch befindet und nicht alle der 4 beschriebenen Spezies anerkannt sind, wurden die Amöben nicht weiter differenziert und nur als *Hartmannella* spp. bezeichnet. Eine der Proben (1411) wurde im Phasenkontrast fotografiert (Abb. 17).

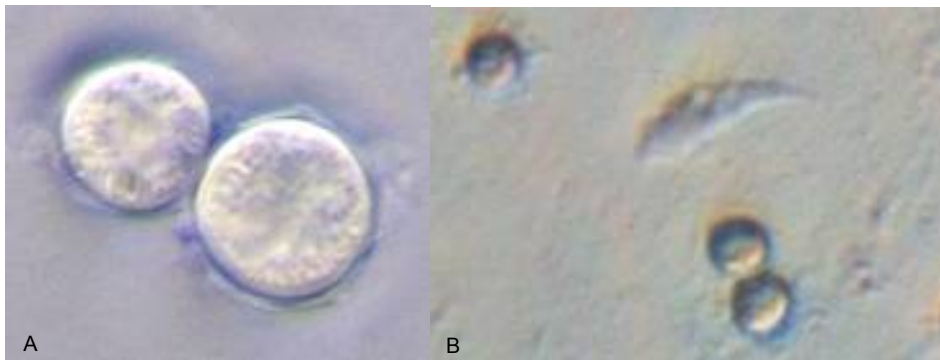


Abb. 17: Fotos von Hartmannellen-Zysten im Phasenkontrast (A) und von Zysten und einem Trophozoiten im Durchlicht (B) der Wasserprobe 1411 (orig.).

3.3.2 Molekularbiologie

Für die Etablierung der *Hartmannella*-PCR wurde zunächst ein Temperaturgradient ausgetestet (Abb. 18).

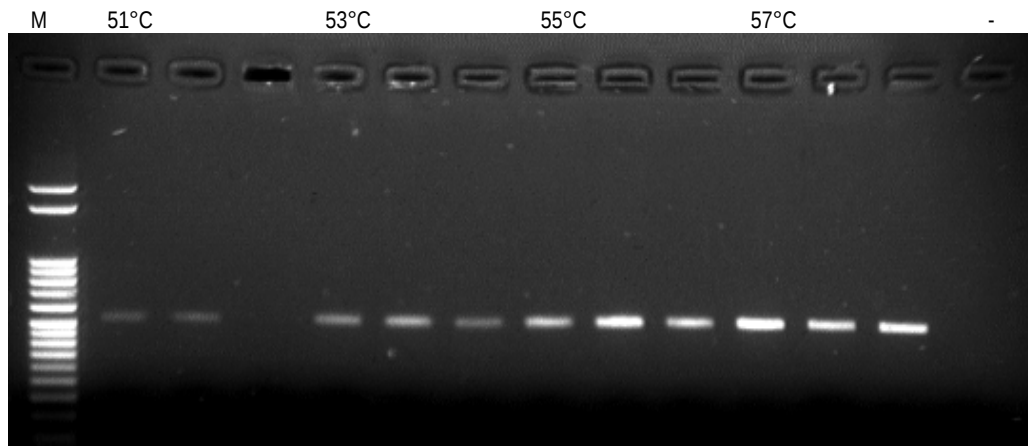


Abb. 18: Austesten der optimalen Temperatur für die PCR mit dem Primerpaar HARTfor/rev. M = DNA-Marker, - = Negativ-Kontrolle. Bei jeder Temperatur wurden jeweils 5 μ l, 10 μ l und 15 μ l DNA des Hc-Referenzstammes eingesetzt. Die DNA wurde von 2 Kulturplatten isoliert und in 100 μ l AE-Puffer eluiert. 20 μ l PCR-Produkt wurden auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen.

Die PCR ergab bei 57°C die deutlichsten Banden. Später wurde die PCR zusätzlich noch bei einer Temperatur von 58°C durchgeführt, was sich bei der PCR mit der DNA aus den Kulturen der Wasserproben als optimal herausstellte (Abb. 20).

Durch eine Titrations-PCR wurde die optimale DNA-Menge für den PCR-Nachweis aus der Zellkultur ausgetestet (Abb. 19).

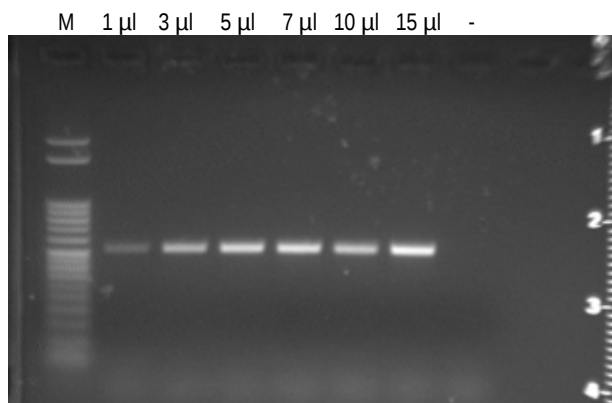


Abb. 19: HART-PCR mit unterschiedlichen DNA-Mengen des Stammes Hc. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle. Es wurden jeweils 20 μ l auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die DNA wurde von 2 Kulturplatten isoliert und in 100 μ l AE-Puffer eluiert.

Für den PCR-Nachweis der Hartmannellen aus der Zellkultur wurden bei den nachfolgenden Versuchen jeweils 3 μ l und 5 μ l DNA eingesetzt.

Um die Qualität der isolierten DNA des Hc-Stammes zu überprüfen wurde ein zweites Mal DNA isoliert und die Titrations-PCR parallel mit der ersten DNA wiederholt. Dabei konnte kein Qualitätsunterschied bei den PCR Ergebnissen festgestellt werden.

Danach wurde die HART-PCR mit der isolierten DNA der 6 als *Hartmannella*-positiv

beurteilten Kulturen (1407, 1411, 1412, 1420, 1422, 1429) durchgeführt.

Zunächst wurden je 2 PCR-Versuche bei einer Annealing Temperatur von 57°C gemacht (Tab. 7). Als in der Gelelektrophorese jedoch jeweils nur bei den Proben 1411 und 1420 einzelne Banden mit der erwarteten Fragmentlänge von ~525 bp auftraten und die restlichen 4 Proben zusätzliche unspezifische Banden zeigten, wurde die Annealing-Temperatur um 1°C erhöht. Bei der Wiederholung der HART-PCR mit 58°C Annealing-Temperatur (Tab. 7) konnte die Bildung von unspezifischen Banden weitgehend verhindert werden (Abb. 20).

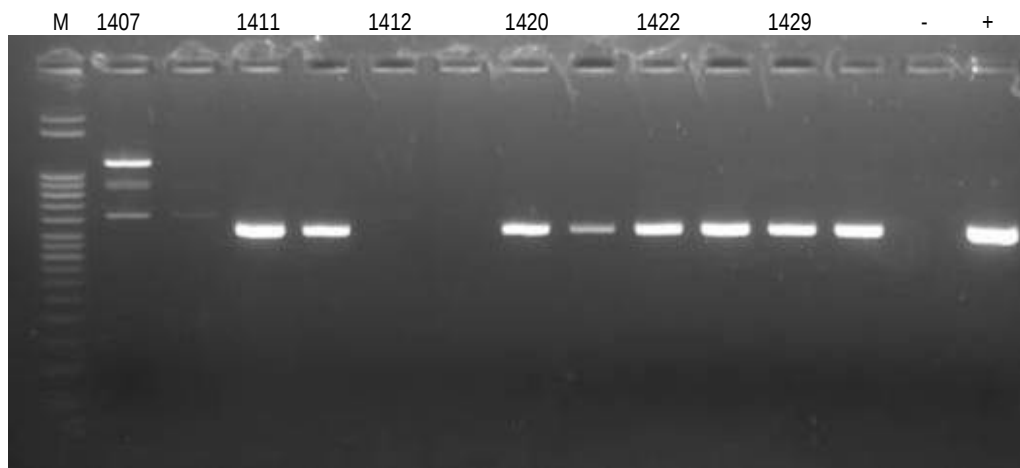


Abb. 20: HART-PCR mit der DNA von 6 *Hartmannella* spp.-Kulturen. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle, + = Positivkontrolle (Hc). Es wurden jeweils 3 und 5 µl in die PCR eingesetzt. 36 µl PCR-Produkt wurden auf das 2% Agarose-Gel aufgetragen. Die Banden wurden ausgeschnitten und aufgereinigt. Die PCR der Proben 1411, 1420, 1422 und 1429 war positiv mit Banden knapp über 500 bp des DNA-Markers.

Tab. 7: Ergebnis der HART-PCR. Die 4 grau markierten Proben waren in der PCR positiv

Probennummer	Wiederholungen		Anzahl der positiven Ergebnisse	
	57°C	58°C	57°C	58°C
1407	2	1	0	0
1411	2	1	2	1
1412	2	1	0	0
1420	2	1	2	1
1422	2	1	2	1
1429	2	1	2	1

Gesamt: 6

Insgesamt war die HART-PCR von 4 Proben positiv (Abb. 20, Tab. 7), wodurch die Amöben nun eindeutig als Hartmannellen identifiziert werden konnten. Die positiven Proben zeigten in den ersten 2 Durchgängen mit 57°C zumindest eine Bande auf der richtigen Höhe und beim dritten Durchgang mit 58°C jeweils eine spezifische Bande. Auch

diese Banden wurden sequenziert (Kap. 3.8.2). Die Proben 1407 und 1412 zeigten in allen Durchgängen entweder unspezifische Banden (1407) oder keine Banden (1412). Als Gegenprobe wurde mit den 6 Proben auch eine JDP-PCR durchgeführt, die für alle Proben negativ war.

3.4 Filterstanzen – DNA-Konzentration

Alle 28 Wasserproben wurden zusätzlich zur Kultivierung auch molekularbiologisch untersucht. Hierzu wurden aus jedem Filter 3 Proben ausgestanzt und daraus die DNA isoliert. Die Konzentrationen der von den Filtern isolierten DNA der 28 Wasserproben wurde überprüft (Tab. 8). Für jede Probe wurden 2 Messungen durchgeführt und der Mittelwert der DNA Konzentration in ng/µl berechnet. Zum Vergleich wurde auch die DNA-Konzentration der größten 1BU-Verdünnung (entsprechend 10 Zellen/ml) gemessen, die bei der PCR positiv war (Abb. 22). Anschließend wurden die der Tab. 4 entsprechenden DNA-Mengen für die PCR bestimmt (Tab. 8).

Tab. 8: Messung der Konzentrationen der von den Filtern isolierten DNA mittels UV/VIS Spektrophotometer.

Betrieb	Proben Nr.	DNA-Messung (ng/μl)	DNA-Menge für PCR (μl)
1	1436	2,25	10
2	1437	1,90	10
	1438	12,05	3
3	1410	6,90	5
4	1421	32,25	1
5	1406	58,37	1
	1407	17,20	3
	1413	74,20	1
	2849	5,05	3
	2850	73,20	1
6	1408	5,15	5
	1409	2,95	10
7	1411	45,65	1
	1412	55,03	1
8	1425	40,55	1
9	1426	5,30	5
	1427	1,95	10
10	1444	43,95	1
11	1392	1,15	10
12	1419	9,35	3
	1420	1,50	10
13	1434	3,20	5
	1435	3,15	5
14	1428	2,25	10
	1429	43,85	1
15	1422	8,55	3
	1423	2,50	10
16	1424	0,80	10
Test	1BU (10Zellen/ml)	1,95	

3.5 Filterstanzen – *Acanthamoeba*

3.5.1 JDP-PCR

Die Sensitivität der JDP-PCR wurde zunächst mit den Acanthamoeben-Stämmen 1BU und 4CI ausgetestet. Um die Nachweisbarkeitsgrenze zu ermitteln, wurde die PCR mit der isolierten DNA aus 5 Verdünnungsstufen durchgeführt:

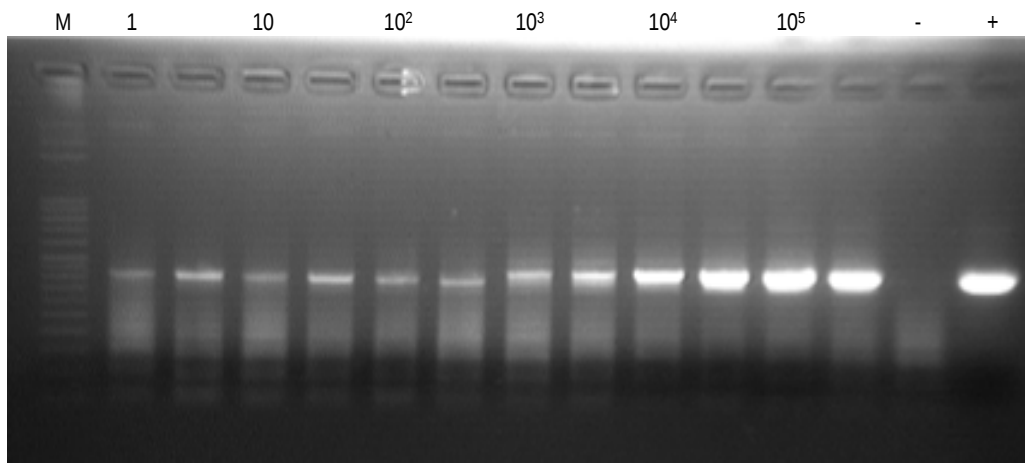


Abb. 21: JDP-PCR mit Verdünnungsreihe des Stammes 1BU. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle, + = Positivkontrolle (A+). Die Zahlen geben die Gesamtzahl der Zellen an, deren DNA in 200 µl AE-Puffer eluiert wurde. Es wurden jeweils 1 und 3 µl DNA in die PCR eingesetzt. 38,5 µl PCR-Produkt wurden auf das Gel (2% Agarose) aufgetragen. Die Nachweisbarkeitsgrenze lag bei der Test-PCR unter einer Zelle.

Zusätzlich wurde die Sensitivität der JDP-PCR für die aus den Filterstanzen isolierte DNA, mit der DNA aus 3 filtrierten Verdünnungsstufen von Zellen des 1BU Stammes, ausgetestet (Abb. 22).

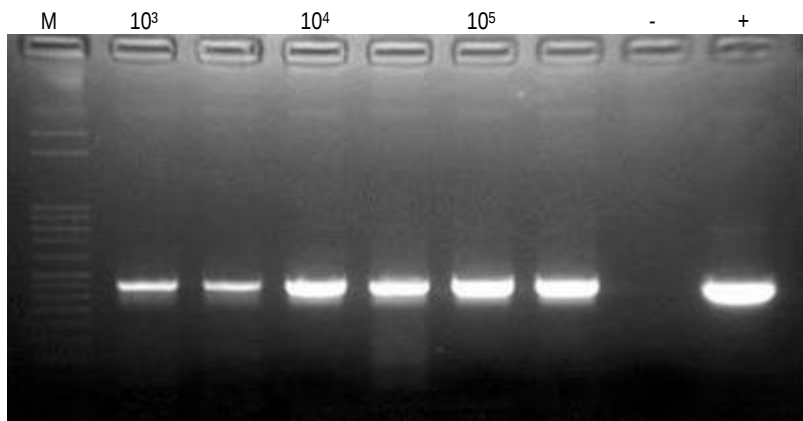


Abb. 22: Test-JDP-PCR mit der DNA einer filtrierten Verdünnungsreihe von Zellen des 1BU-Stammes. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle, + = Positivkontrolle (A+). Die Zahlen geben die Gesamtzahl der Zellen an, die aus 100 ml Wasser filtriert wurden. Die DNA von je 3 aus dem Filter ausgestanzten Proben wurde isoliert und jeweils in 100 μ l AE-Puffer eluiert. Es wurden je 1 und 5 μ l DNA in die PCR eingesetzt und 40 μ l PCR-Produkt auf das 2% Agarose-Gel aufgetragen.

Für den PCR-Nachweis von den Filtern mit den JDP-Primern wurden die entsprechenden Mengen DNA eingesetzt (Tab. 8). Da die PCR bei allen Proben negativ war, wurde ein Nested-PCR-System etabliert, das die Sensitivität erhöhen sollte.

3.5.2 Nested-PCR

Die Etablierung der Nested-PCR für den *Acanthamoeba*-Nachweis von den Filtern erfolgte mit Proben, die zunächst in den Initialkulturen positiv waren. Die jeweils optimale Annealing-Temperatur im ersten und im zweiten PCR-Schritt wurde in mehreren Durchgängen ausgetestet und die Ergebnisse verglichen (Tab. 9).

Tab. 9: Testen der Nested-PCR.

PCR-Test	1. PCR JDP1/P3rev	2. PCR P2fw/JDP2
1.	52°C	52°C
2.	52°C	54°C
3.	54°C	54°C
4.	54°C	56°C
5.	52°C	56°C

optimales Ergebnis



Abb. 23: 232. Test der Nested-PCR- (52°C/54°C). M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle der 2. PCR, -nest = Negativkontrolle beider PCR-Schritte, + = Positivkontrolle (1BU). In beiden PCR-Schritten wurden jeweils 1 und 3 µl der Proben in die PCR eingesetzt. Von der Positivkontrolle wurden in beiden Durchgängen je 3 µl eingesetzt. 40 µl PCR-Produkt wurden auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen.

Die PCR-Tests 1 bis 4 wurden jeweils mit 30 Zyklen in beiden PCR-Schritten (1 min/95°C, 2 min/52°C, 54°C, 56°C, 3 min/72°C) durchgeführt. Im Zuge des 5. PCR-Versuchs wurde die Zyklenzahl auf jeweils 25 reduziert und die Elongationszeit im 2. PCR-Schritt auf 1,5 min bei 72°C reduziert (Tab. 9, Abb. 23: 23). Ziel war es, das Auftreten unspezifischer Banden und die Bildung eines „smears“ zu verhindern.

Das bestmögliche Ergebnis wurde beim zweiten PCR-Test mit den Annealing-Temperaturen 52°C und 54°C erreicht, wobei die Proben 1412 und 1413 jeweils bei einer Verdünnungsstufe eine einfache Bande auf Höhe der Positivkontrolle (~180 bp) aufwiesen (Abb. 23: 23).

Die etablierte Nested-PCR für den Nachweis von *Acanthamoeba* von Filtern wurde nun mit allen 28 Proben durchgeführt (Abb. 24).

