

Charakterisierung und Differenzierung von Acanthamoeba-Spezies mittels Isoelektrischer Fokussierung

Marianne Ullmann, Julia Walochnik, A. Haßl, O. Picher, H. Aspöck

Einleitung Unter den „Limax-Amöben“ sind mehrere Arten der Gattung *Acanthamoeba* nun schon bald 40 Jahre als medizinisch relevante Parasiten des Menschen bekannt. „Limax-Amöben“ sind amöboid bewegliche Protozoen unterschiedlicher systematischer Stellung, weshalb dem Begriff auch keinerlei taxonomische Realität zukommt (1). Es handelt sich hierbei um eine Kollektivbezeichnung für alle freilebenden, beim Menschen fakultativ parasitierenden Amöben.

Amöben der Gattung *Acanthamoeba*, potentielle Erreger der Keratitis, der granulomatösen Amöbenenzephalitis (GAE) und der disseminierten Akanthamöbose, kommen in zwei Stadien, nämlich dem Trophoziten- und dem Zystenstadium vor. Rein morphologisch kann man die Arten fast nur im Zystenstadium voneinander unterscheiden. Da die oftmals vorkommende Variabilität der Zysten innerhalb einer Art eine sichere Artbestimmung jedoch sehr schwierig macht, wird heute allgemein die Identifizierung mittels biochemischer und genetischer Methoden durchgeführt.

Im Rahmen dieser Untersuchung sollten *Acanthamoeba*-Probestämme anhand der Methode der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamid-Gel nach Möglichkeit bestimmten Spezies, zumindest aber Spezies-Gruppen zugeordnet werden. Es sollte dabei getestet werden, ob sich das schon vom Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien für die Pathogenitätsbestimmung von *Entamoeba histolytica/dispar* eingesetzte Elektrophorese-Gerät Phast[®]-System (5) auch für die Differenzierung von Spezies der Gattung *Acanthamoeba* eignet. Als Pathogenitätstest sollten separat Temperaturtoleranztests durchgeführt werden. Sinn dieser Tests ist es, Stämme als temperaturtolerant bzw. thermophil zu erkennen. Temperaturtolerante Stämme können bei Temperaturen von 37°C - 42°C existieren, ihre optimale Wachstumstemperatur liegt jedoch darunter. Die optimalen Wachstumstemperaturen von thermophilen Stämmen hingegen rangieren im Bereich von 37°C - 42°C. Temperaturtolerante bzw. thermophile Stämme werden als potentiell pathogen eingestuft, da sie die Fähigkeit besitzen, sich bei Körpertemperatur von Säugtieren fortzupflanzen.