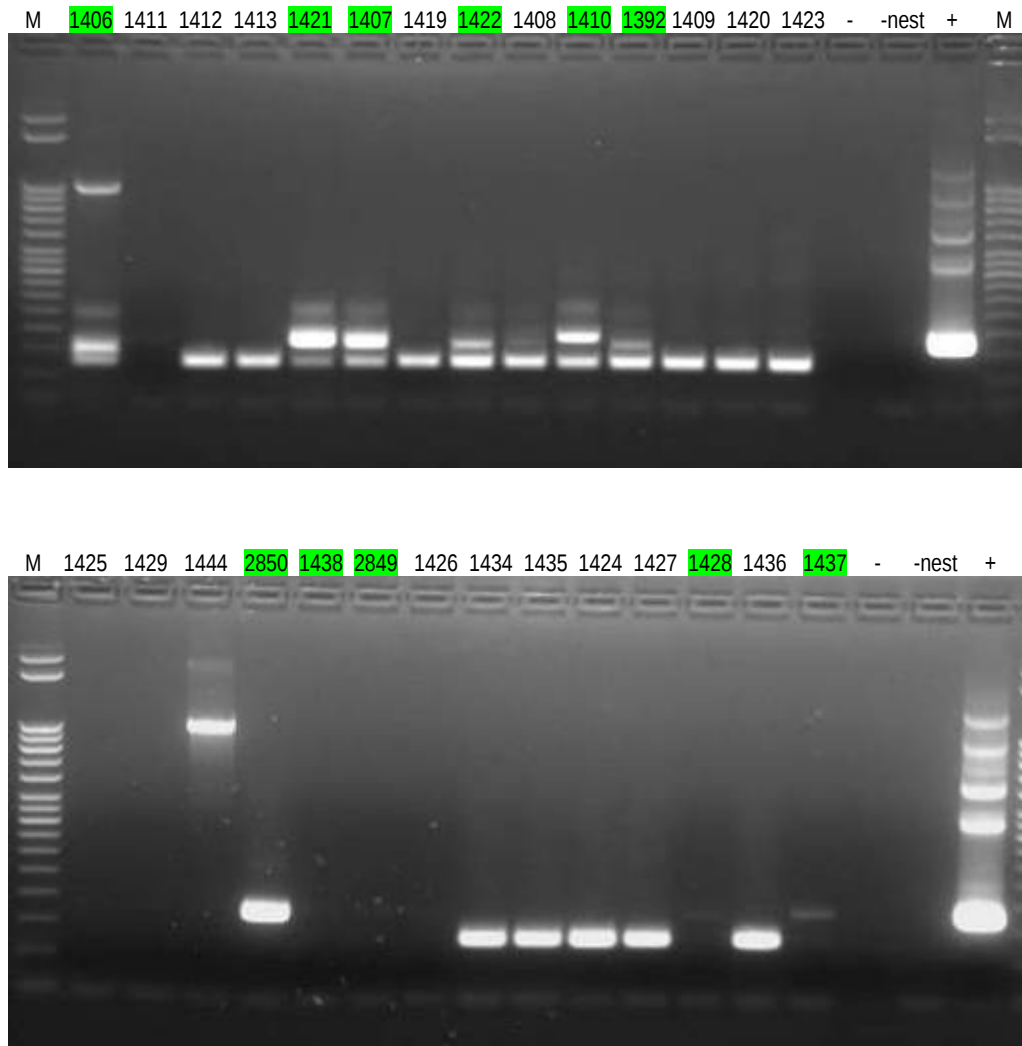


Abb. 24: Nested-PCR mit 52°C/54°C zum Nachweis der Acanthamoeben von insgesamt 28 Filterproben. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle der 2. PCR, -nest = Negativkontrolle beider PCR-Schritte, + = Positivkontrolle (4Cl). Als Positivkontrolle wurden im ersten Schritt 3 µl DNA von 10⁸ Zellen (eluiert in 200 µl AE-Puffer) verwendet und von diesem PCR-Produkt wiederum 3 µl in die 2. PCR eingesetzt. Von 28 Proben wurden jeweils entsprechende DNA-Mengen (Tab. 8) in die erste PCR eingesetzt. In die 2. PCR wurden jeweils 3 µl des ersten PCR-Produktes eingesetzt. 36 µl PCR-Produkt wurden auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen. 10 von 11 Banden auf Höhe der Positivkontrolle (zwischen 150 bp und 200 bp des DNA-Markers) wurden ausgeschnitten und zum Sequenzieren aufgereinigt (grau markiert): 1421, 1407, 1422, 1410, 1392, 2850, 1438 (sehr schwache Bande), 2849 (sehr schwache Bande), 1428, 1437. Die entsprechende Bande der Probe 1406 lag zu nahe an der unteren Bande und wurde daher nicht ausgeschnitten.

Insgesamt waren 23 von 28 Proben in der Nested-PCR positiv (Abb. 24). Es waren 2 charakteristische Banden zu beobachten. Die Banden von 11 Proben traten in der dem Genotyp T4 entsprechenden Höhe auf (~170 bp). Bei 18 Proben waren jedoch auch kürzere Banden (zwischen 100 und 150 bp des DNA-Markers) unterhalb der T4-Positivkontrolle zu beobachten. Diese Bande entspricht dem Genotyp T5 (Tab. 10). 10 T4-spezifischen Amplimere (Abb. 24) wurden sequenziert und nach Möglichkeit genotypisiert. Bei 4 Proben (1407, 1410, 1421 und 1422) gelang eine Zuordnung zum Genotyp T4 (siehe Kap. 3.8.1).

Tab. 10: Ergebnis der Nested-PCR.

Proben Nr.	T4-Bande	T5-Bande
1392	1	1
1406	1	1
1407	1	1
1408	0	1
1409	0	1
1410	1	1
1411	0	0
1412	0	1
1413	0	1
1419	0	1
1420	0	1
1421	1	1
1422	1	1
1423	0	1
1424	0	1
1425	0	0
1426	0	0
1427	0	1
1428	1	0
1429	0	0
1434	0	1
1435	0	1
1436	0	1
1437	1	0
1438	1	0
1444	0	0
2849	1	0
2850	1	0
28	11	18

T4- und T5-Banden

Da sowohl 4Cl als auch 1BU als Positivkontrollen bei der Nested-PCR immer wieder mehrfache Banden aufwiesen, wurde versucht, diesem Problem durch Konzentrationsverdünnung entgegen zu wirken (Abb. 25).

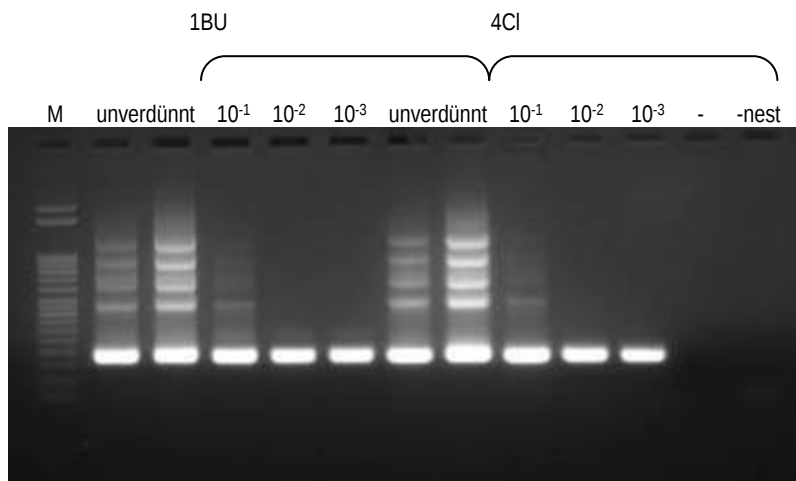


Abb. 25: Vergleich der Nested-PCR mit DNA-Verdünnungsreihen von 1BU und 4Cl. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle der 2. PCR, -nest = Negativkontrolle beider PCR-Schritte. Im 1. PCR-Schritt wurden jeweils 3 μ l DNA des 1BU und des 4Cl-Stammes eingesetzt. Im 2. PCR-Schritt wurden jeweils 1 und 3 μ l unverdünntes PCR-Produkt, 3 μ l 1:10, 3 μ l 1:100 und 3 μ l 1:1000 verdünntes PCR-Produkt eingesetzt.

Bei den PCR-Tests 3, 4 und 5 (Tab. 9) wurde bereits DNA von 10 1BU-Zellen (eluiert in 200 μ l AE-Puffer) als Positivkontrolle getestet, aber auch bei dieser Verdünnungsstufe traten immer noch mehrere Banden auf.

Die 1:1000-Verdünnung des ersten PCR-Produktes von 3 μ l DNA des 4Cl-Stammes erwies sich hingegen als geeignete Positivkontrolle (Abb. 25).

3.6 Filterstanzen – *Hartmannella*

Für das Austesten der Sensitivität wurde eine Titrations-PCR mit der isolierten DNA von 5 Verdünnungsstufen des *Hartmannella*-Stammes Hc durchgeführt (Abb. 26).

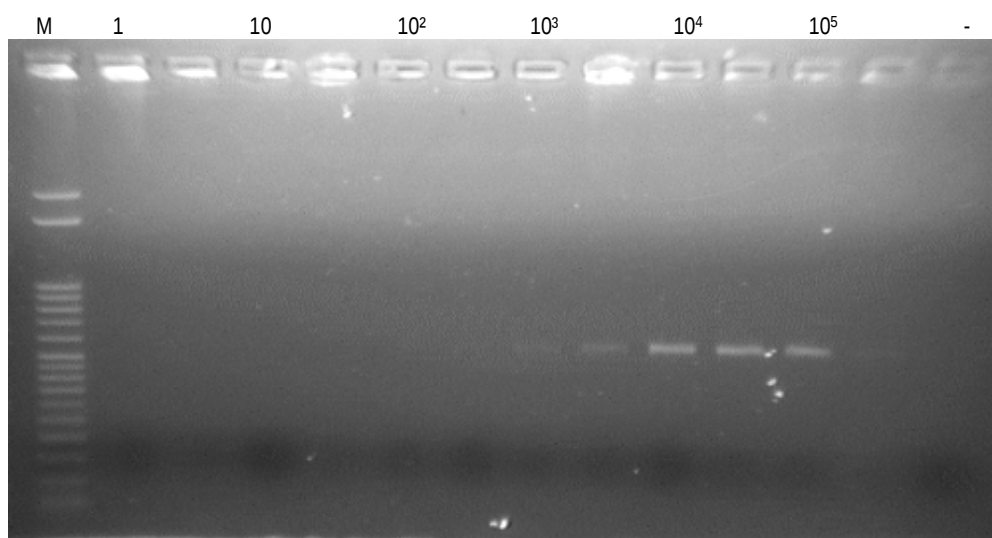


Abb. 26: HART-PCR mit Verdünnungsreihe des Stammes Hc. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle. Die Annealing-Temperatur betrug 57°C. Die Zahlen geben die Gesamtzahl der Zellen an, deren DNA in 100 µl AE-Puffer eluiert wurde. Es wurden jeweils 3 und 7 µl DNA in die PCR eingesetzt. 20 µl PCR-Produkt wurden auf das Gel (2% Agarose) aufgetragen. Die Nachweisbarkeitsgrenze lag bei der Test-PCR bei 1000 Zellen/ml.

Der PCR-Nachweis mit den HART-Primern von den 28 Filtern erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von 58°C, wobei wieder die entsprechenden Mengen DNA eingesetzt wurden (Tab. 8). Das Ergebnis war für 27 von 28 Proben negativ. Nur bei der Probe 1420, deren PCR-Nachweis aus der Kultur ebenfalls positiv war (Abb. 20, Tab. 7), trat eine schwache Bande auf.

3.7 Filterstanzen – *Naegleria*

Zur Etablierung der *Naegleria*-PCR und zum Austesten der Sensitivität wurden zwei Titrations-PCRs mit der isolierten DNA aus 5 Verdünnungsstufen des N-DMLG-Stammes durchgeführt. Um die Qualität der isolierten DNA zu überprüfen, wurde anschließend erneut die DNA von 1 bis 10⁵ Zellen isoliert und die Titrations-PCR wiederholt (Abb. 27).

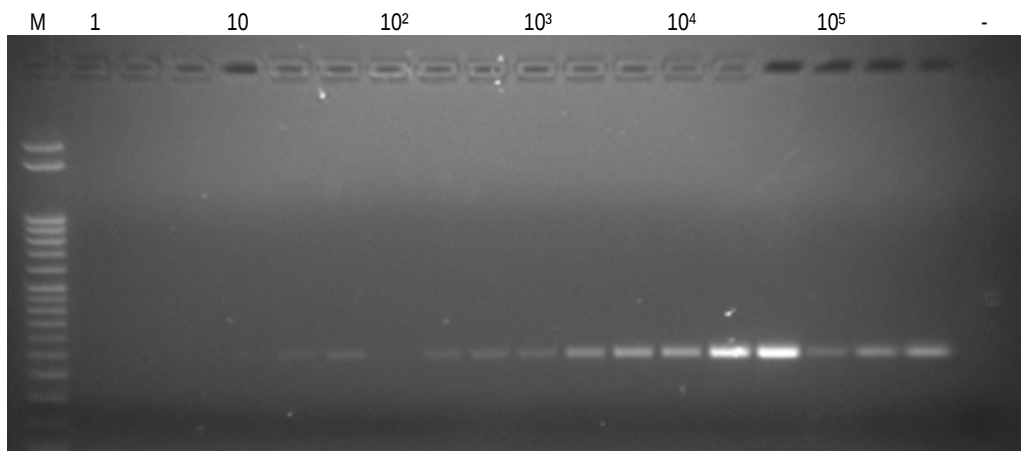


Abb. 27: PCR mit dem Primerpaar Nae3-For/NII. Test mit einer Verdünnungsreihe des Stammes N-DMLG. M = DNA-Marker, - = Negativkontrolle. Die Zahlen geben die Gesamtzahl der Zellen an, deren DNA in 100 µl AE-Puffer eluiert wurde. Es wurden jeweils 1, 3 und 5 µl DNA in die PCR eingesetzt. 20 µl PCR-Produkt wurden auf das Gel (2% Agarose) aufgetragen. Die Nachweisbarkeitsgrenze lag bei der Test-PCR mit der zuletzt isolierten DNA unter 10 Zellen.

Anschließend wurde die Næglerien-PCR mit allen 28 Filterproben durchgeführt, wobei wieder die entsprechenden Mengen DNA aus Tab. 8 eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle wurde die DNA von 10, 10² und 10⁵ N-DMLG-Zellen verwendet. Von den 28 untersuchten Proben war eine positiv (1423). Da die Bande sehr schwach war, wurde die PCR mit dieser Probe wiederholt, wobei diesmal 5 µl, 10 µl und 15 µl DNA eingesetzt

wurden. Wieder wurden äußerst schwache Banden sichtbar, die auch ausgeschnitten und für das Sequenzieren aufgereinigt wurden.

3.8 Sequenzieren

Um eine genaue Identifizierung der PCR-positiven Kulturen und Filterstanzen zu ermöglichen, wurde mit allen Amplimeren eine Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurden 15 *Acanthamoeba*-Amplikons (5 aus der Kultur-PCR und 10 aus der Nested-PCR), 4 *Hartmannella*-Amplikons (aus der Kultur-PCR) und 1 *Naegleria*-Amplikon (aus der Filterstanzen-PCR) sequenziert.

3.8.1 *Acanthamoeba* – Genotypisierung

Bei 6 von 15 Proben gelang die Sequenzierung der jeweiligen Amplimere (Tab. 11). Anschließend wurden die Sequenzen im NCBI-Blast-Programm überprüft. Sofern die Qualität der erhaltenen Sequenzen es zuließ, wurde jeweils ein multiples Alinierungsprojekt mit den Referenz-Sequenzen der 15 Genotypen durchgeführt.

Tab. 11: Sequenzier-Ergebnisse für *Acanthamoeba*.

Proben	PCR / Primer	Sequenzlänge	Identität mit Referenzsequenz		entsprechender Genotyp
		bp	bp	%	
1392	JDP / JDP1	209	204	97,6%	T4*
1406	JDP / JDP2	434	391	90,1%	T4*
1407	Nested / P2fw	170	148	87,1%	T4**
1410	Nested / JDP2	133	107	80,5%	T4**
1421	Nested / JDP2	164	140	58,4%	T4**
1422	Nested / JDP2	159	118	74,2%	T4**

* Sequenzlänge des T4-Referenzstammes: 461 bp (JDP-PCR)

** Sequenzlänge des T4-Referenzstammes: 174 bp (Nested-PCR)

Von 11 *Acanthamoeba*-positiven Proben konnte die DNA aus 6 Proben genotypisiert werden. Wie aus Tab. 11 ersichtlich, handelte es sich bei allen Proben um Genotyp T4. 4 dieser Proben (1392, 1406, 1410, 1421) waren bereits in Kultur positiv auf *Acanthamoeba* (Abb. 14). Von 3 JDP-PCR-Produkten (Abb. 15) war bei 2 Proben (1392, 1406) eine Genotypisierung möglich. Von 10 aufgereinigten Nested-PCR-Produkten (Abb. 24) konnten 4 (1407, 1410, 1421, 1422) erfolgreich sequenziert und genotypisiert werden. 2 davon (1407 und 1422) waren negativ in Kultur.

Insgesamt konnten von den 7 zuvor morphologisch differenzierten Akanthamöben-Kulturen (Abb. 14) 4 Proben (1392, 1406, 1410, 1421) durch JDP- oder Nested-PCR sequenziert und genotypisiert werden.

Die vollständigen Amplimere der Referenzstämme der 15 Genotypen aus der JDP-PCR weisen Längen zwischen 423 bp (T5) und 515 bp (T9) auf, wohingegen die Nested-PCR nur Amplimere mit Sequenzlängen von 132 bp (T5) bis 190 bp (T15) hervorbringt.

Anhand der Sequenzlängen der Amplimere und den Sequenzsimilaritäten („identische Sequenzen in bp“, Tab. 11) mit den 18S rDNA-Referenzsequenzen wurde berechnet, mit welchen Genotypen die untersuchten Proben die größte Übereinstimmung aufweisen (Tab. 11). Das durch die JDP-PCR erhaltene Amplimer ASA.S1 wurde anhand des Vergleichs zweier variabler Regionen genotypisiert (Region 1 und 2, Abb. 28). Die sehr viel kürzeren Amplimere aus der Nested-PCR beinhalten hingegen nur eine variable Region (Region 2, Abb. 28).

Wie man in Tab. 11 sehen kann, ergab das Sequenzieren des JDP-PCR-Produktes der Probe 1392 nur eine 209 bp lange Sequenz. Diese ließ sich daher nur mit dem ersten variablen Bereich alignen. Dabei ergab sich eine 97,6%ige Übereinstimmung mit dem Genotyp T4 bzw. eine 94,7%ige Übereinstimmung mit T3 und T11 desselben Genotyp-Clusters. Die 434 bp lange Sequenz von 1406 war mit einer Sequenzsimilarität von 90,1% ebenfalls dem Genotyp T4 am ähnlichsten (Tab. 11, Abb. 28). Die Nested-PCR-Sequenzen der Proben 1407, 1410 und 1422 wiesen mit 87,1%, 80,5% bzw. 74,2% ebenfalls die größte Übereinstimmung mit dem Genotyp T4 auf.

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Abb. 28: Alignment der Sequenz der Probe 1406 mit Genotypen, die die größte Übereinstimmung aufwiesen (T4, T5 und T11). Die sequenzierten Amplimere der Genotypen und der Probe stammen aus der JDP-PCR. Die Probe wurde dreimal mit dem Vorwärtsprimer (JDP1) und dreimal mit dem Rückwärtsprimer (JDP2) sequenziert. Dabei wurden jeweils 1 und 3 µl PCR-Produkt in die Sequenzier-PCR eingesetzt. Das Sequenzieren von 1 µl 1406-PCR-Produkt mit dem Primer JDP2 ergab eine 434 bp lange Sequenz, welche die größte Übereinstimmung mit dem Genotyp T4 in den beiden variablen Regionen (1 und 2) aufwies (Tab. 11).