- Material und Methoden** Für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden vier *Acanthamoeba*-Probestämme aus Isolaten verwendet, die einerseits aus von Augenärzten an das Hygiene-Institut Wien gesandten Kontaktlinsenbehältern, zum anderen aus sanitären Einrichtungen des Allgemeinen Krankenhauses (AKH) Wien stammten. Der Probestamm aus dem AKH Wien wurde im Rahmen einer gemeinsam mit Frau MAG. A. J. WALOCHNIK durchgeführten epidemiologischen Studie isoliert (7).
- Als Referenzstämme dienten 13 verschiedene *Acanthamoeba*-Stämme, die fünf verschiedene *Acanthamoeba*-Arten (*A. lenticulata*, *A. quina* - *A. lugdunensis*, *A. hatchetti*, *A. comandoni*, *A. mauritanensis*) repräsentierten. Die Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Rolf Michel (Ernst-Rodenwaldt-Institut, Koblenz) zur Verfügung gestellt.
- Kultivierung** Das Anzichten der Amöben erfolgte auf Non-Nutritiv (NN)-Agarplatten, die zuvor mit einer Suspension lebender *E. coli*-Bakterien bestrichen worden waren.
- Da bei den Originalproben mit dem Vorhandensein mehrerer Amöben-Spezies pro Agarplatte zu rechnen war, wurden die Amöben einer Platte kloniert. Das heißt, daß kleine Agarblöckchen mit einer Amöbe ausgeschnitten und auf eine neue NN-Agarplatte transferiert wurden.
- Axenisierung** Zur Vorbereitung für die axenische Flüssigkultur wurden nach Etablierung der Probe- sowie Referenzstämme Kulturen auf Agarplatten angelegt, die mit einer Suspension von hitzegetöteten *E. coli* bestrichen worden waren.
- Morphologische Identifizierung** Amöbenzysten und -trophoziten wurden mit einer sterilisierten Skalpellklinge vorsichtig von der Agaroberfläche gekratzt, auf einem Objektträger ausgestrichen und im Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet. Zur Untersuchung der ungefärbten Zysten und Trophoziten wurde der Bestimmungsschlüssel von PAGE & SIEMENSMA herangezogen (4).
- Für die Bestimmung auf Gattungsebene sind nach diesem Schlüssel vor allem das Vorhandensein von Flagellatenstadien (Amöben-Flagellaten-Transformationstest) und die Morphologie von Zysten und Trophoziten entscheidend, bei der Differenzierung der Arten vor allem die Zystenmorphologie und das Temperaturverhalten.
- Flüssigkulturen** Um genügend große Mengen an Trophoziten für die spätere Herstellung eines proteinreichen Lysats erhalten zu können, war die Kultivierung der Amöben in Flüssigkultur unabdinglich. Nach Austesten mehrerer in der Literatur angegebener Nährmedien entschieden wir uns für das Proteose-Pepton-Glukose-Medium (PPG), das durch fetales Kälberserum ergänzt wurde. Das PPGS-Medium setzt sich wie folgt zusammen: 10 g Proteose-Pepton, 18 g Glukose und 1 l Amöbensaline.
- Nach Autoklavieren der vermischten Bestandteile wurden Amöben sowie 200 µl fetales Kälberserum und 200 µl Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte ohne Begasung in 50 ml-Gewebekulturflaschen (Falcon). Die Inkubationstemperatur betrug 32°C, im Rahmen des Temperaturtoleranztests auch 37°C und 42°C.
- Lysat-Herstellung** Die vom Boden des Kulturfläschchen abgelösten Trophoziten wurden in ein Falcon-Röhrchen übertragen und drei Minuten bei 500 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Trophoziten noch zweimal mit Amöbensaline gewaschen.
- Das Pellet wurde in 500 µl Enzymhemmer (1 ml 200 mM EDTA (pH 7.0), 31 mg ε-Amino-n-kapronsäure, 26 mg DL-Dithiothreitol; mit A. dest. auf 100 ml aufschütten) resuspendiert und die Suspension in ein Kryo-Röhrchen pipettiert.
- Für das Aufbrechen der Zelle wurden die Trophoziten in den Kryo-Röhrchen dreimal hintereinander in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Zum Abschluß wurden die aufgebrochenen Trophoziten bei 10 000 g (2°C) zentrifugiert. Der Überstand diente als fertiges Lysat.

Tabelle 1:

Auflistung aller mittels der isoelektrischen Fokussierung untersuchten *Acanthamoeba*-Stämme sowie deren Isoenzymprofile*).

Stamm Nummer	Acanthamoeba-Spezies	Ergebnisse			
		AP	Elektrophorese EST	IDH	LDH
1	<i>A. lenticulata</i>	I	II	I	-
2	<i>A. lenticulata</i>	I	I	I	I
3	<i>A. lenticulata</i>	I	II	I	I
4	<i>A. lenticulata</i>	I	I	I	I
5	<i>A. lenticulata</i>	I	II	I	I
6	<i>A. lenticulata</i>	I	I	I	I
7	<i>A. lenticulata</i>	I	-	-	-
8	<i>A. quina-A. lugdunensis</i>	III	-	-	-
9	<i>A. quina-A. lugdunensis</i>	II	IV	II	II
10	<i>A. hatchetti</i>	I	II	I	I
11	<i>A. comandoni</i>	IV	-	-	-
12	<i>A. mauritanensis</i>	II	-	-	-
13	<i>A. mauritanensis</i>	II	-	-	-
P1	<i>A. quina-A. lugdunensis</i> ?	II	II	II	II
P2	<i>A. lenticulata</i> ?	II	I	I	I
P3	<i>A. quina-A. lugdunensis</i> ?	III	II	II	II
P4	<i>A. lenticulata</i> ?	I	I	I	I

*) Das Isoenzymprofil, durch das der jeweilige Stamm charakterisiert wird, setzt sich in dieser Arbeit aus den Isoenzymmustern von vier verschiedenen Isoenzymen (AP, EST, IDH, LDH) zusammen.

Jedes Isoenzym ließ in Abhängigkeit zum getesteten Stamm eines von zwei (bezeichnet mit I und II) bzw. vier (bezeichnet mit I, II, III, IV) verschiedenen Isoenzymmustern erkennen.

P = Probestamm

Malat-Enzym [E. C. 1. 1. 1. 40], Isozitrat-Dehydrogenase [E. C. 1. 1. 1. 41], Glukose-6-P-Dehydrogenase [E. C. 1. 1. 1. 49], Phosphogluko-Mutase [E. C. 5. 4. 2. 2], Esterase [E. C. 3. 1. 1. 1], Propionyl-Esterase [E. C. 3. 1. 1. 1], Saure Phosphatase [E. C. 3. 1. 3. 2], Leucin-Aminopeptidas [E. C. 3. 4. 11. 1], Phosphoglukose-Isomerase [E. C. 5. 3. 1. 9]).

Zur Feststellung der isoelektrischen Punkte (pI) der aufgetrennten Proteine wurden pI-Marker aufgetragen. Die aufgetrennten Banden der pI-Marker wurden separat mit Coomassie R 350 Farbstoff sichtbar gemacht.

Ergebnisse

Nach Vorversuchen mit 13 Isoenzymen erwiesen sich vier als für die Differenzierung von *Acanthamoeba*-Stämmen mittels IEF am besten geeignet. Folgende vier Isoenzyme zeigten die höchste Aktivität und die klarste optische Auflösung der Banden:

L-Laktat-Dehydrogenase (LDH), Isozitrat-Dehydrogenase (IDH), Esterase (EST), Saure Phosphatase (AP).

Aufgrund von Schwierigkeiten, die sich bei der Kultivierung ergaben, konnte nicht jeder Stamm mit allen vier Isoenzymen ausgetestet werden. Es war nicht bei jedem Referenzstamm möglich, diesen für die gesamte Dauer der Untersuchung axenisch zu kultivieren. So fehlt das Ergebnis für LDH bei Referenzstamm 1, sowie die EST-, IDH- und LDH-Ergebnisse bei den Referenzstämmen 7, 8, 11, 12, 13. Obwohl für die letztangeführten Referenzstämmen demnach nur jeweils ein Enzymmuster als Vergleich zur Verfügung stand, wurden sie in die Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen.

Tabelle 1 zeigt die Zusammenstellung aller Ergebnisse.

Isoelektrische Fokussierung

Für die Elektrophorese kam das semi-automatisch arbeitende Elektrophorese-Gerät Phast®-System (Pharmacia, Freiburg, D) zur Anwendung. Dieses Gerät weist einen Mikroprozessor auf, der alle Parameter während der Auftrennung kontrolliert und reguliert.

Verwendet wurden fertige PhastGele® IEF 3-9 bzw. IEF 5 - 8 (decken die pH-Bereiche von 3 - 9 bzw. von 5 - 8 ab). Es handelt sich hierbei um Polyacrylamidgele, welche Träger-Ampholyte enthalten.

Nach der Auftrennung wurden die Gele in spezifische Enzym-Färber-Lösungen gelegt.

Ausgetestet wurden insgesamt 13 Isoenzyme (Alkohol-Dehydrogenase [E. C. 1. 1. 1. 2], Glutamat-Dehydrogenase [E. C. 1. 4. 1. 3], β -OH-Buttersäure-Dehydrogenase [E. C. 1. 1. 1. 30], L-Laktat-Dehydrogenase [E. C. 1. 1. 1. 27],