3.8.2 *Hartmannella* – Typisierung

Die 4 positiven Proben wurden zur Überprüfung des PCR-Ergebnisses jeweils einmal vorwärts und einmal rückwärts sequenziert. Nach der Eingabe der erhaltenen Sequenzen im NCBI-BLAST-Programm wurde mit den Sequenzen jeweils ein multiples Alinierungsprojekt mit den Referenzsequenzen von *H. vermiformis*, *H. abertawensis* und *H. cantabrigiensis* erstellt (Abb. 29).

Tab. 12: Sequenzier-Ergebnisse für *Hartmannella*.

Proben	Primer	Sequenzlänge	Identität mit Referenzsequenz		entsprechende Art
		bp	bp	%	
1411	HARTrev	242	205	84,7%	<i>H. vermiformis</i> *
1420	HARTrev	126	107	84,9%	<i>H. vermiformis</i> *
1422	HARTrev	214	195	91,1%	<i>H. vermiformis</i> *
1429	HARTfor	199	161	80,9%	<i>H. vermiformis</i> *

*Sequenzlänge der *H. vermiformis*- Referenzsequenz: 532 bp

Durch die Berechnung der Similaritäten der sequenzierten Proben mit den Referenzsequenzen wurde versucht, die Hartmannellen bis zum Artniveau zu bestimmen. Wie aus Tab. 12 ersichtlich, konnten alle 4 HART-PCR-Produkte (Abb. 20) sequenziert und aliniert werden. Zwar konnten nur Teilsequenzen („Sequenzlänge“) des HART-Amplimers erhalten werden, diese wiesen jedoch jeweils die größte Übereinstimmung („identische Sequenzen“) mit *Hartmannella vermiformis* auf. Die Sequenzsimilaritäten mit *H. abertawensis* waren deutlich geringer mit 70,7% (1411), 76,2% (1420), 77,1% (1422) und 56,3% (1429). Noch geringer waren die Übereinstimmungen mit *H. cantabrigiensis*. Die Dissimilaritäten zwischen den *Hartmannella*-Referenzsequenzen betragen 22,7% (*H. vermiformis* und *H. abertawensis*), 22,9% (*H. vermiformis* und *H. cantabrigiensis*) und 25,1% (*H. cantabrigiensis* und *H. abertawensis*).

1422HARTr	:																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
-----------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Abb. 29: Alignment der Teilsequenz der Probe 1422 mit den Referenzsequenzen aller *Hartmannella*-Spezies. Das Sequenzieren von 1 µl 1422-PCR-Produkt mit dem Primer HARTrev ergab eine 214 bp lange Sequenz, welche die größte Übereinstimmung mit *H. vermiformis* aufweist (siehe Tab. 12).

3.8.3 Naegleria – Typisierung

Das Sequenzieren der Probe 1423 führte zu keinem Ergebnis.

3.9 FLA und Legionellen in den Wasserproben

In Tab. 13. sind alle Proben, die darin detektierten FLA und die in der Paralleluntersuchung der Wasserabteilung detektierten Legionellen aufgelistet. Auch die bei der Probennahme erhobenen Parameter Desinfektion, Wassertemperatur, Aerosolbildung und Durchfluss wurden ergänzt. Leere Felder bedeuten, dass keine Angaben zu dieser Probe vorliegen.

Betrieb	Proben Nr.	Desinfektion	Mittel	Wassertemp. °C	Aerosol-bildung	konstanter Durchfluss	Acanthamoeba spp.	Hartmannella spp.	Naegleria spp.	andere FLA	Legionella spp./100 ml
1	1436	ja	Chlor	34	nein	ja	(1)*	0	0	0	0
2	1437			32	nein	ja	(1)*	0	0	0	0
	1438	ja	NaIC 74673	45	nein	ja	(1)*	0	0	0	0
3	1410	nein		21	ja	ja	1	0	0	0	0
4	1421	nein		37	nein	ja	1	0	0	0	0
	1406	ja	Wasserstoffperoxid, PES	42	ja	ja	1	0	0	1	0
	1407	zeitweise	Eisen-III-Chlorid	39	ja	ja	(1)*	(1)	0	1	1.100
5	1413	ja	andere	35	ja	ja	1	(1)	0	1	0
	2849						(1)*	0	0	1	2.500
	2850						1	0	0	0	0
6	1408	ja	Wasserstoffperoxid	60	ja	z.T.	(1)*	0	0	0	0
	1409	ja	Wasserstoffperoxid	60	ja	z.T.	(1)*	0	0	0	0
7	1411	ja	Blozid	44	ja	ja	(1)	1	0	0	0
	1412	ja	Blozid	39	ja	ja	1	0	0	1	0
8	1425	nein		48			(1)	0	0	1	0
9	1426	ja	Blozid	30	ja	ja	0	0	0	0	0
	1427	ja	Blozid	45	ja	ja	(1)*	0	0	0	0
10	1444	nein		35		ja	0	0	0	1	0
	1392	nein		40	ja	ja	1	0	0	0	< 35
12	1419	nein		44		ja	(1)*	0	0	0	0
	1420	nein		40		ja	1	1**	0	1	0
13	1434	ja	BCDMH	45	ja	ja	(1)*	0	0	0	0
	1435	ja	BCDMH	45	ja	ja	(1)*	0	0	0	0
	1428	ja	Schleimbekämpfungsmittel	36	nein	ja	(1)*	0	0	0	45
14	1429	ja	Schleimbekämpfungsmittel	40	nein	ja	0	1	0	0	0
	1422	nein		45	ja	ja	1	1	0	0	0
	1423	ja	quat-Ammoniumchlorid+Bronopol	45	ja	ja	(1)*	0	(1)***	0	< 35
16	1424	ja	Ammonium? + Hypochlorit	40	ja	nein	(1)*	0	0	1	0
	28						25	6	1	9	5

0 ... nicht nachweisbar
 1 ... Kultur und PCR positiv
 (1) ... Kultur oder PCR positiv
 * ... Kultur negativ, aber Nested-PCR positiv
 ** ... Filter-PCR positiv
 *** ... nur Filter-PCR positiv
 n.W. nachweisbar
 z.T. zum Teil
 SG ... Serogruppe
 BCDMH ... Bromchloridimethylhydantoin

Tab. 13: Gemeinsames Auftreten von FLA und Legionellen und einige Parameter der Wasserproben bei der Probenentnahme.

Wie aus Tab. 13 hervorgeht, waren 27 von 28 Wasserproben positiv auf FLA. Dabei wurden in 25 Proben die Gattung *Acanthamoeba*, in 6 Proben die Gattung *Hartmannella* und in 9 Proben diverse andere FLA nachgewiesen. In 11 Proben waren mehr als eine Amöbengattung. 15 Wasserproben enthielten nur Akanthamöben, wohingegen *Hartmannella* als einzige Gattung in einer Wasserprobe nur in einem Fall auftrat. In 5 Proben traten Hartmannellen gemeinsam mit Akanthamöben auf. Eine Probe war auf *Acanthamoeba* und möglicherweise auf *Naegleria* positiv.

Von 25 *Acanthamoeba*-positiven Proben konnten aus 9 Proben Akanthamöben mittels Kultur isoliert werden. Bei 7 Proben gelang die Herstellung einer Reinkultur. 16 Proben waren entweder in Kultur oder in der PCR positiv, wobei 2 Proben nur in Kultur und 14 Proben nur in der Nested-PCR positiv waren. In nur 3 Fällen waren alle Nachweismethoden negativ.

Von 6 *Hartmannella*-positiven Proben konnte Zellen aus 4 Proben durch Kultur isoliert werden. Eine dieser Proben war nicht nur in Kultur und in der HART-PCR positiv, sondern auch beim direkten PCR-Nachweis vom Filter. 2 der Proben wurden nur in Kultur detektiert.

Der Nachweis für die Gattung *Naegleria* war nur mittels PCR möglich – die Isolierung von *Naegleria* durch Kultivierung gelang nicht. Die PCR war in einem Fall positiv.

In 9 Fällen wurden diverse andere FLA ausschließlich in Kultur nachgewiesen.

Insgesamt waren 5 Wasserproben (1407, 2849, 1392, 1428 und 1423) von 4 verschiedenen Betrieben (5, 11, 14 und 15) positiv auf *Legionella* spp. Dabei entspricht die Probe 2849 allerdings einer Kontrollprobe von 1407, die zu einem späteren Zeitpunkt entnommen wurde. In allen 5 Proben befanden sich apathogene Legionellen unbestimmter Art. 3 dieser 5 Proben waren aber zusätzlich mit *L. pneumophila* kontaminiert, wovon wiederum 2 Proben Spezies der Serogruppe 1 enthielten. In allen 5 *Legionella*-positiven Proben waren auch Akanthamöben nachweisbar, eine dieser 5 Proben war auf *Naegleria* positiv und in 2 Proben wurden auch noch andere FLA detektiert. In 1 Probe mit Legionellen, in der neben Akanthamöben und anderen FLA auch Hartmannellen gefunden wurden. Keine der Legionellen-positiven Proben war Amöben-negativ

4 DISKUSSION

4.1 Vorkommen von FLA in Industrierwässern

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass FLA in den untersuchten Prozesswässern, trotz Desinfektion, weit verbreitet sind und auch syntop mit Legionellen vorkommen.

Im Zuge dieser Studie wurden zum ersten Mal Industrierwässer in Österreich auf das Vorkommen von FLA untersucht. FLA sind nicht nur in Leitungswasser, Kühltürmen oder Trinkwasser-Aufbereitungsanlagen häufig, sondern weisen – wie in dieser Studie gezeigt werden konnte – auch in Industrierwässern hohe Dichten auf. Da vor allem Amöben der Gattungen *Acanthamoeba* und *Hartmannella* mit dem Vorkommen von Legionellen assoziiert werden, wurde versucht, diese Amöben und auch Nöglerien qualitativ nachzuweisen. Nöglerien stellen aufgrund ihrer empfindlichen Zysten zwar keine optimalen Wirte für Legionellen dar, inzwischen ist jedoch nicht mehr von der Hand zu weisen, dass Amöben der Gattung *Naegleria* eine Rolle als Vektoren oder Vehikel für Legionellen spielen können (DECLERCK et al. 2005). Außerdem können diese Amöbengenera auch als Wirtszellen verschiedener anderer pathogener oder auch potentiell pathogener Organismen fungieren (MICHEL et al. 2000 und 2006, WALOCHNIK et al. 2005). Dazu zählen neben den Legionellen auch andere Bakterien die mögliche Erreger von Pneumonien sein können wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Coxiella burnetii* oder auch Mykobakterien und Rickettsien.

Da Naeglerien selbst – insbesondere *Naegleria fowleri* – eine nicht zu unterschätzende Gefahr darstellen, erschien es sinnvoll, diese Amöben bei der durchgeführten Prozesswässer-Untersuchung ebenfalls zu berücksichtigen.

Das Amöbenvorkommen wurde mit dem Auftreten von Legionellen verglichen. Dabei wurden auch bestimmte Parameter der Probenentnahmestelle berücksichtigt, die das Vorkommen von Legionellen beeinflussen können, wie etwa Temperatur, Zirkulation, pH oder der Einsatz von Bioziden. Die Erhebung chemischer, mikrobiologischer und physikalischer Parameter ist äußerst wichtig für die Prävention. In Betrieben mit älteren Systemen etwa besteht die Gefahr, dass das Wasser länger in Stagnationszonen wie Totleitungen oder Kühltürmen verbleibt. Nicht nur Zirkulation ist wichtig sondern auch die Speicherung des Heißwassers bei Temperaturen von mindestens 60°C bzw. die Heißwasserverteilung mit mindestens 55°C (SOMMER 2005). Kaltwasser sollte dagegen eine Temperatur von höchstens 20°C aufweisen, weswegen Kalt- und

Warmwasserleitungen sehr gut isoliert sein müssen. Diese Temperaturen sollten innerhalb von 1 bis 2 Minuten erreicht werden, da sich die Legionellen zwischen diesen Temperaturbereichen besonders schnell vermehren können. Die Behandlung des Wassers gegen die Bildung von Biofilmen und die Vorbeugung von Aerosolabdrift spielen ebenfalls eine wichtige Rolle (HWC-Projektabschlussbericht 2008, Sommer 2005).

4.2 Artenspektrum und Parameter in den Wasserproben

In nahezu allen Wasserproben ($n = 28$) konnten durch mikroskopische oder molekularbiologische Untersuchungen FLA nachgewiesen werden (96%). Dabei war *Acanthamoeba* die mit Abstand häufigste Gattung (89%), gefolgt von diversen FLA, wie Echinamöben und Vahlkampfen (32%). Die Gattung *Hartmannella* wurde nur in 21% der Wasserproben gefunden und *Naegleria* war möglicherweise in einer Probe vorhanden. Die in den Initialproben mikroskopisch detektierten und die in Reinkultur vorliegenden *Acanthamoeba*-Spezies gehörten ausschließlich zu den morphologischen Gruppen II und III. Das ist nicht weiter verwunderlich, wenn man bedenkt, dass diese Gruppen die resistantesten Zysten ausbilden und in den beprobten Wassersystemen teils extreme Bedingungen herrschten. Die morphologische Gruppe I ist aufgrund ihrer dünnwandigen, relativ empfindlichen Zysten in solchen „Risikogewässern“ eher nicht zu erwarten. 18% (5/28) der für unsere Studie entnommenen Wasserproben waren auch auf Legionellen positiv und enthielten zudem alle auch Amöben der Gattung *Acanthamoeba*. Obwohl in diesen Proben bei der Entnahme Temperaturen von 36 bis 45°C herrschten und daher durchaus auch thermophile Nöglerien oder thermotolerante Hartmannellen zu erwarten gewesen wären, konnten diese Genera nur jeweils in einer *Legionella*-positiven Probe nachgewiesen werden.

Auch im Zuge einer anderen Studie wurden verschiedene Gewässer anthropogenen Ursprungs auf Legionellen und FLA untersucht (DECLERCK et al. 2007). Dabei war der Anteil der jeweiligen Amöbengenera meist anders als in unseren Proben. DECLERCK untersuchte in 8 Kraftwerken Kühlturmwater, das wochenlang in Sammelbecken gestanden war, wodurch es zur Bildung von Biofilmen kam. Alle Wasserproben waren auf *Legionella* spp. und *L. pneumophila* positiv, und Akanthamöben waren ebenfalls stark verbreitet (60 - 65%). Die dominante Amöbengattung stellten Nöglerien dar, wohingegen Hartmannellen in diesen Kühltürmen selten zu finden waren. Der Unterschied zu unseren Ergebnissen lässt sich dadurch erklären, dass die „Umweltbedingungen“ in den von

DECLERCK untersuchten Kühltürmen gänzlich andere waren. Die Temperaturen dieser Kühlturmwater betragen nur 18 bis 22°C und es fand keinerlei Zirkulation statt. Solche Wassertemperaturen sind für Hartmannellen im Allgemeinen zu niedrig. Der hohe Anteil an Nöglerien lässt sich hingegen wahrscheinlich durch das Fehlen von Desinfektionsmitteln wie etwa Chlor erklären, denn die Zysten dieser Amöben werden schon bei Konzentrationen von 0,5 µg/ml zerstört (MARCIANO-CABRAL 1988). Die hohe Nögleriendichte und die starke Biofilmbildung begünstigen wiederum die Vermehrung der Legionellen.

Akanthamöben, deren pathogene Vertreter Temperaturen bis ca. 43°C tolerieren (DE JONCKHEERE 1991), traten prinzipiell bei jeder gemessenen Wassertemperatur, in einem Bereich von 21°C bis 60°C auf. Hartmannellen dagegen waren nur innerhalb eines vergleichsweise engen Temperaturbereichs von 35 bis 45°C zu finden. In der einzigen *Naegleria*-positiven Probe herrschten zum Zeitpunkt der Entnahme 45°C, was auf eine thermophile Spezies schließen lässt. An dieser Beprobungsstelle war eigentlich aufgrund des Einsatzes von Desinfektionsmitteln gar nicht mit dem Auftreten von Nöglerien zu rechnen. Da aber keine Amöben dieser Gattung in Kultur detektiert werden konnten und bei der Gelelektrophorese die Banden auf dem Gel kaum zu sehen waren, ist anzunehmen, dass entweder die Zelldichte in der Wasserprobe sehr gering war oder die Amöben durch Desinfektion bereits abgetötet wurden. Nöglerien vermehren sich am besten in unzureichend chloriertem und warmem Wasser zwischen 20°C und 45°C – Bedingungen, die auch teilweise auf unsere Wasserproben zutrafen. Selbst in unbehandelten Prozesswasserproben (9/28) mit optimalen Temperaturbedingungen konnten jedoch keine Nöglerien nachgewiesen werden

Es wäre allerdings möglich, dass ursprünglich in den Wasserproben vorhandene *Hartmannella*- oder *Naegleria*-Spezies im Labor bei Raumtemperatur auf den Agarplatten nicht anwachsen konnten. Vielleicht hätte die Kultivierung bei einer höheren Temperatur zu mehr positiven Ergebnissen geführt. Da an den meisten beprobten Stellen jedoch Biozide und Desinfektionsmittel eingesetzt wurden, war das Auftreten von Nöglerien, die aufgrund ihrer dünnwandigen Zysten sehr empfindlich sind, trotzdem recht unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Untersuchung, waren in anderen Studien häufig Hartmannellen die dominante Gattung. HSU et al. (2009) etwa untersuchten Wasser in unterschiedlichen Bereichen eines Thermalbades in einem taiwanesischen Erholungsgebiet. Dabei war *Hartmannella* mit insgesamt 35,5% (12/34) die mit Abstand häufigste Amöbengattung des untersuchten aufbereiteten Wassers, Nutzwassers und

Abwassers. Der Anteil an detektierten Legionellenspezies war mit 47,1% (16/34) viel höher als in unseren Proben. Legionellen traten auch hier syntop mit FLA, wobei am Häufigsten *Hartmannella* als Wirt fungierte.

Auch in warmem Leitungswasser (ROHR et al. 1998, TSVETKOVA et al. 2004) wurde *Hartmannella* immer wieder als die häufigste Amöbengattung beschrieben. 2007 untersuchten KUIPER et al. niederländische Flüsse und Seen auf das quantitative Vorkommen von *H. vermiformis* und konnten diese Spezies bei 75% (21/28) der Proben detektieren.

In behandeltem Wasser, wie z.B. von Kläranlagen scheint *Acanthamoeba* hingegen häufiger die dominante FLA zu sein (TSVETKOVA et al. 2004), was auch mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. All diese Studien sind jedoch nicht unmittelbar mit der vorliegenden vergleichbar, da es sich hier um verschiedene Wassersysteme und Kreisläufe handelt, in denen die unterschiedlichsten Bedingungen (Temperatur, Zirkulation, Desinfektion, pH, etc.) herrschen.