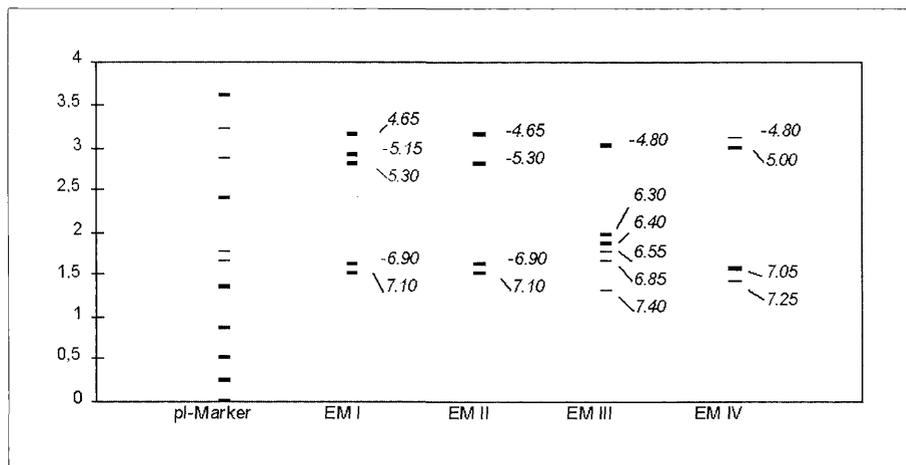


Abbildung 1:

Graphische Darstellung der von den getesteten *Acanthamoeba*-Stämmen erhaltenen Esterase-Enzymmuster (EM) sowie der pI-Marker (pI - point isoelectric).

0 - 4 = Abstand der Banden von der Kathode in cm.

7.4 und 8.3 auf. IDH-Muster II war durch vier Banden charakterisiert, die auf den isoelektrischen Punkten 5.65, 7.6, 7.8 und 8.0 lagen.

Esterase

Es konnten vier verschiedene Isoenzymmuster unterschieden werden. Jedes Muster wurde von mindestens zwei verschiedenen Stämmen gezeigt, Ausnahme war Referenzstamm II.

EST-Muster I und II unterschieden sich nur durch das Vorhandensein bzw. Fehlen einer Bande. Muster I wies fünf, Muster II vier Banden auf. Die beiden Muster traten ausschließlich bei den mit *A. lenticulata* und *A. hatchetti* bezeichneten Stämmen auf.

Die Banden lagen auf den isoelektrischen Punkten 4.65, (5.15), 5.30, 6.90, 7.10.

Muster III wurde nur von zwei Probestämmen, P2 und P4, gezeigt. Es wies sechs Banden auf den isoelektrischen Punkten 4.80, 6.30, 6.40, 6.55, 6.85 und 7.40 auf.

Muster IV wurde ausschließlich vom Referenzstamm Nr. 9 (siehe Tab. 1) gezeigt. Es ist durch vier Banden auf den isoelektrischen Punkten 4.80, 5.00, 7.05 und 7.25 charakterisiert. Die Esterase-Enzymmuster sind auf Abbildung 1 graphisch dargestellt.

Saure Phosphatase

Unterschieden werden konnten drei Enzymmuster. Jedes der Muster wurde wiederum von mindestens zwei verschiedenen Stämmen präsentiert.

Muster I zeigt sechs verschiedene Banden, die auf den isoelektrischen Punkten 5.65, 5.80, 5.85, 5.95, 6.05 und 7.3 lagen. Muster II wies ebenfalls sechs verschiedene Banden auf den isoelektrischen Punkten 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 und 5.7 auf. Muster III war durch drei Banden auf den pIs 6.1, 6.6 und 6.75 charakterisiert.

Die AP-Muster sind auf Abbildung 2 dargestellt.

Diskussion

Die Isoenzymmuster von vier Probestämmen wurden mit jenen von dreizehn Referenzstämmen verglichen. Die Referenzstämme repräsentierten fünf verschiedene *Acanthamoeba*-Arten (*A. lenticulata*, *A. quina* - *A. lugdunensis*, *A. hatchetti*, *A. comandoni*, *A. mauritanensis*), wobei bei drei der Arten (*A. hatchetti*, *A. comandoni* und *A. mauritanensis*) aufgrund fehlender Ergebnisse nur die Saure Phosphatase-Muster als Vergleich zur Verfügung standen.

Im folgenden sollen die Ergebnisse für jedes Enzym getrennt besprochen werden.

L-Laktat-Dehydrogenase

Es konnten insgesamt zwei Isoenzymmuster zu je einer Bande beobachtet werden. Die Banden lagen auf den isoelektrischen Punkten 6.1 (Muster I) und 6.2 (Muster II).

Isoziträt-Dehydrogenase

Auch beim Isoenzym IDH konnten zwei verschiedene Isoenzymmuster beobachtet werden. IDH-Muster I wies sechs Banden auf den isoelektrischen Punkten 5.85, 6.0, 6.05, 6.15,

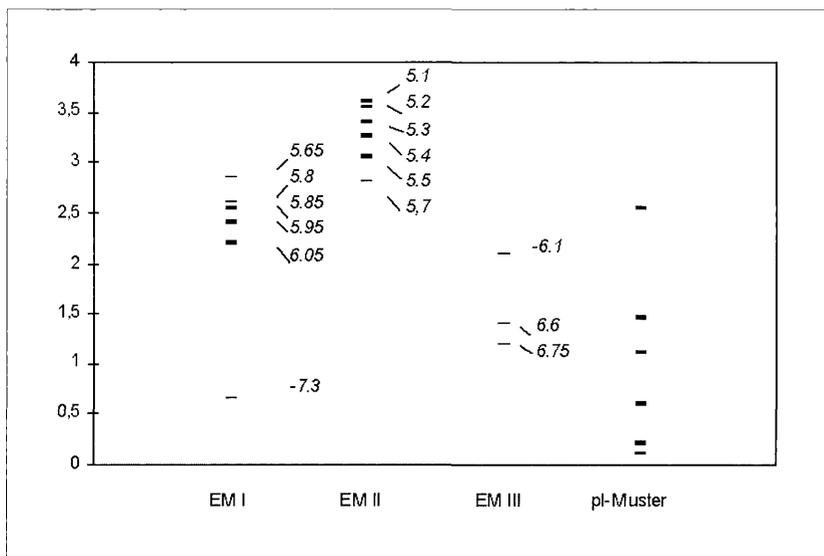


Abbildung 2:

Graphische Darstellung der von den getesteten *Acanthamoeba*-Stämmen erhaltenen AP-Enzymmuster und der pl-Muster.

0 - 4 = Abstand der Banden von der Kathode in cm.

chetti spricht die der elektrophoretischen Untersuchung vorausgegangene morphologische Bestimmung. So wurde Probestamm 4 zunächst der *A. sp.* Gruppe II zugeordnet. *A. hatchetti* gehört Gruppe II, *A. lenticulata* jedoch Gruppe III an.

Auch Probestamm P2 wurde der Spezies *A. lenticulata* zugeordnet, obwohl das AP-Muster von jenem des *A. lenticulata*-Profils abweicht. AP-Muster II wiesen auch noch einer der mit *A. quina* - *A. lugdunensis* und die mit *A. mauritanensis* bezeichneten Stämme auf. Von *A. quina* - *A. lugdunensis* war P2 eindeutig abzutrennen, aufgrund der fehlenden Daten für EST, IDH und LDH jedoch nicht von *A. mauritanensis*. P2 war morphologisch als *A. hatchetti* identifiziert worden. Die Probestämme P1 und P3 wurden beide dem Spezies-Komplex *A. quina* - *A. lugdunensis* zugeordnet. Aufgrund der geringen Vergleichsmöglichkeiten ist diese Zuordnung jedoch als nicht endgültig zu betrachten.

A. quina und *A. lugdunensis* wurden von DE JONCKHEERE (2) aufgrund ihrer ähnlichen bzw. identischen Enzymprofile einem Spezies-Komplex zugeordnet. Die Spezies-Bezeichnung *A. quina* wurde für alle apathogenen, die Bezeichnung *A. lugdunensis* für alle pathogenen Amöben dieses Komplexes beibehalten (2). Im Bestimmungsschlüssel von PAGE aus dem Jahre 1991 werden allerdings immer noch zwei Arten unterschieden (4). In dieser Untersuchung wurden zwei verschiedene *A. quina* - *A. lugdunensis*-Stämme miteinander verglichen. Ein Unterschied im AP-Muster konnte festgestellt werden. Dieses Ergebnis geht mit jenem von DE JONCKHEERE (2) konform. Auch er beschreibt unterschiedliche AP-Muster innerhalb der verschiedenen Stämme von *A. quina*.