Der pH-Wert in den beprobten Wassersystemen war nahezu neutral oder höchstens schwach sauer bis schwach basisch (pH 5,26 bis 8,78). Der pH-Wert dürfte daher kaum eine Rolle in der Verteilung der FLA in den hier untersuchten Wasserproben gespielt haben. Die hier am stärksten vertretene Gattung der Akanthamöben toleriert zudem pH-Werte von 4 bis 12 (KHAN 2006).

Die Wasserproben, in denen Legionellen nachgewiesen werden konnten, waren zum größten Teil mit Desinfektionsmitteln versetzt. Da aber in denselben Proben auch *Acanthamoeba* nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass in Akanthamöbenzysten intrazellulär lebende Legionellen der Desinfektion entgehen konnten. Die betroffenen Probeentnahmestellen wiesen außerdem mit 36 bis 45°C den optimalen Temperaturbereich für die intrazelluläre Replikation der Legionellen auf. Die Vermehrung in den Akanthamöbenzellen begünstigt wiederum die Ausbildung von Resistenzen gegen bestimmte Biozide.

Wie die abschließenden Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen, ist trotz des regelmäßigen Vorkommens von Akanthamöben als äußerst geeignete Vektoren, die Häufigkeit von Legionellen in den untersuchten Wässern aus österreichischen Papiermaschinen relativ gering. In nur 2 von 28 Proben (7%), wurden Legionellenkonzentrationen von mehr als 1000 Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro 100 ml festgestellt. Diese Proben stammen allerdings aus demselben Wasserkreislauf

des Betriebs 5. Nachdem die Legionellenkonzentration von Probe 1407 so hoch war, wurde eine neuerliche Beprobung in diesem Betrieb durchgeführt. Die Untersuchung dieser Probe (2849) zeigte eine mehr als doppelt so große Konzentration von Legionellen als zuvor die Probe 1407. Einer der möglichen Gründe für diese vergleichsweise hohe Legionellendichte könnte darin bestehen, dass eine komplette Reinigung der betroffenen Systeme nur alle 7 Wochen durchgeführt wurde und auch die Desinfektion nur zeitweise (genaue Angaben fehlen) erfolgte, wodurch sich die Legionellenpopulation rasch erholen und stark vermehren konnte. Diese schnelle Rekolonisierung ist ein bekanntes Phänomen bei *L. pneumophila* und kann kurze Zeit nach einer Desinfektionsmaßnahme – wie etwa einer „Schockbehandlung“ von Wassersystemen mit großen Mengen an Chlor – erfolgen (SABY et al. 2005).

Bei Legionellenkonzentrationen ab 1000 KBE/100 ml wie sie in Betrieb 5 gemessen wurden, ist aus epidemiologischer Sicht eine Infektion nicht mehr auszuschließen. Verstärkt wird das Risiko zusätzlich dadurch, dass an dieser Probenstelle Aerosol-Abdrift auftrat. Bei weiteren 3 Proben lag die Konzentration unter 100 KBE/100 ml und ist daher als unbedenklich einzustufen.

Erwähnenswert ist auch, dass im Zuge der mikrobiologischen Untersuchung durch die Abteilung für Wasserhygiene in 10 Proben *Pseudomonas aeruginosa* detektiert wurde, wovon 8 Proben *Acanthamoeba*-positiv waren und in 2 Proben Hartmannella oder andere FLA detektiert wurden. Es wurden unterschiedliche Probenmengen bis maximal 100 ml untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Probe mit über 1000 KBE/100 ml *Legionella*-kontaminierte Probe 1407 auch auf *P. aeruginosa* positiv ist. Da *P. aeruginosa* vor allem *Acanthamoeb*en natürlich infiziert (MICHEL et al. 1995, GREUB & RAOULT 2004), werden diese Bakterien regelmäßig gemeinsam mit *Acanthamoeba* aus natürlichen und anthropogenen Wassersystemen isoliert (THOMAS et al. 2006, 2008).

Das übliche Procedere, um dem Auftreten bzw. der Vermehrung von Protozoen und Bakterien in Wasser entgegenzuwirken, ist außer der Desinfektion das regelmäßige Aufheizen solcher Wassersysteme auf mindestens 60°C bis 70°C über einen bestimmten Zeitraum. Da damit aber nicht unbedingt alle *Acanthamoeb*enzysten oder die darin überdauernden Legionellen eliminiert werden können, sind vielleicht in manchen Fällen physikalische Methoden effektiver. LORET et al. (2008) etwa verglichen verschiedene Methoden zur Beseitigung oder Inaktivierung von FLA in Trinkwasseraufbereitungsanlagen. Dabei erwies sich die Filtration als effektive Methode. Auf die von uns untersuchten und teilweise stark verschmutzten Prozesswässer ist diese

Methode aber kaum anwendbar. Andere Möglichkeiten wie Ozon-Behandlung oder UV-Bestrahlung erwiesen sich bei LORETS' Versuch zwar als geeignete Methoden zur Inaktivierung von Amöben, Legionellen in Zysten können dadurch aber wohl kaum eliminiert werden.

4.3 Sensitivität der Kultur und des molekularbiologischen Nachweises

4.3.1 Kultivierung

Aufgrund der teilweise stark verunreinigten Wasserproben kam es häufig zu rascher Verpilzung der Kulturen. Da die Wasserproben zudem verschiedenste Amöben enthielten und oftmals eine Amöbenart von einer anderen Art verdrängt wurde, stellte sich die Herstellung von Reinkulturen als schwieriger und langwieriger Prozess heraus. Insbesondere Acanthamoeben und Hartmannellen ließen sich schwer trennen. Aus Initialproben, in denen zunächst beide Gattungen detektiert wurden, gelang – auch nach häufigem Umsetzen auf frische Agarplatten – meist nur die Kultivierung einer Amöbengattung. Interessanterweise verdrängten immer die Hartmannellen die Acanthamoeben und nicht umgekehrt, was etwa bei den Proben 1411, 1420 und 1422 zu beobachten war.

Bei vereinzelterem Auftreten von Amöben und der recht kleinen Filtrationsmenge von 100 ml ist anzunehmen, dass allein durch mikroskopische Untersuchungen nicht alle Arten detektiert werden konnten. Zudem erfordert die morphologische Bestimmung der Amöbengenera ein gewisses Maß an Übung und viel Erfahrung. Unter Berücksichtigung all dieser Faktoren, ist die Kultivierung keine sehr sensitive Methode (BEHETS et al. 2006, RIVIÈRE et al. 2006).

4.3.2 *Acanthamoeba*-PCR

Von den 28 Wasserproben waren ursprünglich 11 Proben *Acanthamoeba*-positiv. Von diesen Proben konnten 7 Reinkulturen hergestellt werden und nur 5 davon waren letztlich auch in der JDP-PCR positiv.

Da die JDP-PCR als sehr sensitive Nachweismethode gilt, erfolgte die Etablierung dieser PCR auch für den Nachweis von den Filterproben.

Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von Zellen des 1BU-Stammes hergestellt,

wobei jeweils 100 ml Wasser mit je 10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen filtriert wurden. Die anschließend aus den Filterstanzen isolierte DNA konnte im PCR-Test mit den JDP-Primern in allen Verdünnungsstufen (1 µl und 5 µl) nachgewiesen werden. Die aus den Filtern ausgestanzten 3 Proben machen insgesamt nur ca. 1/14 der gesamten Filtrationsfläche aus. Das bedeutet, dass bei diesem Filtrationstest ungefähr die DNA von 72 (von 1000) Zellen isoliert und davon wiederum nur 1/100 in die PCR eingesetzt wurde. Dadurch liegt die Nachweisbarkeitsgrenze theoretisch unter einer Zelle.

Die Durchführung des gleichen Versuchs mit den Filterproben führte jedoch zu keinem Ergebnis. Dafür können verschiedene Gründe vorliegen. Die Amöbendichte in der Wasserprobe war möglicherweise sehr gering und die Verteilung der Amöbenzellen auf den Filtern ungleichmäßig, wodurch sich keine Zelle auf einer der 3 ausgestanzten Proben befand. Möglicherweise lag die Menge der eluierten DNA unter der Nachweisbarkeitsgrenze oder in der untersuchten Wasserprobe waren keine Akanthamöbenspezies.

Durch Enzystierung der Akanthamöbenspezies könnte die DNA-Isolierung bzw. die JDP-PCR auch fehlgeschlagen sein (SCHROEDER et al. 2001). Außerdem sind insbesondere in Industrierwässern eine Vielzahl von Inhibitoren zu erwarten, welche sowohl die Isolierung der DNA als auch den Ablauf der PCR beeinträchtigen können (KUIPER et al. 2006).

Selbst Proben, die in Reinkultur vorlagen und in der JDP-PCR bereits ein positives Ergebnis gezeigt hatten, waren in der Filterstanzen-PCR negativ. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass zu viele verschiedene Protozoen auf den Filterproben waren und ihre DNA in der PCR zu unspezifischen Bindungen führte und die typische Schlierenbildung in der Gelelektrophorese verursachte.

Die JDP-Primer wurden von SCHROEDER et al. 2001 mit den zu diesem Zeitpunkt bekannten Genotypen T1 bis T12 etabliert. Die hierfür verwendeten Isolate stammten nicht aus Umweltproben oder aus der Industrie, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, sondern aus Kornea-Geschabseln und Kontaktlinsenflüssigkeit von Keratitis-Patienten. Die Dichte von Trophozoiten in infiziertem Gewebe, wie etwa in einem Kornea-Geschabsel, ist unter Umständen viel größer als in Umweltproben (LEHMANN et al. 1998). Außerdem wurden zwar auch ursprünglich aus Klärschlamm isolierte Akanthamöben für die JDP-PCR-Etablierung verwendet, doch diese wurden bereits seit Jahren im Labor in axenischen Kulturen gezüchtet. Die zunächst als *Acanthamoeba*-spezifisch geltenden JDP-Primer zeigen bei der Eingabe in das BLAST-Programm der NCBI-Genbank mittlerweile Übereinstimmungen mit anderen FLA, die durchaus auch in Wasserproben vorkommen können. Wie z.B. RIVIÈRE et al. 2001 feststellten, zeigen sich etwa

Similaritäten der JDP-Primer mit *Hartmannella* (JDP1 11/22, JDP2 18/23).

Auch in anderen Studien wie z.B. von HSU et al (2009) stellte sich heraus, dass Akanthamöben, die aus verschiedenen natürlichen oder künstlichen Gewässern filtriert und kultiviert wurden, nicht mit der JDP-PCR direkt von Filtern nachweisbar sind.

Wie sich auch regelmäßig in unserem Labor zeigt, ist die JDP-PCR zwar eine sehr sensitive Methode für die Diagnostik, aber für den Akanthamöben-Nachweis aus verschiedensten Umweltproben eher ungeeignet, da es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann (WILSON 1997). Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, eine sensitivere Nachweismethode in Form einer Nested-PCR zu etablieren.

Die Nested-PCR sollte nicht nur die Sensitivität sondern auch die Spezifität für *Acanthamoeba* erhöhen, da hierbei unspezifische PCR-Produkte im zweiten PCR-Schritt nicht amplifiziert werden. Für die Etablierung der Nested-PCR, wurde diesmal keine Verdünnungsreihe eines Referenzstammes filtriert, da das Ergebnis eines Nested-PCR Tests mit einer Verdünnungsreihe aus einer Reinkultur des 1BU oder 4CI-Stammes nicht auf das Ergebnis einer PCR mit den Filterproben übertragbar gewesen wäre. Deshalb wurde die Nested-PCR direkt mit der aus den Filterstanzen isolierten DNA getestet.

Die Nested-PCR mit allen 28 Filterproben führte schließlich zu 23 positiven Ergebnissen. Dieses Verfahren erwies sich somit als deutlich sensibler als Kultivierung und JDP-PCR, denn es konnten auch Akanthamöben aus Wasserproben erfasst werden, in denen zuvor mittels Kultur keine Akanthamöben detektiert wurden. Dies lässt wiederum auf eine geringe Dichte der Akanthamöben oder bereits tote Zellen in den Wasserproben schließen.

4.3.3 *Hartmannella*-PCR

Die untere Nachweisbarkeitsgrenze bei der Etablierung der HART-PCR bei 57°C Annealing-Temperatur war niedriger als bei der JDP- oder Nöglerien-PCR und lag bei 1000 Zellen. Da bei 58°C Annealing-Temperatur jedoch mehr Proben in der PCR positiv waren als bei 57°C, ist anzunehmen, dass die Sensitivität bei 58°C höher ist und die Nachweisbarkeitsgrenze daher unter 1000 Zellen liegt. Je nach Labor und Protokoll sollte die optimale Annealing-Temperatur 3 bis 5°C unter der mittleren T_m beider Primer liegen (Firma Eurofins MWG Operon 2009, TERPE 2007), wodurch sich genau 58°C ergeben. Tatsächlich konnten die HART-Primer ja bei 58°C spezifischer binden und die PCR brachte deutlichere DNA-Banden auf dem Gel hervor. Die Probe 1407 wies auch bei 58°C noch mehrfache Banden auf, was sich vermutlich durch eine Mischkultur oder eine

falsche morphologische Differenzierung erklären lässt. Da bei der Probe 1412 keine Bande auftrat, ist anzunehmen, dass die DNA-Isolierung fehlschlug.

Obwohl die HART-PCR mit der isolierten DNA aus den *Hartmannella*-Reinkulturen sehr gut funktionierte, traf dies nicht auf den PCR-Nachweis von den Filterproben zu. Auch hier trat das Problem auf, dass die Filterstanzen-PCR selbst bei Proben, die bereits in Reinkultur vorlagen und in der HART-PCR positiv waren, meist zu keinem Ergebnis führte. Im Gegensatz zur JDP-PCR, trat jedoch bei der HART-PCR von den Filtern bei einer Probe eine Bande auf. In dieser Probe (1420) wurden bereits in Kultur und durch PCR Hartmannellen nachgewiesen. Da sich in derselben Wasserprobe auch Acanthamoeben und andere FLA befanden ist anzunehmen, dass die HART-PCR so *Hartmannella*-spezifisch ist, dass der Ablauf nicht durch DNA anderer Protozoen gestört wird, wie es etwa bei der JDP-PCR der Fall war.

Da die Filterproben-PCR mit den anderen *Hartmannella*-positiven Proben allerdings negativ ausfiel, waren wahrscheinlich zu wenig Zellen auf den Filtern und die eluierte DNA unter der Nachweisbarkeitsgrenze.

4.3.4 *Naegleria*-PCR

Die *Naegleria*-PCR erwies sich bei ihrer Etablierung als äußerst sensitiv mit einer Nachweisbarkeitsgrenze unter 10 Zellen bei jeder Titrationsstufe (1 µl, 3 µl und 5 µl DNA). Der PCR-Test auf Näglerien wurde mit sämtlichen Filterstanzen durchgeführt und führte nur zu einem positiven Ergebnis. Da in Kultur keine Amöben dieser Gattung in den Proben detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass 27 von 28 Proben tatsächlich frei von Näglerien waren.

4.4 Sequenzieren

Die Tatsache, dass das Sequenzieren der JDP-PCR-Amplimere nur bei 2 von 7 Reinkulturen gelang und eine Zuordnung zu Genotyp T4 erlaubte, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es sich bei den anderen 5 Proben um Mischkulturen verschiedener Genotypen handelte. DE JONCKHEERE (2007) beschrieb ähnliche Probleme bei der Genotypisierung von *Acanthamoeba*-Stämmen, die er aus verschiedenen Gewässern in Arizona isoliert hatte. Dabei traten in einer Probe 2 verschiedene Genotypen (T4 und T5) und eine weitere Amöbenspezies auf. Sequenzen verschiedener Genotypen können einander überlagern, was dazu führt, dass das Sequenziergerät nicht

in der Lage ist, eine einzelne Sequenz zu lesen.

Von den 10 aufgereinigten Amplimeren der Nested-PCR konnten 4 sequenziert werden. Die Amplimere wurden auf Höhe der T4-Positivkontrolle ausgeschnitten und das Sequenzieren ermöglichte eine Zuordnung zu Genotyp T4. Nicht nur T4 hat aber ungefähr ein 180 bp langes Amplikon in der Nested-PCR, sondern auch andere Genotypen wie T1, T3, T9, T10, T11 oder T14, was bedeutet, dass auch hier die Banden verschiedener Genotypen einander überlagern könnten. Es ist daher ratsam, die Gelelektrophorese so lange wie möglich laufen zu lassen, um eine optimale Auftrennung der Amplimere zu erreichen. Nach BOOTON et al. (2005) gehören jedoch ungefähr die Hälfte aller aus Umweltproben isolierten *Acanthamoeba* dem Genotyp T4 bzw. dem Genotyp-Cluster T3/T4/T11 an (GAST et al. 1996, STOTHARD et al. 1998). Wie zu erwarten, konnten auch im Zuge unserer Studie alle *Acanthamoeba* bei denen eine Genotypisierung gelang (21% bzw. 6/28), T4 zugeordnet werden.

Andere Genotypen wie etwa T2 (GAST et al. 1996), der mit T6 (STOTHARD et al. 1998) einen Cluster bildet, sind zwar ebenfalls annähernd so häufig in Umweltisolaten zu finden wie T4 (BOOTON et al. 2005), allerdings eher in wärmeren Gegenden wie dem Iran (MAGHSOOD 2005). In der hier etablierten Nested-PCR würde T2 ein um ca. 20 bp kürzeres Amplikon und eine Sequenzdissimilarität von mehr als 25% zu T4 aufweisen.

Acanthamoeba-Spezies des Genotyps T1 (GAST et al. 1996) sowie des Genotyp-Clusters T7/T8/T9 (STOTHARD et al. 1998) wurden z.B. von LORENZO-MORALES (2005 und 2006) aus Süßwasser, Meerwasser oder auch Leitungswasser isoliert und HSU et al. (2009) detektierten T1 auch in Thermalquellenwasser. All diese Wasserproben sind jedoch nicht mit den in unserer Studie untersuchten Industrierwässern vergleichbar, denn bei den von BOOTON, HSU, MAGHSOOD oder LORENZO-MORALES untersuchten Proben, handelte es sich durchgehend um unbehandelte oder kaum behandelte Wässer, die wohl auch viel sauberer waren.

Spezies aus dem Cluster T10/T12/T14 (STOTHARD et al. 1998, GAST 2001) dagegen wurden bislang noch nie in Umweltproben oder künstlichen Feuchthabitaten nachgewiesen (BOOTON et al. 2005, VISVESVARA et al. 2007), und waren daher auch kaum in den hier untersuchten Industrie-Wasserproben zu erwarten. Der Genotyp T15 (HEWETT et al. 2003) wird seit kurzem auch mit Keratitis assoziiert (DI CAVE 2009) und wurde einmal aus Umweltproben isoliert. Dieser Genotyp unterscheidet sich allerdings stark von allen anderen Genotypen.

Der Genotyp T5 wird häufig aus der Umwelt isoliert (BOOTON et al. 2005 und 2004). Meist kann man diesen Typ schon am Agarosegel von anderen Genotypen unterscheiden, da

sein Amplikon z.B. in der Nested-PCR mit einer ungefähren Länge von 130 bp ca. 30 bp (zu T6) bis 60 bp (zu T15) kürzer ist als das der anderen Genotypen. Diese Banden traten auch hier auf, wurden jedoch zunächst falsch interpretiert und nicht ausgeschnitten. Da keine von den entsprechenden Filtern isolierte DNA mehr vorhanden war, konnte die Nested-PCR für eine neuerliche Genotypisierung nicht wiederholt werden. Als meine Kollegin PECAVAR (2009) im Zuge ihrer Diplomarbeit zu einem späteren Zeitpunkt die Nested-PCR ebenfalls zur Identifizierung von *Akanthamoeben* nutzte, und dabei Amplimere derselben Größe erhielt, wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Aufgrund ihrer Sequenzier-Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen 130 bp langen Nested-PCR-Produkten tatsächlich um den Genotyp T5 handelte. Das bedeutet, dass 18 von 28 Proben (64%) auf T5 positiv waren und T5 in den untersuchten Industrie-Wassersystemen den dominanten Genotyp darstellte. PECAVAR (2009), die Kloaken- und Maul-Abstriche von 57 Reptilien untersuchte, konnte mittels Nested-PCR und Sequenzieren 33% (18/54) der Amplimere dem Genotyp T5 zuordnen. Auch hier war T5 am Häufigsten, gefolgt von T4 mit 26% (14/54).

Die hohe Similarität innerhalb der oben beschriebenen Genotyp-Cluster bezieht sich auf das gesamte 18S rRNA-Gen (STOTHARD et al. 1998), gilt aber auch für die ASA.S1-Region die durch die JDP-Primer begrenzt wird (SCHROEDER et al. 2001). Die Amplimere der hier etablierten Nested-PCR sind viel kürzer und enthalten auch nur einen dieser variablen Bereiche. Möglicherweise kann man zwar mit der Nested-PCR mehr Genotypen erfassen als mit der JDP-PCR, die Aussagekraft beim Vergleich eines Sequenzbereichs dieser Größe ist aber eventuell nicht so groß.

Bei der Sequenzierung der *Hartmannella*-Proben ergaben sich Sequenzen mit maximal 50% Länge des gesamten HART-Amplimers. Aufgrund der morphologischen Merkmale konnten die Amöben dieser Proben jedoch der Art *H. vermiformis* (PAGE 1967) zugeordnet werden, was auch durch die Analyse der Teilsequenzen bestätigt werden konnte. Dieses Ergebnis ist nicht sehr überraschend. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den Hartmannellen in den untersuchten Proben um *H. vermiformis* (PAGE 1967) handelt ist am Größten, da diese weltweit und ubiquitär verbreitete Art regelmäßig aus Umweltproben und künstlichen Wassersystemen aber auch z.B. aus Fischen isoliert wird (ROHR et al. 1998, DYKOVÁ et al. 2005, Hsu et al. 2009). *H. cantabrigiensis* (PAGE 1974) ist dagegen viel seltener. Die anderen Spezies wurden ebenfalls selten und nur aus marinen Habitaten isoliert, so z.B. *H. abertawensis* (PAGE 1980) oder *H. vacuolata* (ANDERSON, ROGERSON & HANNAH 1997) deren jeweilige Stellung im System zudem noch

unsicher ist.

4.5 Schlussfolgerungen

FLA insbesondere Akanthamöben aber auch Hartmannellen waren in den untersuchten Prozesswässern weit verbreitet und kamen dort auch syntop mit Legionellen vor. Das traf jedoch nicht auf Nöglerien zu, denn für diese Amöben herrschten keine geeigneten Bedingungen.

FLA sind maßgeblich an der Bildung von Biofilmen z.B. in künstlichen Wassersystemen beteiligt und können dort einerseits als Prädatoren und andererseits als Reservoir für pathogene Bakterien wie *L. pneumophila* und *P. aeruginosa* dienen. Die Kontrolle des Amöbenwachstums und der Biofilm-Bildung stellen daher eine wichtige Präventionsmaßnahme bei der Bekämpfung der Legionellen dar. Die Detektion und die Identifizierung dieser Amöben sind jedoch nicht nur wichtig weil sie als Reservoir für Bakterien dienen, sondern auch wegen ihrer Rolle als aktive Pathogene. *N. fowleri* kann bei völlig immungesunden Menschen PAME verursachen wohingegen *Acanthamoeba* opportunistische Infektionen des Gehirns (GAE), der Haut und der Lunge verursachen kann. Nicht zuletzt ist *Acanthamoeba* auch der Verursacher einer schweren Keratitis bei Kontaktlinsenträgern.

Da die Differenzierung der Amöbengenera durch Mikroskopie und das anschließende Herstellen von Reinkulturen nicht immer gelingen, ist ein zusätzlicher direkter molekularbiologischer Nachweis vom Filter ein großer Vorteil. Offenbar waren die Amöbendichten in den von uns untersuchten Wasserpöben gering. Erst die für den spezifischen Nachweis von Akanthamöben entwickelte Nested-PCR erwies sich als sensitive qualitative Nachweismethode. Für die rasche Detektion von Hartmannellen und Nöglerien von Filtern wären daher jeweils äquivalente PCR-Systeme von Nutzen, wie etwa die von KUIPER et al 2006 etablierte real-time PCR zur Detektion von *H. vermiformis*. Da ein Gemisch aus organischen und anorganischen Substanzen auf den Filterproben störend auf die Abläufe bei der DNA-Isolierung oder bei der DNA-Amplifizierung wirken kann (WILSON 1997), sollten eventuell andere DNA-Extraktions-Kits ausprobiert werden (z.B. KUIPER et al. 2006).

Für die Identifizierung der Hartmannellen erwies sich die dafür entwickelte PCR mit den neu designten HART-Primern als äußerst sensitive Methode.

Auch die *Naegleria*-spezifische PCR eignete sich gut zur Identifizierung von Näglerien aus einer Kultur.

Insgesamt wäre für die Untersuchung von Prozesswässern auf FLA die Anwendung einer direkten und quantitativen Nachweismethode für die relevanten Amöbengenera von Vorteil. Eine dafür geeignete Methode wäre etwa eine real-time PCR, wie sie von RIVIÈRE et al. 2006 etabliert wurden. Dieses PCR-System ist ebenso wie die Nested-PCR geeignet, weniger als 10 *Acanthamoeba*-Zellen direkt vom Filter nachzuweisen, bietet aber auch den Vorteil einer Quantifizierung nicht nur von Trophozoiten sondern auch von Zysten. Allerdings ist diese Methode viel kostenintensiver und muss zudem erst noch mit Umweltproben oder Proben aus Industrielwässern getestet werden.

Viele molekularbiologische Methoden zur Detektion von Acanthamöben, Hartmannellen und Näglerien wurden für den Nachweis aus klinischen Proben etabliert und sind daher für den Nachweis aus Umweltproben und künstlichen Gewässern meist zu wenig sensitiv oder zu unspezifisch.

Teilweise wurden aber bereits molekularbiologische Methoden zur Untersuchung von Proben aus künstlichen Wassersystemen entwickelt. BEHETS et al. etablierten 2007 etwa eine duplex real-time PCR zur direkten Detektion und Quantifizierung von *N. fowleri*. Hierbei wurden Kühlwasserproben aus belgischen Industrieanlagen untersucht, die also durchaus vergleichbar mit unseren Proben waren. Allerdings wird bei dieser PCR nur die Spezies *N. fowleri* detektiert und bei zu geringer Zellzahl erwies sich die Zellkultivierung als unerlässlich.

Eine *Hartmannella vermiformis*-spezifische quantitative PCR wurde vor kurzem von VALSTER et al. (2009) entwickelt. Die Methode wurde zur Detektion dieser Amöbenspezies in einem Trinkwasserspeicher etabliert. Da sich diese PCR aber offenbar auch für den Nachweis von *H. vermiformis* aus Biofilmen eignete, wäre diese Methode auch auf Prozesswasserproben aus der Industrie anwendbar.

Eine weitere interessante Möglichkeit wäre die Etablierung einer Multiplex-PCR. Mit dieser Methode könnte man *Acanthamoeba*, *Hartmannella* und *Naegleria* parallel in nur einem PCR-Schritt in einer Probe nachweisen. Eine vergleichbare Multiplex-PCR wurde etwa für den simultanen Nachweis von *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* und *Acanthamoeba* spp. in der klinischen Diagnose etabliert (QVARNSTROM et al. 2006).

Das Probenwasser war zum Teil durch den hohen Gehalt an organischen (TOC-Gehalt „total organic carbon“) und anorganischen Substanzen (z.B. Nitrat) stark verschmutzt und wies starke Schleimbildung auf, weshalb nicht mehr als 100 ml auf einmal filtriert werden

konnten ohne die Filterporen zu verstopfen.

Eine andere Möglichkeit der Probengewinnung bei stark verschmutzten Wasserproben stellt das Abzentrifugieren dar. Das dabei entstehende Pellet wird anschließend resuspendiert und auf eine Agarplatte überführt. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass möglicherweise noch mehr Schmutz und auch Bakterien, die beim Filtrieren vielleicht abgesaugt worden wären, auf die Agarplatte gelangen können. Das wiederum führt zu rascherer Verpilzung oder Lyse der Amöbenzellen durch Bakterien und erschwert die Herstellung von Reinkulturen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Akanthamöben, Hartmannellen und Näglerien sind ubiquitäre, primär frei lebende aerobe Amöben und ausgesprochene Kosmopoliten. Sie besiedeln Feuchthabitate wie Flüsse, Seen und feuchte Erde und sind ein wesentlicher Bestandteil von Biofilmen. Als Prädatoren spielen freilebende Amöben (FLA) in solchen mikrobiellen Biozönosen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Bakterienpopulationen. Da insbesondere Akanthamöben und Hartmannellen äußerst resistente Zysten bilden, findet man diese Amöben nicht nur in aquatischen Habitaten sondern auch in trockener Umgebung.

In der Medizin spielen freilebende FLA der Gattungen *Acanthamoeba* und *Naegleria* eine Rolle als fakultative Pathogene. Akanthamöben können opportunistische Infektionen bei Immunsupprimierten (Granulomatöse Amöbenencephalitis) aber auch Infektionen bei Immungesunden (*Acanthamoeba*-Keratitis) verursachen. Die *Naegleria*-Spezies *N. fowleri* kann bei völlig immungesunden Menschen eine schwere Infektion auslösen (Primäre Amöbenmeningoenzephalitis).

Seit einiger Zeit ist allerdings bekannt, dass diese FLA nicht nur als aktive Pathogene eine Rolle spielen, sondern auch als Vektoren und Reservoir diverser pathogener Bakterien fungieren. Besondere Bedeutung kommt ihnen als Wirte des Erregers der Legionärskrankheit, *Legionella pneumophila* zu. Vor allem Amöben der Gattungen *Acanthamoeba* und *Hartmannella* bieten intrazellulär lebenden und replizierenden Legionellen Schutz vor Desinfektion, Temperaturschwankungen oder Austrocknung. Außerdem spielen diese FLA für *L. pneumophila* eine wichtige Rolle für die Ausbildung bestimmter Virulenzeigenschaften.

FLA und Legionellen sind nicht nur in Biofilmen natürlicher Feuchthabitate sondern auch in anthropogenen Habitaten vorzufinden. Eine Infektion mit *L. pneumophila* kann über das Einatmen von bakteriengefüllten Aerosolen erfolgen. Thermalbäder, Hotels und Spitäler sind ebenso von solchen Legionellose-Ausbrüchen betroffen, wie auch Industriezweige, in denen Arbeitsprozesse an ein System von Wasserkreisläufen gekoppelt sind. Infektionsquellen im industriellen Bereich stellen vor allem Kühltürme, Kondensatoren, Luftwäscher und Luftbefeuchter dar. Aufgrund mehrerer Legionellose-Ausbrüche in der europäischen Holz- und Papierindustrie innerhalb der letzten Jahre, wurde ein fächerübergreifendes Forschungsprojekt zur Untersuchung von Prozesswasser-Proben auf Legionellen initiiert. Im Rahmen der vorliegenden Studie

sollten Wasserproben aus der Papierindustrie auf das Vorkommen potentieller Legionellen-Vektoren untersucht werden. Das Ziel bestand in der qualitativen Erfassung von FLA, insbesondere von Acanthamoeben- und Hartmannellenspezies in Wasserproben, speziell in *Legionella*-positiven Wasserproben. Nglerien sollten vor allem aufgrund ihrer Humanpathogenität zusätzlich erfasst werden.

Insgesamt wurden 28 Wasserproben aus 16 verschiedenen Betrieben untersucht. Um einen zuverlässigen Nachweis der Amöben zu ermöglichen, wurde ein doppeltes Nachweisverfahren gewählt. Dabei wurden alle Proben im Parallelansatz, einerseits mittels Kultur und andererseits mittels molekularbiologischer Methoden, untersucht. Nach Filtration der Wasserproben wurden die Amöbengenera in Kultur im Phasenkontrast morphologisch detektiert und differenziert. Für die molekularbiologische Detektion wurden sowohl Primer aus der Literatur und bereits etablierte PCR-Systeme verwendet als auch neue spezifische Primer entwickelt und neue PCR-Systeme etabliert. Abschließend wurden alle PCR-Produkte sequenziert und in Folge die *Acanthamoeba*-Spezies genotypisiert.

Insgesamt konnten in 27 von 28 (96%) Wasserproben FLA nachgewiesen werden. *Acanthamoeba* war mit 89% (25/28) die mit Abstand häufigste Gattung, gefolgt von diversen FLA wie Echinamöben und Vahlkampfen in 9 von 28 (32%) Proben. Die Gattung *Hartmannella* wurde nur in 21% (6/28) der Wasserproben gefunden. *Naegleria* war nur in einer Probe nachweisbar, jedoch nicht spezifizierbar. In 39% der Proben (11/28) wurden mehrere Amöbengenera detektiert. Insgesamt waren 5/28 Wasserproben (18%), die aus 4 verschiedenen Betrieben stammten, positiv auf apathogene *Legionella* spp. 3 dieser 5 Proben waren zusätzlich mit *L. pneumophila* kontaminiert, wovon wiederum 2 Proben Spezies der hochinfektiösen Serogruppe 1 enthielten. In allen 5 *Legionella*-positiven Proben waren auch Acanthamöben nachweisbar. Eine dieser 5 Proben war *Naegleria*-positiv und in 2 Proben wurden auch noch andere FLA detektiert. In einer Probe mit Legionellen, wurden neben den Acanthamöben und anderen FLA auch Hartmannellen gefunden.

Trotz verschiedener Maßnahmen von Seiten der Betriebe, wie Desinfektion, Zirkulation oder periodischen Aufheizens waren vor allem Acanthamöben aber auch Hartmannellen in den untersuchten Prozesswässern weit verbreitet und traten auch syntop mit Legionellen auf. Nglerien spielten insgesamt in den untersuchten Wassersystemen eine geringere Rolle.

Die Kultivierung der *Acanthamoeba*-Spezies und die Typisierung der jeweiligen Isolate waren nicht immer erfolgreich. Der direkte Nachweis vom Filter mit der hierfür etablierten Nested-PCR erwies sich hingegen als äußerst sensitive Methode. Für den

Nachweis von *Hartmannella* stellte die dafür entwickelte spezifische PCR ebenfalls eine sehr sensitive Methode dar.

Der Nachweis potentiell humanpathogener freilebender Amöben in Betrieben der österreichischen Papierindustrie ist jedenfalls in Bezug auf die Betriebssicherheit von hygienischer und medizinischer Relevanz.

6 ANHANG

6.1 Kurzzusammenfassung

Untersuchung von Wasserproben aus der Industrie auf freilebende Amöben

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand in der qualitativen Erfassung von Akanthamöben, Hartmannellen und Näglerien in Wasserproben aus der Papierindustrie. Diese aeroben Amöben sind primär frei lebend (FLA) und ausgesprochene Kosmopoliten. *Acanthamoeba* und *Naegleria* spielen eine Rolle als fakultative Pathogene. Die *Naegleria*-Spezies *N. fowleri* ist der Erreger der Primären Amöbenmeningoenzephalitis. Akanthamöben können sowohl eine opportunistische Infektion bei Immunsupprimierten (Granulomatöse Amöbenenzephalitis) verursachen als auch eine Infektion bei Immungesunden (*Acanthamoeba*-Keratitis) auslösen. Darüber hinaus ist seit einiger Zeit bekannt, dass insbesondere Akanthamöben und Hartmannellen auch als Vektoren und Reservoir für den Erreger der Legionärskrankheit, *Legionella pneumophila*, fungieren können. Aufgrund des Auftretens von Legionellose-Fällen in der europäischen Papierindustrie, wurde ein fächerübergreifendes Forschungsprojekt zur Untersuchung von Prozesswasser-Proben auf Legionellen initiiert.

Um einen zuverlässigen Nachweis der Amöben zu ermöglichen, sollten alle Proben im Parallelansatz, einerseits mittels Kultur und andererseits mittels molekularbiologischer Methoden, untersucht werden. Hierfür mussten auch neue Genus-spezifische PCR-Systeme etabliert werden. Die äußerst polymorphen *Acanthamoeba*-Spezies sollten zusätzlich mittels Sequenz-Analyse genotypisiert werden.

Insgesamt wurden 28 Wasserproben aus 16 verschiedenen Betrieben untersucht. Dabei konnten in 27 von 28 Wasserproben FLA nachgewiesen werden. *Acanthamoeba* war mit 89% die mit Abstand häufigste Gattung, gefolgt von diversen FLA, wie Echinamöben und Vahlkampfen, in 32% der Proben. Vertreter der Gattung *Hartmannella* wurden in 21% der Wasserproben gefunden, und *Naegleria* war nur in einer Probe nachweisbar. In 39% der Proben wurden mehrere Amöbengenera detektiert. Insgesamt waren fünf von 28 Wasserproben (18%) positiv auf *Legionella* spp. In allen fünf Proben waren auch Akanthamöben nachweisbar. In einer dieser fünf *Legionella*-positiven Proben wurden außerdem Hartmannellen detektiert und in einer Probe war *Naegleria* sp. nachweisbar.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass FLA, insbesondere Amöben der Gattung *Acanthamoeba*, in Industriebässern weit verbreitet sind, dass sie syntop mit Legionellen vorkommen und dass sie vermutlich eine wesentliche Rolle in der Verbreitung der Legionellen spielen.

6.2 Abstract

Investigation of industrial water samples for free-living amoebae

Due to recent cases of legionellosis in the European paper industry, a interdisciplinary project for investigation of process water has been initiated. The aim of the study was to investigate *Acanthamoeba*, *Hartmannella* and *Naegleria* in water samples from the Austrian paper industry. Members of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria* are facultative pathogens. *Naegleria fowleri* is known as the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis. *Acanthamoeba* species can cause an opportunistic infection in immunocompromised hosts (granulomatous amoebic encephalitis) as well as in immunocompetent humans (*Acanthamoeba*-keratitis). Furthermore free-living amoebae (FLA), particularly acanthamoebae and hartmannellae, can serve as vectors and reservoir for *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaires' disease.