Die Probestämme P1 und P3 unterscheiden sich beide im EST-Muster vom Referenzstamm Nr. 9, *A. quina* - *A. lugdunensis*. In den anderen Isoenzymen stimmen sie mit Nr. 9 überein (nur P3 weicht noch zusätzlich im AP-Muster von Nr. 9 ab. Dafür stimmt sein AP-Muster mit jenem des zweiten *A. quina* - *A. lenticulata*-Referenzstammes, i. e. Nr. 8, überein). Für ihre Zuordnung zum *A. quina* - *A. lugdunensis*-Komplex sprechen jedoch Ergebnisse aus der bereits oben zitierten Untersuchung von DE JONCKHEERE (2). Er konnte nämlich innerhalb der *A. quina* - *A. lugdunensis*-Gruppe viele verschiedene Isoenzyme für Propionyl-Esterase finden. In unserer Untersuchung waren die Ergebnisse für Propionyl-Esterase und Esterase ident. Es kann daher angenommen werden, daß die bei PE auftretende Variation auch für EST gilt.

Die beiden im AP-Muster mit Referenzstamm Nr. 9 und den Probestämmen P1 und P2 übereinstimmenden *A. mauritanensis*-Stämme fallen aufgrund ihres unvollständigen Isoenzymprofils leider als Vergleichsmöglichkeit aus.

Die Ergebnisse für alle der Spezies *A. lenticulata* angehörigen Stämme boten ein einheitliches Bild, dem das Isoenzymprofil von Probestamm 4 (P4) in allen vier Isoenzymen entsprach. Probestamm 4 wurde daher der Spezies *A. lenticulata* zugeordnet. Handelt es sich bei dem Referenzstamm Nr. 10 tatsächlich um *A. hatchetti*, so könnte man, da Nr. 10 ebenfalls das in dieser Untersuchung für *A. lenticulata* typische Isoenzymprofil (AP I / EST I / IDH I / LDH I oder wie bei Nr. 10 AP I / EST II / IDH I / LDH I) aufweist, P4 auch *A. hatchetti* zuordnen. Dagegen spricht, daß *A. hatchetti* nur durch einen, *A. lenticulata* jedoch durch sieben verschiedene Referenzstämme repräsentiert ist, wodurch bei Nr. 10 keine Vergleichsmöglichkeiten gegeben sind. *A. lenticulata* und *A. hatchetti* lassen sich nicht mittels der isoelektrischen Fokussierung der vier für diese Untersuchung ausgewählten Isoenzyme voneinander unterscheiden. Für die Zuordnung des P4-Stammes zu *A. hat-*

Mit der Zuordnung der Probestämme P1 und P3 zum Komplex *A. quina* - *A. lugdunensis* könnte die morphologische Bestimmung bestätigt werden.

Vergleiche der Isoenzymmuster mit jenen in der Literatur beschriebenen lassen sich aufgrund der großen Unterschiede in den verwendeten Materialien und Methoden kaum anstellen. Lage und Zahl der Banden des jeweiligen Isoenzym unterscheiden sich von Autor zu Autor und auch die Methode der Auswertung variiert beträchtlich.

Insgesamt ist man allgemein der Meinung, daß die Diversität innerhalb der Gattung *Acanthamoeba* größer ist als bisher angenommen und daß morphologische Methoden alleine für eine sichere Spezies-Bestimmung ungenügend sind. Die meisten Autoren kombinieren die morphologische Bestimmung mit jener auf Basis der IEF und führen zusätzlich noch Pathogenitätstests (mittels Zellkulturen, Tierversuchen oder Enzymaktivitätsanalysen), immunologische Untersuchungen (6) und Lectin-Agglutinationsstudien (3) durch.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Tierversuche zur Abklärung der Pathogenität der isolierten Stämme durchgeführt. Sämtliche Probestämme wurden jedoch Temperatortoleranztests unterzogen, mithilfe derer zwar kein eindeutiger Nachweis der Pathogenität möglich war, die aber durchaus Aussagen über eine potentielle Pathogenität zuließen. So kann man den aus dem Allgemeinen Krankenhaus isolierten Probestamm 4 als wahrscheinlich apathogen und sämtliche aus Kontaktlinsenbehältern isolierten Probestämme (P 1, P 2, P 3) als potentiell pathogen einstufen.