To ensure a reliable detection, all the samples were investigated by cultivation and molecular biological techniques in parallel. For this reason genus-specific PCR methods were established. Additionally sequence analysis was introduced to determine *Acanthamoeba* genotypes.

A total of 28 water samples from 16 factories were examined, with 27 samples being positive for FLA. *Acanthamoeba* species were prevalent with 89%, followed by 32% of diverse FLA like echinamoebae and vahlkampfiæ. *Hartmannella* was observed in 21% of the samples and *Naegleria* sp. was only detected once. 39% of the samples were positive for several genera of amoebae. In 18% (five of 28) of the samples *Legionella* spp. were present and co-occurred with *Acanthamoeba*. *Hartmannella* and *Naegleria* were present in one of five *Legionella*-positive samples, respectively.

These results show that FLA, particularly *Acanthamoeba*, are common in process water and occur syntopically with *Legionella* spp. These findings confirm the role of FLA for the distribution of legionellæ.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

A: Adenin
AE: Elutionspuffer
AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK: *Acanthamoeba*-Keratitis
ATL: Tissue Lysis Puffer
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
bp: Basenpaar
C: Cytosin
ca.: circa
cm²: Quadratzentimeter
CT: Computertomographie
°C: Grad Celsius
ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser
DNA: Deoxiribonukleinsäure
dNTP: Dideoxinukleotid-Triphosphat
EDTA: Ethylendiamintetraacetat
EDTA: Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Eppi: Eppendorf-Reaktionsgefäß
ER: endoplasmatisches Retikulum
etc.: et cetera
FISH: Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
FLA: Freilebende Amöben
g: Erdschwerebeschleunigung
G: Guanin
GAE: Granulomatöse Amöbenenzephalitis
HE: Haematoxylin-Eosin
HIV: Human Immunodeficiency Virus
IIF: indirekter Immunofluoreszenz
i.w.S.: im weiteren Sinne
KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat
LPCB: Lactophenol-Cottonblue Färbung
LLAP: Legionella-like amoebal pathogen
MgCl₂: Magnesiumchlorid
min: Minute (engl.)

ml: Milliliter
 mM: Millimol
 MRT: Magnetresonanztomographie
 µl: Mikroliter, ein Tausndstel Milliliter (0,001 ml)
 µm: Mikrometer, ein Tausendstel Millimeter (0,001 mm)
 µM: Mikromol, ein Tausendstel Millimol (0,001 mM)
 Na₂HPO₄: Dinatriumhydrogenphosphat
 NaCl: Natrium-Chlorid
 NCBI: National Center for Biotechnology Information
 ng: Nanogramm
 nm: Nanometer
 NN-Agar: NonNutrient-Agar
 PAME: Primäre-Amöben-Meningoenzephalitis
 PBS: Phosphate Buffered Saline
 PCR: Polymerase-Chain-Reaction (=Polymerase Kettenreaktion)
 PHMB: Polyhexamethylenbiguanid
 pmol: Pikomol
 PYG: Proteose-Peptone-Yeast extract-Glucose
 rDNA: ribosomale DNA
 rER: raues endoplasmatisches Retikulum
 RNA: Ribonukleinsäure
 rRNA: ribosomale RNA
 sp.: Spezies
 spp.: Plural von Spezies
 SSU rRNA: small subunit (kleine Untereinheit) rRNA
 T: Thymin
 TAE: Tris-Acetat-EDTA-Puffer
 u.a.: unter anderem
 U/µl: Units pro µl
 UV: ultraviolettes Licht
 V: Volt
 VIS: (visible) sichtbares Licht
 z.B.: zum Beispiel
 ZNS: Zentrales Nervensystem

6.4 Glossar

18S rRNA: ribosomale RNA der kleinen (40S-) Untereinheit des eukaryotischen Ribosoms.

***Acanthamoeba*:** Gattungsname freilebender Amöben, die der Familie der Acanthamoebidae angehören; einige Arten fakultativ pathogen, Erreger der GAE und der *Acanthamoeba*-Keratitis.

***Acanthamoeba*-Keratitis (AK):** Infektion der Kornea durch Akanthamöben, die ausgehend von Ulzera der Kornea bis zur Blindheit führen kann. Die Verwendung von Kontaktlinsen ist prädisponierend.

Adenin (A): 6-Aminopurin, Purin-Abkömmling; eine der vier Basen der Nukleinsäuren.

Adhäsion: Anhaftung.

aerob: Bezeichnung für Lebensvorgänge, für die die Gegenwart von Sauerstoff nötig ist.

Agarose: Aus Meeresalgen extrahierte, geleeartige Matrix, mit der man im Rahmen einer Elektrophorese Nukleinsäuren auftrennt.

Alignment: Vergleich von zwei oder mehreren Sequenzen mittels algorithmischer Verfahren.

Alinierungsprojekt: siehe Alignment.

alveoläre Makrophagen: sessile (ortsständige) Makrophagen der Lungenbläschen (Alveolen).

Amöben: Sammelbezeichnung für einzellige Eukaryoten ohne feste Gestalt; ihr einziges gemeinsames Merkmal ist die amöboide Fortbewegung; polyphyletisch.

amphizoisch: sowohl parasitisch als auch frei lebend vorkommend.

Amplifizierung: Prozess, in dem die Anzahl (der Kopien) eines bestimmten DNA-Moleküls in einer PCR vervielfältigt wird.

Antibiotikum (Pl. -a): Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze), das in geringen Konzentrationen andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmt.

Antimykotikum (Pl. -a): Medikamente, die bei Infektionen mit humanpathogenen Pilzen angewendet werden

apathogen: nicht krankheitserregend.

Apoptose: programmierter, durch Genexpression von der Zelle selbst gesteuerter „natürlicher“ Zelltod.

Art, Spezies: Fortpflanzungsgemeinschaft; umfaßt alle Populationen, deren Angehörige untereinander faktisch oder potentiell kreuzbar und von den Angehörigen anderer Populationen reproduktiv isoliert sind (biologischer Artbegriff).

axenisch: keimfrei – ohne fremde Organismen.

Biopsie: Entnahme und anschließende histologische (gewebe-) bzw. zytologische (zelluläre-) Untersuchung einer Gewebeprobe am Lebenden; etwa durch Punktion mit einer Hohlnadel

Bulbus olfactorius: ist ein vorgestülpter Gehirnabschnitt, der direkt unterhalb des Frontalhirns liegt und der Geruchswahrnehmung dient. Die Riechnerven (Nervi olfactorii) der Riechschleimhaut in der Nase enden am Riechkolben.

Caecum: „Blinddarm“; sackförmig ausgestülpter Anfangsteil des Dickdarms.

cerebelläre Ataxie: nicht-muskuläre Störung der Bewegungsabläufe und der Haltung, verursacht durch Schädigung des Kleinhirns

Cerebellum: Kleinhirn

chronisch: sich langsam entwickelnd, langsam verlaufend.

Cluster: Menge von einzelnen Teilen, die ein Ganzes bilden; oder auch Molekülgruppen, die eine starke innere Bindung aufweisen; hier: *Acanthamoeba*-Stämme, die in einem Cladogramm (graphische Darstellung einer Merkmalsanalyse) aufgrund ähnlicher Sequenzen eine Gruppe bilden.

Corpus callosum: (sog. „Balken“) quer verlaufende Nervenfaserverbindung zwischen den beiden Großhirnhemisphären, die den größten Teil des Kommissurensystems bildet.

Cortex cerebri: Großhirnrinde

Cytosin (C): 2-Hydroxy-4-amino-pyrimidin; Pyrimidin-Abkömmling, eine der vier Basen der Nukleinsäuren.

DNA (desoxyribonucleic acid), DNS: Desoxyribonukleinsäure, Träger der Erbinformation. DNA ist ein Polynukleotid, ein Nukleotid setzt sich aus einem Zucker (Desoxyribose), einem Phosphatrest und einer der vier Basen, Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin, zusammen. DNA liegt aufgrund der Basenpaarung als Doppelstrang vor. Der Informationsgehalt der DNA ist in allen Körperzellen eines Individuums identisch.

Elektrophorese: Verfahren, das Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität in einem elektrischen Feld auftrennt. Agarose- und Polyacrylamidgele eignen sich für eine elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren.

Endophtalmitis: Entzündung der Augenhöhle und angrenzender Strukturen.

Endoplasmatisches Retikulum (ER): Zellorganell; reich verzweigtes Membransystem im Zytoplasma. In der Zelle erfüllt es vor allem Synthese- und Speicheraufgaben. Man unterscheidet das mit Ribosomen besetzte rauhe endoplasmatische Retikulum (RER) vom "nackten" glatten endoplasmatischen Retikulum (SER).

Endosymbiont: Organismus, der innerhalb (intrazellulär oder interzellulär) eines Individuums einer anderen biologischen Art lebt; intrazelluläre E. werden auch als **Endozytobionten** bezeichnet.

Eukaryota, Eukaryoten: ein- bis vielzellige Organismen, deren Zellen einen Membran-umhüllten Zellkern sowie weitere Zellorganellen besitzen. Zu den E. gehören Protozoen, Algen, Pilze, Pflanzen und Tiere.

Exsudat: entzündliche Absonderungen.

fakultativ: unter gewissen Umständen; nicht verbindlich; Ggs. obligatorisch.

Flagellata, Flagellaten: früher auch „Geißeltiere“ od. „Mastigophora“; mikroskopisch kleine, begeißelte, bewegliche eukaryotische Einzeller; polyphyletisch.

GAE (Granulomatöse Amöbenenzephalitis): durch freilebende Amöben (*Acanthamoeba* spp. und *Balamuthia mandrillaris*) verursachte chronische Entzündung des Gehirns.

Genotyp: aufgrund der prozentuellen Übereinstimmung der 18S rDNA-Sequenz zusammengefasste Gruppe von *Acanthamoeba*-Stämmen.

gramnegativ: Eigenschaft der Zellwand von Bakterien. Ergibt in der nach dem dänischen Pathologen H.C. GRAM benannten Färbung blassrosa bis rot. Grampositive Bakterien erscheinen tief blau-violett.

Guanin (G): 2-Amino-6-hydroxipurin, Purin-Abkömmling; eine der vier Basen der Nukleinsäuren.

Hartmannella: freilebende Amöben der Gattung *Hartmannella*.

Hemiparese: halbseitige Lähmung.

incertae sedis: von unsicherer phylogenetischer Position.

Infusoria: „Aufgusstierchen“; alte Bezeichnung für einzellige (teilweise auch für kleine mehrzellige) Tiere, die sich in einem Aufguss (= Infusion) bilden.

intrazellulär: innerhalb der Zelle.

Keratitis: Entzündung der Hornhaut des Auges.

kokkoide Bakterien: kugelförmige Bakterien.

kontraktile Vakuole: pulsierende Vakuole; Ausscheidungsorganellen von Protozoen (und einigen Schwämmen); transportieren je nach Konzentrationsgefälle mehr oder weniger regelmäßig Wasser aus der Zelle heraus.

Konvergenz: gegenseitige Annäherung, unabhängige Entwicklung ähnlicher Merkmale bei verschiedenen Spezies in Anpassung an ähnliche Umweltfaktoren.

Kornea: Hornhaut des Auges.

Limax-Amöben: Der Name wurde auf die Fortbewegungsweise einiger frei lebender Amöben bezogen, die der der Limax-Schnecke ähnelten und umfasste unter anderem die Gattungen *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* und *Balamuthia*. Allerdings kommt diesem Begriff bis heute keinerlei systematische Bedeutung zu.

Lysosomen: Kompartimente der Zelle, welche Enzyme (Lysozyme) zur Auflösung von Nahrungssubstanzen enthalten.

lytisch: Eigenschaft eines Parasiten, seine Wirtszelle bei der Infektion zu zerstören.

Makrophagen: große, amöboid bewegliche, einkernige Zellen, der körpereigenen Immunabwehr, phagozytieren unspezifisch körperfremde Elemente.

Mitose: Kernteilung (mit meist nachfolgender Zellteilung) mit vorangehender Verdoppelung des Chromosomensatzes. Jede Tochterzelle erhält einen vollständigen Chromosomensatz.

monophyletisch: von einem gemeinsamen Vorfahren abstammend.

Myometrium: die mittlere, aus glatter Muskulatur bestehende Schicht der Wand der Gebärmutter.

Naegleria: freilebende Amöben der Gattung *Naegleria*; Erreger der PAME.

nekrotisch: "abgestorben" oder "im Stadium der Nekrose befindlich".

Nukleolus: Kernkörperchen.

Nukleotid: chemische Grundbausteine der DNA; setzt sich aus einer Base, einem Zuckerrest und drei Phosphatgruppen zusammen. Bei der DNA- bzw. RNA-Synthese werden N. miteinander über eine Phosphodiesterbindung verknüpft. Dabei werden zwei Phosphatgruppen abgespalten. Ein DNA-N. enthält eine der 4 organischen Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, eine Desoxyribose und einen Phosphatrest; ein RNA-N. eine der 4 organischen Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Uracil, eine Ribose und einen Phosphatrest.

Nukleus: Zellkern; von mindestens zwei Membranen umhülltes Organell, das den größten Teil der genetischen Information einer eukaryotischen Zelle enthält.

obligat, obligatorisch: verbindlich, verpflichtend, notwendig; Ggs. fakultativ.

Operculum: hier: Deckel der Zystenpore.

Opportunisten: hier- Keime (z.B. Bakterien, Protozoen), die für den gesunden Wirt vollkommen harmlos sind, wenn sie aber in einen geschwächten, immunsupprimierten Organismus gelangen (oft sogar schwere) Krankheiten erregen können.

Osteomyelitis: eine infektiöse Entzündung des Knochenmarks

Otitis: Ohrenentzündung

PAME (Primäre Amöbenmeningoenzephalitis): durch *Naegleria fowleri* verursachte, akut verlaufende Entzündung der Hirnhäute und des Gehirns.

Parasiten: Organismen, die in oder an einem anderen (meist viel größeren) Organismus (=Wirt) leben, dem sie Energie, meist in Form von Nahrung, entziehen, ohne ihn dabei (sofort) zu töten (ASPÖCK 1994).

Parasitismus: Wechselbeziehung zwischen Organismen unterschiedlicher Spezies, in der ein Partner (Parasit) in direktem Kontakt von einem anderen (Wirt) zehrt; nachteilig für den Wirt, der zumeist nicht getötet wird oder erst dann, wenn die Entwicklung des Parasiten gesichert ist.

pathogen: eine Krankheit verursachend.

Pathogenität: Fähigkeit von Mikroorganismen, pathologische Zustände herbeizuführen.

Pathomechanismus: Mechanismus der Krankheitsentstehung.

PCR (Polymerase-Kettenreaktion): selektive Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte.

perivaskulär: die Gefäße des ZNS umgebend; lymphatisch erfüllt.

Persistenz: Anhalten, Andauern; Bestehenbleiben eines Zustandes über längere Zeiträume.

Phagosom: Fressvakuole.

Phagozytose: Aufnahme von Nahrungsorganismen oder -partikel durch eine Zelle.

Phylogenese, Phylogenie: Stammesgeschichte; in Ahnenreihen ablaufender, historischer, irreversibler Wandlungsprozeß, bei dem es aufgrund evolutionärer Prozesse zu Artaufspaltung und Neubildung von Arten kommt.

polyphyletisch: von mehreren Stammarten abstammend, auf Grund von konvergenter Evolution als verwandt betrachtet; fast alle Biologen sind sich einig, dass p. Taxa aufgelöst werden sollten.

Primer: Oligonukleotid; kurzes, synthetisch hergestelltes einzelsträngiges DNA-Stück von ca. 17-30 bp Länge; die beiden P. eines PCR-Systems flankieren jeweils einen definierten polymorphen DNA-Abschnitt (Zielsequenz = Template), so daß nur dieser Abschnitt in der PCR amplifiziert wird.

Prokaryota, Prokaryoten: Bakterien i.w.S; mikroskopisch kleine, einzellige Lebewesen, deren Zellen keinen Zellkern, keine Zellorganellen und keine basische Proteinhülle um ihre DNA aufweisen (z.B. Bakterien).

Protozoa, Protozoen: „Urtiere“; mikroskopisch kleine, heterotrophe, eukaryotische Einzeller; die meist freilebenden P. sind polyphyletisch.

Pseudopodien: Scheinfüßchen, die sich durch das Einströmen von Zytoplasma in eine Ausbuchtung der Zellmembran bilden.

Rhizopoda: sog. „Wurzelfüßer“, bezieht sich auf die Fähigkeit Pseudopodien auszubilden.

Ribosomen: kleine aus Proteinen und rRNA bestehende zelluläre Partikel, die die Proteinbiosynthese der Zellen katalysieren. Sie befinden sich im Zellplasma, und zwar am endoplasmatischen Retikulum, sowie in einigen Zellorganellen (Chloroplasten, Mitochondrien). Ihr Bildungsort ist bei Eukaryoten der Nukleolus.

RNA (ribonucleic acid), RNS: Ribonukleinsäure; einzelsträngiges kettenförmiges Molekül, das die aus der DNA umgeschriebene Erbinformation enthält (außer z.B. bei RNA-Viren); kommt in den Ribosomen vor (rRNA) und ist an der Proteinbiosynthese beteiligt (mRNA, tRNA).

Sequenz: bezeichnet die Aufeinanderfolge von etwas Gleichartigem; hier: Nukleotidabfolge der DNA.

Sequenzierung: Ermittlung der Reihenfolge der Nukleotide in einer Nukleinsäure (auch: Ermittlung der Aminosäureabfolge in einem Protein).

Sinusitis: akute oder chronische Nasennebenhöhlenentzündung.

Taxon (Pl. Taxa): eine von anderen Organismen unterscheidbare und beschreibbare Gruppe, welche eine Einheit der Natur abbilden soll und zum Element eines Systems wird.

Thalamus: größter Teil des Diencephalons (Zwischenhirn). Er setzt sich aus vielen Kerngebieten zusammen, die eine besonders starke Verbindung zum gesamten Großhirnkortex aufweisen. Dient der Modulation der ein- und ausgehenden Informationen zum Großhirn und somit der Erregung der Großhirnrinde.

Thymin (T): 2,4-Dihydroxy-5-methyl-pyrimidin, Pyrimidin-Abkömmling; eine der vier Basen in der DNA.

Trophozoit: hier: die zur Nahrungsaufnahme, Bewegung und Vermehrung befähigte Erscheinungsform von Akanthamoeben (auch vegetative Form genannt).

ubiquitär: überall vorkommend.

Vektor: Überträger von Krankheitserregern

Zyste: hier: Dauerstadium der Akanthamoeben, Hartmannellen und Nöglerien, bestehend aus Ekto- und Endozyste; u.U. sehr widerstandsfähig gegen physikalische und chemische Einflüsse; nicht zur Nahrungsaufnahme, Bewegung und Vermehrung fähig.

Zytolyse: Zellauflösung durch lytische Faktoren.