Zusammenfassung 17 *Acanthamoeba*-Stämme unterschiedlicher Herkunft wurden anhand ihrer Isoenzym-Muster miteinander verglichen. Die Isolate stammten einerseits aus sanitären Einrichtungen eines Wiener Großkrankenhauses (ein Isolat, AKH Wien), andererseits aus von Augenärzten zur Verfügung gestellten Kontaktlinsenbehältern (drei Isolate).

Als Standard dienten 13 verschiedene *Acanthamoeba*-Stämme.

Zur Anwendung kam die Isoelektrische Fokussierung, wobei sich in dieser Untersuchung die Leitenzyme Saure Phosphatase (AP), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Esterase (EST) sowie Isozitat-Dehydrogenase (IDH) als am besten geeignet erwiesen.

Die vier *Acanthamoeba*-Isolate wurden auf Basis der Isoelektrischen Fokussierung zwei verschiedenen Spezies (bzw. Spezies-Komplexen), nämlich *A. lenticulata* und *A. quina* - *A. lugdunensis* zugeordnet. Aufgrund der geringen Anzahl der Referenzstämme und der Schwierigkeiten, die sich bei der Kultivierung der Stämme ergaben, kann die Zuordnung nur als vorläufig betrachtet werden.

Schlüsselwörter *Acanthamoeba*, Isoelektrische Fokussierung, Saure Phosphatase, Esterase, Laktat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase.

Summary *Characterization and Differentiation of Acanthamoeba-Species by means of Isoelectric Focusing*

17 *Acanthamoeba*-strains of different origin were compared by their isoenzyme patterns.

The strains had been isolated from sanitary facilities of a large hospital in Vienna and from contact lens cases which were provided by several ophthalmologists.

Out of the 16 strains 13 served as standard strains.

Isoelectric focusing was the means of this research in which Acid Phosphatase (AP), Lactic Dehydrogenase (LDH), Isocitric Dehydrogenase (IDH) and Esterase (EST) turned out to be the most suitable isoenzymes.

On the basis of Isoelectric Focusing, the four *Acanthamoeba* isolates were assigned to two different species, namely the species *A. lenticulata* and the species complex *A. quina* - *A. lugdunensis*. However, due to the small number of reference strains and problems of cultivation this assignment is still preliminary.

Key words *Acanthamoeba*, isoelectric focusing, acid phosphatase, esterase, isocitric dehydrogenase, lactic dehydrogenase.

Literatur

1. ASPÖCK, H. (1994):
Protozoen als Erreger von Krankheiten des Menschen: Übersicht und aktuelle Probleme in Mitteleuropa.
Kataloge des OÖ. Landesmuseums N. F. 71, 219-266.
2. DE JONCKHEERE, J. F. (1983):
Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*.
Protozool. 30, 701-706.
3. MATIAS, R. et al. (1991):
Species identification and characterization of an *Acanthamoeba* strain from human cornea.
Parasitol. Res. 77, 469-474.
4. PAGE, S. (1991).
Nackte Rhizopoda und Heliozoa.
Fischer Verlag, Stuttgart.
5. STEMBERGER, H., BINDER, M., KOLLARITSCH, H., WIEDERMANN, G. (1990):
Isoenzym-Isoelektrofokussierung mittels Phast[®],-System zur Pathogenitätsbestimmung von *Entamoeba histolytica*.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 12, 13-18.
6. VIVESVARA, G. S. et al. (1983):
Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles.
J. Clin. Microbiol. 18, 1405-1412.
7. WALOCHNIK, J. (1997):
Epidemiologische Untersuchung 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.

Korrespondenzadresse Mag. Marianne Ullmann
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