Zytoplasma: von einer Zellmembran umschlossenes Plasma einer Zelle, das in Wasser gelöste Eiweiße, Lipide, Kohlehydrate, Mineralsalze und Spurenelemente sowie eine Vielzahl kleinerer (Granula, Vesikel) und größerer (Zellorganellen) Einschlüsse enthält.

6.5 Literaturverzeichnis

- Abd H. (2006): Interaction between waterborne pathogenic bacteria and *Acanthamoeba castellanii*. Dissertation, Medizinische Universität Stockholm, Karolinska Institut.
- Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Stone B.J., Venkataraman C., Harb O.S. (1998): Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Review. Appl Environ Microbiol. 64(9): 3127-33.
- Abu Kwaik Y. (1996): The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. Appl Environ Microbiol 62(6): 2022-8.
- Adeleke A.A., Fields B.S., Benson R.F., Daneshvar M.I., Pruckler J.M., Ratcliff R.M., Harrison T.G., Weyant R.S., Birtles R.J., Raoult D., Halablab M.A. (2001): *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. Int J Syst Evol Microbiol. 51(Pt 3): 1151-60.
- Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F. (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J Eukaryot Microbiol. 52: 399-451.
- AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (2008): Legionellen Jahresbericht 2007. Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Nationale Referenzzentrale für Legionella-Infektionen, Wien.
- AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (2009): Legionellen Jahresbericht 2008. Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Nationale Referenzzentrale für Legionella-Infektionen, Wien.
- Aichelburg A.C., Walochnik J., Assadian O., Prosch H., Steuer A., Perneczky G., Visvesvara G.S., Aspöck H., Vetter N. (2008): Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine. Emerg Infect Dis. 14(11): 1743-6.
- Aitken D., Hay J., Kinnear F.B., Kirkness C.M., Lee W.R., Seal D.V. (1996): Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. Ophthalmology 103(3): 485-94.
- Albert-Weissenberger C., Cazalet C., Buchrieser C. (2007): *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. Review. Cell Mol Life Sci. 64(4): 432-48.
- Alizadeh H., Pidherney M.S., McCulley J.P., Niederkorn J.Y. (1994): Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. Infect Immun. 62: 1298-1303.
- Amann R., Springer N., Schönhuber W., Ludwig W., Schmid E.N., Müller K.D., Michel R. (1997): Obligate intracellular bacterial parasites of *acanthamoebae* related to *Chlamydia* spp. Appl Environ Microbiol. 63(1): 115-21.
- Anderson O.R., Rogerson A., Hannah F. (1997): Three new limax amoebae isolated from marine surface sediments. *Vahlkampfia caledonica* n. sp., *Saccamoeba marina* n. sp., and *Hartmannella vacuolata* n. sp. J Eukaryot Microbiol. 44(1): 33-42.

- Badenoch P.R., Adams M., Coster D.J. (1995): Corneal virulence, cytopathic effect on human keratocytes and genetic characterization of *Acanthamoeba*. *Int J Parasitol.* 25(2): 229-39.
- Barker J., Brown M.R., Collier P.J., Farrell I., Gilbert P. (1992): Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol.* 58(12): 4089.
- Barker J., Brown M.R.W. (1994): Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140: 1253–1259.
- Barker J., Scaife H., Brown M.R. (1995): Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(12): 2684-8.
- Barker J., Humphrey T.J., Brown M.W. (1999): Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett.* 173(2): 291-5.
- Behets J., Declerck P., Delaedt Y., Verelst L., Ollevier F. (2006): Quantitative detection and differentiation of free-living amoeba species using SYBR green-based real-time PCR melting curve analysis. *Curr Microbiol.* 53(6): 506-9.
- Behets J., Declerck P., Delaedt Y., Verelst L., Ollevier F. (2007): A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Res.* 41(1): 118-26.
- Bellinger-Kawahara C., Horwitz M.A. (1990): Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med.* 172(4): 1201-10.
- Berk S.G., Ting R.S., Turner G.W., Ashburn R.J. (1998): Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.* 64: 279-286.
- Bigliardi E., Sacchi L. (20001): Cell biology and invasion of the microsporidia. Review. *Microbes Infect.* 3(5): 373-9.
- Bolivar I., Fahrni J.F., Smirnov A., Pawlowski J. (2001): SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Mol Biol Evol.* 1812: 2306-2314.
- Booton G.C., Rogerson A., Bonilla T.D, Seal D.V., Kelly D.J., Beattie T.K., Tomlinson A., Lares-Villa F., Fuerst P.A., Byers T.J. (2004): Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *J Eukaryot Microbiol.* 51(2): 192-200.
- Booton G.C., Visvesvara G.S., Byers T.J., Kelly D.J., Fuerst P.A. (2005): Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol.* 43: 1689-1693.
- Bouyer S., Imbert C., Rodier M.H., Héchard Y. (2007): Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol.* 9(5): 1341-4.
- Bozue J.A., Johnson W. (1996): Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* 64(2): 668-73.
- Brenner D.J., Steigerwalt A.G, McDade J.E. (1979): Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med.* 90(4): 656-8.

- Brüggemann H., Cazalet C., Buchrieser C. (2006): Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol.* 9(1): 86-94.
- Butt C.G. (1966): Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med.* 274(26): 1473-6.
- Casemore D.P. (1977): Free-living amoebae in home dialysis unit. *Lancet.* 2: 1078.
- Cavalier-Smith T. (1993): Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 57: 953-994.
- Cavalier-Smith T. (1998): A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb Philos Soc.* 73:203-266.
- Cavalier-Smith T., Chao E.Y., Oates B. (2004): Molecular phylogeny of Amoebozoa and evolutionary significance of the unikont Phalansterium. *Europ J Protistol.* 40: 21-48.
- Cazalet C., Rusniok C., Brüggemann H., Zidane N., Magnier A., Ma L., Tichit M., Jarraud S., Bouchier C., Vandenesch F., Kunst F., Etienne J., Glaser P., Buchrieser C. (2004): Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet.* 36(11): 1165-73.
- Centeno M., Rivera F., Cerva L., Tsutsumi V., Gallegos E., Calderón A., Ortiz R., Bonilla P., Ramírez E., Suárez G. (1996): *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch Med Res.* 27(4): 579-86.
- Cerva L., Novák K., Culbertson C.G. (1968): An outbreak of acute, fatal amebic meningoencephalitis. *Am J Epidemiol.* 88(3): 436-44.
- Chang C.W., Kao C.H., Liu Y.F (2009): Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella pneumophila* released from *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *J Appl Microbiol.* 106(1): 97-105.
- Cirillo J.D., Falkow S. Tompkins L.S. (1994): Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect immune.* 62(8): 3254-61.
- Cirillo J.D., Falkow S., Tompkins L.S., Bermudez L.E. (1997): Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun.* 65: 3759–3767.
- Clark C.G., Cross G.A.M. (1988): Small-subunit ribosomal RNA sequence from *Naegleria gruberi* supports the polyphyletic origin of amoebas. *Mol Biol Evol.* 5: 512-518.
- Culbertson C.G., Smith J.W., Cohen H.K., Minner J.R. (1959): Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol.* 35: 185-197.
- Culbertson C.G., Smith J.W., Minner J.R. (1958): *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science* 127: 1506.
- Dacks J.B., Walker G., Field M.C. (2008): Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int.* 57(2): 97-104.
- Dart J.K.G., Saw V.P.J., Kilvington S. (2009): *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update. *American Journal of Ophthalmology*: in Druck.
- Declerck P., Behets J., Delaedt Y., Margineanu A., Lammertyn E., Ollevier F. (2005): Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microb Ecol.* 50(4): 536-49.

- Declerck P., Behets J., van Hoef V., Ollevier F. (2007): Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res.* 41(14): 3159-67.
- De Jonckheere J.F. (1991): Ecology of *Acanthamoeba*. Review. *Rev Infect Dis.* 13(5): 385-7.
- De Jonckheere J.F., Brown S. (1998a): There is no evidence that the free-living amoeba *Hartmannella* is a human parasite. *Clin Infect Dis.* 26(3): 773.
- De Jonckheere J.F., Brown S. (1998b): Is the free-living amoeba *Hartmannella* causing keratitis? *Clin Infect Dis.* 27(5): 1337-8.
- De Jonckheere J.F. (2002): A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica* 41(4): 309-342.
- De Jonckheere J.F. (2007): Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). *Eur J Protistol.* 43(1): 9-15.
- Denney C.F., Iragui V.J., Uber-Zak L.D., Karpinski N.C., Ziegler E.J., Visvesvara G.S., Reed S.L. (1997): Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: case report and review. *Clin Infect Dis.* 25(6): 1354-8.
- Di Cave D., Monno R., Bottalico P., Guerriero S., D'Amelio S., D'Orazi C., Berrilli F. (2009): *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28(6): 607-12.
- Donlan R.M., Forster T., Murga R., Brown E., Lucas C., Carpenter J., Fields B. (2005): *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling* 21(1): 1-7.
- Drozanski W. (1956): Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol Pol.* 5(3-4): 315-7.
- Drozanski W. (1963): Observations on intracellular infection of amoebae by bacteria. *Acta Microbiol Polonica* 12: 9-24
- Drozanski W., Wincenty J. (1991): *Sarcobium lyticum* gen. nov., sp. nov., an Obligate Intracellular Bacterial Parasite of Small Free-Living Amoebae. *Int J Syst Bacteriol.* 41: 82-87.
- Dujardin F. (1838): Recherches sur les organismes inférieurs. *Ann Sci Nat Zool.* 2: 343-377, pls 9-11.
- Dyková I., Pindová Z., Fiala I., Dvůráková H., Machácková B. (2005): Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* page, 1967: morphology, phylogeny and molecular diagnosis of the species in tissue lesions. *Folia Parasitol (Praha)*.52(4): 295-303.
- Embley T.M., Martin W. (2006): Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440(7084): 623-30.
- Essig A., Heinemann M., Simnacher U., Marre R. (1997): Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 63(4): 1396-9.
- Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. (2002): *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Review. *Clin Microbiol Rev.* 15(3): 506-26.
- Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W., Parkin W.E., Beecham H.J., Sharrar R.G., Harris J., Mallison G.F., Martin S.M., McDade J.E., Shepard C.C., Brachman P.S. (1977): Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* 297(22): 1189-97.

- Fritsche T.R., Gautom R.K., Seyedirashti S., Bergeron D.L., Lindquist T.D (1993): Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol.* 31(5): 1122-6.
- Fritsche T.R., Horn M., Seyedirashti S., Gautom R.K., Schleifer K.H., Wagner M. (1999): In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales. *Appl Environ Microbiol.* 65(1): 206-12.
- Gast R.J., Fuerst P.A., Byers T.J. (1994): Discovery of group I introns in the nuclear small subunit ribosomal RNA genes of *Acanthamoeba*. *Nucleic Acids Res.* 22(4): 592-6.
- Gast R.J., Ledee D.R., Fuerst P.A., Byers T.J. (1996): Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 43(6): 498-504.
- Gast R.J. (2001): Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol.* 48(6): 609-15.
- García-Fulgueiras A., Navarro C., Fenoll D., García J., González-Diego P., Jiménez-Buñuales T., Rodríguez M, Lopez R., Pacheco F., Ruiz J., Segovia M., Balandrón B., Pelaz C. (2003): Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 9(8): 915-21.
- Gautom R.K., Fritsche T.R. (1995): Transmissibility of bacterial endosymbionts between isolates of *Acanthamoeba* spp. *J Eukaryot Microbiol.* 42(5): 452-6.
- Gibson F.C. 3rd, Tzianabos A.O., Rodgers F.G. (1994): Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol.* 40(10): 865-72.
- Griffin J.L. (1972): Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science* 178(63): 869-70.
- Gustafsson K. (1989): Growth and survival of four strains of *Francisella tularensis* in a rich medium preconditioned with *Acanthamoeba palestinensis*. *Can J Microbiol.* 35(12): 1100-4.
- Hapl V., Hug L., Leigh J.W., Dacks J.B., Lang B.F., Simpson A.G., Roger A.J. (2009): Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(10): 3859-64.
- Hausmann K., Hülsmann N. (1996). *Protozoology*. 2nd edition, G Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hewett M.K., Robinson B.S., Monis P.T, Saint C.P. (2003): Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). *Acta Protozool.* 42(4): 325-329.
- Hinkle G, Sogin M.L. (1993): The evolution of the Vahlkampfiidae as deduced from 16S-like ribosomal RNA analysis. *Eukaryot Microbiol.* 40(5): 599-603.
- Hjorth M., Hugosson A., Bernander S., Claesson B.E., Johansson A., Larsson H., Nolskog P., Pap J., Svensson N., Ulleryd P. (2007): A community outbreak of Legionnaires' disease from an industrial cooling tower: assessment of clinical features and diagnostic procedures. *Scand J Infect Dis.* 39(3): 217-24.

- Hookey J.V.; Saunders N.A.; Fry N.K.; Birtles R.J.; Harrison T.G. (1996): Phylogeny of Legionellaceae based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens Int J Syst Bacteriol. 46(2): 526-531.
- Horn M., Fritsche T.R., Gautom R.K., Schleifer K.H., Wagner M. (1999): Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. Environ Microbiol. 1(4): 357-67.
- Horn M., Wagner M., Müller K.D., Schmid E.N., Fritsche T.R., Schleifer K.H., Michel R. (2000): *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. Microbiology 146 (5): 1231-9.
- Horn M., Harzenetter M.D., Linner T., Schmid E.N., Müller K.D., Michel R., Wagner M. (2001): Members of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: proposal of '*Candidatus Amoebophilus asiaticus*'. Environ Microbiol. 3(7): 440-9.
- Horn M., Fritsche T.R., Linner T., Gautom R.K., Harzenetter M.D., Wagner M. (2002): Obligate bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the beta-Proteobacteria: proposal of '*Candidatus Procabacter acanthamoebae*' gen. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52(2): 599-605.
- Horn M., Wagner M. (2004): Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. J Eukaryot Microbiol. 51(5): 509-14.
- Horwitz M.A., Silverstein S.C. (1983): Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria (*Legionella pneumophila*) in human monocytes is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin. J Clin Invest. 71(1): 15-26.
- Huber-Spitz V., Grabner G., Arock-Mettinger E., Baumgartner I., Skorpik F., Rappersberger C., Haddad R. (1989): *Acanthamoeba* keratitis. An underdiagnosed entity? Klin Mbl Augenheilkd. 194: 454-457.
- Hsu B.M., Lin C.L., Shih F.C. (2009): Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. Water Res. 43(11): 2817-28.
- HWC Projektabschlussbericht (2008): Österreichweite Erhebung der Betriebe mit größtem Risiko für Legionellen-Probleme im Rahmen des Forschungsprojektes „Legionellen in Prozesswässern“.
- Illingworth C.D., Cook S.D. (1998): *Acanthamoeba* keratitis. Surv Ophthalmol. 42: 493–508.
- Inoue T., Asari S., Tahara K., Hayashi K., Kiritoshi A., Shimomura Y. (1998): *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. Am J Ophthalmol. 125(5): 721-3.
- Ismail N., Olano J.P., Feng H.M., Walker D.H. (2002): Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. Review. FEMS Microbiol Lett. 207(2): 111-20.
- Jager B.V., Stamm W.P. (1972): Brain abscesses caused by a free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. Lancet 2: 1343-1345.
- Kahane S., Dvoskin B., Mathias M., Friedman M.G. (2001): Infection of *Acanthamoeba* polyphaga with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. Appl Environ Microbiol. 67(10): 4789-95.
- Katz S.M., Hammel J.M. (1987): The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. Ann Clin Lab Sci. 17(3): 150-6.
- Kayser F.H., Böttger E.C., Zinkernagel R.M., Haller O., Eckert J., Deplazes P. (2005): Medizinische Mikrobiologie. 11. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart.

- Kennedy S.M., Devine P., Hurley C., Ooi Y.S., Collum L.M. (1995): Corneal infection associated with *Hartmannella vermiformis* in contact-lens wearer. *Lancet* 346(8975): 637-8.
- Khan N.A. (2001): Pathogenicity, morphology and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol* 43: 391–395.
- Khan N.A., Jarroll E.L., Paget T.A. (2002): Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol.* 45(3): 197-202.
- Khan N.A. (2003): Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Review. Microb Pathog.* 34(6): 277-85.
- Khan N.A. (2006): *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 30(4): 564-95.
- Kilvington S., Price J. (1990): Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following Chlorine exposure. *J Appl Bacteriol.* 68: 519-525.
- Kilvington S., Larkin D.F., White D.G., Beeching J.R. (1990): Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2722-2725.
- King C.H., Shotts E.B. Jr., Wooley R.E., Porter K.G. (1988): Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol.* 54(12): 3023-33.
- Krishna-Prasad B.N., Gupta S.K. (1978): Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr Sci.* 47: 245–247.
- Kuiper M.W., Valster R.M., Wullings B.A., Boonstra H., Smidt H., van der Kooij D. (2006): Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 72(9): 5750-6.
- Landers P., Kerr K.G., Rowbotham T.J., Tipper J.L., Keig P.M., Ingham E., Denton M. (2000): Survival and growth of *Burkholderia cepacia* within the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19(2): 121-3.
- La Scola B., Raoult D. (1999): *Afipia felis* in hospital water supply in association with free-living amoebae. *Lancet* 353(9161): 1330.
- La Scola B., Raoult D. (2001): Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect.* 7(2): 75-9.
- La Scola B., Audic S., Robert C., Jungang L., de Lamballerie X., Drancourt M., Birtles R., Claverie J.M., Raoult D. (2003): A giant virus in amoebae. *Science* 299(5615): 2033.
- Lehmann O.J., Green S.M., Morlet N., Kilvington S., Keys M.F., Matheson M.M., Dart J.K., McGill J.I., Watt P.J. (1998): Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Investig Ophthalmol Visual Sci.* 39: 1261-1265.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G, Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. (1980): A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 35: 245-330.
- Lorenzo-Morales J., Lindo J.F, Martinez E., Calder D., Figueruelo E., Valladares B., Ortega-Rivas A. (2005): Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann Trop Med Parasitol.* 99(8): 751-8.

- Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Martínez E., Khoubbane M., Artigas P., Periago M.V., Foronda P., Abreu-Acosta N., Valladares B., Mas-Coma S. (2006): *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Trop.* 100(1-2): 63-9.
- Loret J.F., Jousset M., Robert S., Saucedo G., Ribas F., Thomas V., Greub G. (2008): Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. *Water Sci Technol.* 58(3): 571-7.
- Ly T.M., Müller H.E. (1990): Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol.* 33(1): 51-4.
- Maghsood A.H., Sissons J., Rezaian M., Nolder D., Warhurst D., Khan N.A. (2005): *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol.* 54(8): 755-9.
- Marciano-Cabral F. (1988): Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev.* 52(1): 114-33.
- Marciano-Cabral F., Cabral G.A. (2003): *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 16: 273-307.
- Marciano-Cabral F., Cabral G.A. (2007): The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51: 243-59.
- Marolda C.L., Hauröder B., John M.A., Michel R., Valvano M.A. (1999): Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* 145 (7): 1509-17.
- Marston B.J., Lipman H.B., Breiman R.F. (1994): Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med.* 154(21): 2417-22.
- Martínez A.J., García C.A., Halks-Miller M., Arce-Vela R. (1980): Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Acta Neuropathol.* 51(2): 85-91.
- Martinez A.J., Janitschke K. (1985): *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection* 13: 251-6.
- Martinez A.J., Visvesvara G.S. (1997): Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7: 583-598.
- McDade J.E., Shepard C.C., Fraser D.W., Tsai T.R., Redus M.A., Dowdle W.R. (1977): Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med.* 297(22): 1197-203.
- McKellar M.S., Mehta L.R., Greenlee J.E., Hale D.C., Booton G.C., Kelly D.J., Fuerst P.A., Sriram R., Visvesvara G.S. (2006): Fatal granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis mimicking a stroke, diagnosed by correlation of results of sequential magnetic resonance imaging, biopsy, in vitro culture, immunofluorescence analysis, and molecular analysis. *J Clin Microbiol.* 44(11): 4265-9.
- Mergeryan H. (1991): The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev Infect Dis.* 13: 390-391.
- Michel R., Just H. (1984): Acanthamoeben, Naeglerien und andere freilebende Amöben in Kühl- und Spülwasser von Zahnbehandlungseinheiten. *Zbl Bakt Hyg. (B)* 191: 423-437.
- Michel R., Burghardt H., Bergmann H. (1995): *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 196(6): 532-44.

- Michel R., Hoffmann R., Giese A., Müller K.D. (1995): Untersuchung von drei Grundwasserwerken auf Vorkommen von *Acanthamoeben*, *Naeglerien* und anderen freilebenden Amöben. *Acta hydrochim hydrobiol.* 23: 202-211.
- Michel R., Hauröder B. (1997): Isolation of an *Acanthamoeba* strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection. *Zentralbl Bakteriol.* 285(4): 541-57.
- Michel R., Hauröder B., Müller K.-D., Zöller L. (1999): An environmental *Naegleria*-strain - unable to form cysts - turned out to harbour two different species of endocytobionts. *Endocytobios Cell Res.* 13: 115-118.
- Michel R., Mueller K.D., Hauroeder B., Zoeller L.A. (2000): Coccoid Bacterial Parasite of *Naegleria* sp. (Schizopyrenida: Vahlkampfiidae) Inhibits Cyst Formation of its Host but not Transformation to the Flagellate Stage. *Acta Protozoo.* 39(3): 199-207.
- Michel R., Schmid E.N., Böker T., Hager D.G., Müller K.-D., Hoffmann R., Seitz H.M. (2000): *Vannella* sp. harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. *Parasitology Research.* 86: 514-520.
- Michel R. (2006): Isolation of free-living amoebae from various sources harbouring pro-and eukaryotic endocytobionts. *Endocytobiosis Cell Res.* 17: 127-136.
- Molmeret M., Horn M., Wagner M., Santic M., Abu Kwaik Y. (2005): Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 71(1): 20-8.
- Moore M.B., McCulley J.P., Luckenbach M., Gelender H., Newton C., McDonald M.B. et al. (1985): *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am J Ophthalmol.* 100: 396-403.
- Müller K.D., Schmid E.N., Michel R. (1999): Intracellular bacteria of *Acanthamoebae* resembling *Legionella* spp. turned out to be *Cytophaga* sp. *Zentralbl Bakteriol.* 289(4): 389-97.
- Nagington F., Watson P.G., Playfair T.J., McGill J., Hones B.R., Steele A.D.M. (1974): Amoebic infection of the eye. *Lancet* 2: 1537-40.
- Nägler K. (1910). Fakultativ parasitische Micrococcen in Amöben. *Arch Protistenkd.* 19: 246.
- Nguyen T.M., Illef D., Jarraud S., Rouil L., Campese C., Che D., Haeghebaert S., Ganiayre F., Marcel F., Etienne J., Desenclos J.C.(2006): A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis.* 193(1): 102-11.
- Nicholas K.B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield D.W. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *Embnew News* 4:14.
- Nieder Korn J.Y., Alizadeh H., Leher H., McCulley J.P. (1999): The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis, Review. *Microbes Infect.* 1(6): 437-443.
- Nikolaev S.I., Mitchell E.A.D., Petrov N.B., Berney C., Fahrni J., Pawlowski J. (2005): The testate lobose amoebae (order Arcellinida Kent, 1880) finally find their home within Amoebozoa. *Protist.* 156(2): 191-202.
- Nygård K. (2005): Update: Outbreak of legionnaires' disease in Norway traced to air scrubber. *Euro Surveill.* 10(23): pii=2719.
- Nygård K., Werner-Johansen Ø., Rønsen S., Caugant D.A., Simonsen Ø., Kanestrøm A., Ask E., Ringstad J., Ødegård R., Jensen T., Krogh T., Høiby E.A., Ragnhildstveit E., Aaberge I.S., Aavitsland P. (2008): An outbreak of legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway. *Clin Infect Dis.* 46(1): 61-9.

- Ohno A., Kato N., Sakamoto R., Kimura S., Yamaguchi K. (2008): Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Appl Environ Microbiol.* 74(14): 4585-8.
- Page F.C. (1967): Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J Protozool.* 14(3): 499-521.
- Page F.C. (1974): *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida. Flabellulidae) and the amphizoic tendency in amoebae. *Acta Protozool.* 13: 143-154.
- Page F.C. (1980): A light and electron-microscopical comparison of limax and flabellate marine amoebae belonging to four genera. *Protistologica* 16: 57-78.
- Page F.C. (1987): The classification of naked amoebae (Phylum Rhizopoda). *Archiv für Protistenkunde* 133: 199-217.
- Page F.C. (1991): Nackte Rhizopoda. - In: Page F.C. & F.J. Siemensma (1991): *Nackte Rhizopoda und Heliozoa*. D. Matthes (ed.), *Protozoenfauna*, Band 2. G Fischer, Stuttgart.
- Page F.C., Blanton R.L. (1985): The Heterolobosea (Sarcodina: Rhizopoda), a new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). *Protistologica* 21: 121-132.
- Patterson D.J., Hedley S. (1996): *Free-living freshwater protozoa. A colour guide*. Manson, London.
- Payne N.R., Horwitz M.A. (1987): Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med.* 166(5): 1377-89.
- Pecavar V. (2009): Amoebae of medical relevance in reptiles. Establishment of a PCR detection system for parasitic amoebae. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Pérez-Santonja J.J., Kilvington S., Hughes R., Tufail A., Matheson M., Dart J.K. (2003): Persistently culture positive *acanthamoeba* keratitis: in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmology.* 110(8): 1593-600.
- Proca-Ciobanu M., Lupascu G.H., Pertrovici A.L., Ionescu M.D. (1975): Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol.* 5: 49-56.
- Pussard M., Pons R. (1977): Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 13: 557-598.
- Qvarnstrom Y., Visvesvara G.S., Sriram R., da Silva A.J. (2006): Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol.* 44(10): 3589-95.
- Réveiller F.L., Varenne M.P., Pougnaud C., Cabanes P.A., Pringuez E., Pourima B., Legastelois S., Pernin P. (2003): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of *Naegleria fowleri* in environmental water samples. *J Eukaryot Microbiol.* 50(2): 109-13.
- Réveiller F.L., Cabanes P.A., Marciano-Cabral F. (2002): Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res.* 88(5): 443-50.
- Rivière D., Szczebara F.M., Berjeaud J.M., Frère J., Héchard Y. (2006): Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *J Microbiol Methods* 64(1): 78-83.

- Rocha-Azevedo B., Tanowitz H.B., Marciano-Cabral F. (2009): Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009: 251406.
- Rodríguez-Zaragoza S. (1994): Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol*. 20(3): 225-41.
- Rohr U., Weber S., Michel R., Selenka F., Wilhelm M. (1998): Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 64(5): 1822-4.
- Rowbotham T.J. (1980): Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*. 33(12): 1179-83.
- Rowbotham T.J. (1983): Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol*. 36(9): 978–986.
- Rowbotham T.J. (1986): Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci*. 22(9): 678-89.
- Saby S., Vidal A., Suty H. (2005): Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems. *Water Sci Technol*. 52(8): 15-28.
- Sassuchin D.N. (1934): Hyperparasitism in Protozoa. *The Quarterly Review of Biology* 9(2): 215-224.
- Schaumberg D.A., Snow K.K., Dana M.R. (1998): The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand? *Cornea* 17: 3–10.
- Schild M., Gianinazzi C., Gottstein B., Müller N. (2007): PCR-based diagnosis of *Naegleria* sp. infection in formalin-fixed and paraffin-embedded brain sections. *J Clin Microbiol*. 45(2): 564-7.
- Schmitz-Esser S., Toenshoff E.R., Haider S., Heinz E., Hoenninger V.M., Wagner M., Horn M. (2008): Diversity of bacterial endosymbionts of environmental acanthamoeba isolates. *Appl Environ Microbiol*. 74(18): 5822-31.
- Schuster F.L. (20002): Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Review. *Clin Microbiol Rev*. 15(3): 342-54.
- Schroeder J.M., Booton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J. (2001): Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 39: 1903-1911.
- Seidel J.S., Harmatz P., Visvesvara G.S., Cohen A., Edwards J., Turner J. (1982): Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med*. 306(6): 346-8.
- Sharma S., Garg P., Rao G.N. (2000): Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 84(10): 1103-8.
- Sharma S., Pasricha G., Das D., Aggarwal R.K. (2004): *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India: DNA typing-based validation and a simple detection assay. *Arch Ophthalmol*. 122: 1430–4.
- Singhal T., Bajpai A., Kalra V., Kabra S.K., Samantaray J.C., Satpathy G., Gupta A.K. (2001): Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. *Pediatr Infect Dis J*. 20(6): 623-7.

- Smirnov A., Nassonova E., Berney C., Fahrni J., Bolivar I., Pawlowski J. (2005): Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist*. 156: 129-142.
- Smith-Sommerville H.E., Hury V.B., Walker C., Winters A.L. (1991): Survival of *Legionella pneumophila* in the cold water ciliate *Tetrahymena vorax*. *Applied Environmental Microbiology* 57: 2742-2749.
- Snelling W.J., McKenna J.P., Lecky D.M., Dooley J.S. (2005): Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Appl Environ Microbiol.* 71(9): 5560-71.
- Sogin M.L. (1989): Evolution of Eukaryotic Microorganisms and Their Small Subunit Ribosomal RNAs. *American Zoologist* 29(2): 487-499.
- Sommer R. (2005): Legionellen: Legionellen und Wasser: Ein von Menschen 'hausgemachtes' Hygieneproblem. *ÖKZ* 46(10): 16-18.
- Sparagano O., Drouet E., Brebant R., Manet E., Denoyel G.A., Pernin P. (1993): Use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (cysts, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species. *J Clin Microbiol.* 31(10): 2758-63.
- Steinert M., Birkness K., White E., Fields B., Quinn F. (1998): *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol.* 64(6): 2256-61.
- Stothard D.R., Schroeder-Dietrich J.M., Awwad M.H., Gast R.J., Ledee D.R., Rodriguez-Zaragoza S., Dean C.L., Fuerst P.A., Byers T. (1998): The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rDNA gene sequence types. *J Euk Microbiol.* 45: 45-54.
- Tsvetkova N., Schild M., Panaiotov S., Kurdova-Mintcheva R., Gottstein B., Walochnik J., Aspöck H., Lucas M.S., Müller N. (2004): The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res.* 92(5): 405-13.
- Tatlock H. (1944): A *rickettsia*-like organism recovered from guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* 57: 95-99.
- Terpe K. (2007): DNA-Polymerase & Annealingtemperatur. Sonderdruck aus Methoden & Anwendungen. *Biospektrum* 13.
- Tezcan-Merdol D., Ljungström M., Winiecka-Krusnell J., Linder E., Engstrand L., Rhen M. (2004): Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*. *Appl Environ Microbiol.* 70(6): 3706-14.
- Thomas V., Herrera-Rimann K., Blanc D.S., Greub G. (2006): Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol.* 72(4): 2428-38.
- Thomas V., Loret J.F., Jousset M., Greub G. (2008): Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol.* 10(10): 2728-45.
- Thom S., Warhurst D., Drasar B.S. (1992): Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol.* 36(5): 303-6.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24): 4876-82.
- Valster R.M., Wullings B.A., Bakker G., Smidt H., van der Kooij D. (2009): Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies, identified by phylogenetic analysis of 18S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol.* 75(14): 4736-46.

- Vargas-Zepeda J., Gómez-Alcalá A.V., Vásquez-Morales J.A., Licea-Amaya L., De Jonckheere J.F., Lares-Villa F. (2005): Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch Med Res.* 36(1): 83-6.
- Visvesvara G.S., Balamuth W. (1975): Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J Protozool.* 22: 245-256.
- Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L. (2007): Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. Review. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50(1): 1-26.
- Vivarès C.P. (2001): Introduction: the microsporidial world, a paragon for analyzing intracellular parasitism. *Microbes Infect.* 3(5): 371-2.
- Walochnik J. (1997): Epidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von „Limax-Amöben“ in einem Großkrankenhaus und vergleichende Studien über das Verhalten von *Acanthamoeba*- und *Hartmannella*-Spezies auf Kulturen verschiedener gramnegativer Bakterienspezies. Diplomarbeit, Universität Wien.
- Walochnik J., Haller-Schober E.M., Kölli H., Picher O., Obwaller A., Aspöck H. (2000a): Discrimination between Clinically Relevant and Nonrelevant *Acanthamoeba* Strains Isolated from Contact Lens-Wearing Keratitis Patients in Austria. *Journal of Clinical Microbiology*: 3932-3936.
- Walochnik J., Obwaller A., Aspöck H. (2000b): Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.* 66(10): 4408-13.
- Walochnik J., Aspöck H. (2002): Amöben und Amöbosen: Gefährliche biologische und medizinische Sammelsurien. *Denisia* 6, zugleich Kataloge der oberösterreichischen Landesmuseen. Neue Folge Nr. 184: 229-263.
- Walochnik J., Michel R., Aspöck H. (2002): Discrepancy between morphological and molecular biological characters in a strain of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 (Lobosea, Gymnamoebia). *Protistology* 2: 185–188.
- Walochnik J., Obwaller A., Aspöck H. (2000): Correlations between morphological, molecular, biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.* 66(10): 4408-4413.
- Walochnik J., Duchêne M., Seifert K., Obwaller A., Hottkowitz T., Wiedermann G., Eibl H., Aspöck H. (2002): Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(3): 695-701.
- Walochnik J., Michel R., Aspöck H. (2004): A molecular biological approach to the phylogenetic position of the genus *Hyperamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 51(4): 433-40.
- Walochnik J. (2004): Vorkommen von Freilebenden Amöben und Infektionen mit Freilebenden Amöben in Österreich. *Denisia* 13: 443-455.
- Walochnik J., Aspöck H. (2005): Die Diagnostik von Infektionen mit freilebenden Amöben (FLA). *LaboratoriumsMedizin* 29(6): 446-456.
- Walochnik J.; Müller K.-D.; Aspöck H.; Michel R. (2005): An endocytobiont harbouring *Naegleria* strain identified as *N. clarki* de Jonckheere, 1994. *Acta Protozoologica* 44(4): 301-310.
- Walochnik J., Aspöck H. (2007): Amöben: Paradebeispiele für Probleme der Phylogenetik, Klassifikation und Nomenklatur. *Denisia* 20, zugleich Kataloge der oberösterreichischen Landesmuseen. Neue Serie 66: 323-350.

-
- Weekers P.H.H., Bodelier P.L.E, Wijen J.P.H., Vogels G.D. (1993): Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Hartmannella vermiformis* on Various Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 59(7): 2317–2319.
- Wenyon C.M. (1907): Observations on the Protozoa in the intestine of mice. *Arch Protist Suppl.* 1: 169-201.
- Wilson I.G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Review. *Appl Environ Microbiol.* 63(10): 3741-51.
- Winiecka-Krusnell J., Wreiber K., von Euler A., Engstrand L., Linder E. (2002): Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis.* 34(4): 253-6.
- Yoon H.S., Grant J., Tekle Y.I., Wu M., Chaon B.C., Cole J.C., Logsdon J.M. Jr., Patterson D.J., Bhattacharya D., Katz L.A. (2008): Broadly sampled multigene trees of eukaryotes. *BMC Evol Biol.* 8:14.

6.6 Curriculum vitae

Name:	Ute Scheikl
Geboren:	17. 11. 1974 in Wien
1981-1985	Volksschule Langenzersdorf, NÖ
1985-1993	Wirtschaftliches Bundesrealgymnasium Wien
Juni 1993	Matura
WS 1993	Beginn des Studiums Biologie/Zoologie an der Universität Wien
2003-2009	Studium Biologie/Anthropologie
2004-2009	Mitbelegung an der Medizinischen Universität Wien
Juli 2006	Laborarbeit an der Medizinischen Universität Wien, Klinisches Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Abteilung für medizinische Parasitologie
2007-2009	Diplomarbeit an der Medizinischen Universität Wien, Klinisches Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Abteilung für medizinische Parasitologie
WS 2006-2009	Tutorium an der Medizinischen Universität Wien
22.-24.11.2007	41. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie (ÖGTP), Wien; Vortrag: „Untersuchung von Wasserproben aus der Industrie auf freilebende Amöben“
5 Juni 2009	Parasitologische Fachgespräche (ÖGTP): „Pet-Borne-Diseases“, Wien

6.7 Danksagung

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. Christine Frank dafür, dass sie sich bereit erklärte die Betreuung meiner Diplomarbeit zu übernehmen.

Besonderen Dank verdient Frau Univ.-Doz. Dr. Julia Walochnik für ihr Engagement und die äußerst kompetente Betreuung. Mit Geduld und freundschaftlicher Unterstützung hat sie mich stets gefördert und die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht.

Auch Frau Prof. Dr. Regina Sommer und ihrem Team möchte ich für ihre Hilfe und ihr Interesse danken.

Weiters möchte ich mich herzlichst bei Frau Dr. Martina Köhler für die Betreuung bedanken – sie hatte immer Zeit für Erklärungen und Problemlösungen, aber auch für den Spaß.

Danken möchte ich außerdem meinen Kollegen im Labor – Jacek Pietrzak, Susanne Glöckl, Iveta Häfeli, Verena Pecavar, Dr. Marion Blaschitz, Dipl.-Ing. (FH) Florian Astelbauer, Mag. Hans-Peter Führer und Dr. Ursula Fürnkranz, die mich herzlich aufnahmen, mir stets tatkräftig zur Seite standen und für ein wunderbares Arbeitsklima sorgten.

Äußerst dankbar bin ich meiner Familie für all die großartige Unterstützung, das Verständnis und das Interesse, das sie mir entgegen brachten.

Mein ganz spezieller Dank geht an meine besten Freunde – Elke, Martin und Vera, die mich während meines ganzen Studiums – und auch sonst immer – durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben.

Nicht zuletzt möchte ich Univ. Prof. Dr. Horst Aspöck danken, der mein Interesse an der Parasitologie weckte und mich im Seminar mit konstruktiver Kritik anspornte.