

Freilebende Amöben als opportunistische Darmparasiten von Reptilien

Andreas Hassl^{1,3}, Gerald Benyr², Silvia Appelt³

Einleitung Einige Arten von normalerweise freilebenden (fl-) Amöben treten als opportunistische Gewebsparasiten von Wirbeltieren in Erscheinung. Da sie meist auch intrazellulär liegende, intakte Bakterien beherbergen, können sie zudem als Verteiler von potentiell pathogenen Keimen fungieren. Es gibt einige sporadische Berichte über das Auftreten solcher fl-Amöben in Kot- und Gewebeproben von kaltblütigen Wirbeltieren (1, 2, 6, 7). Allerdings gehen die Meinungen über die Häufigkeit und die veterinärmedizinische Bedeutung einer Amöbenausscheidung bei Reptilien weit auseinander (2, 5, 6). Der Grund ist, dass nur ganz wenige mit epidemiologischen Daten untermauerte Untersuchungen über diese Amöbeninfestation veröffentlicht wurden.

Im Rahmen der vorliegenden retrospektiven Studie wurde das Artenspektrum von fl-Amöben in Kotproben von in Gefangenschaft gehaltenen Reptilien und die syntop auftretende Enterobakterienflora bestimmt und das Vorkommen solcher Amöben in Bezug auf die systematische Zugehörigkeit der Wirtsarten, auf das Terrarienklima und auf die Nahrung der Wirte untersucht.

Material und Methoden In einem Zeitraum von zwei Jahren (1997-99) wurden 374 frische Kotproben von 72 Individuen von in Terrarien gehaltenen Schlangen (6 Arten, 118 Kotproben), Echsen (12 Arten, 229 Proben) und Schildkröten (4 Arten, 27 Proben) in durchschnittlichen Abständen von 2,5 Monaten untersucht. Alle Reptilien lebten vor der Untersuchung mindestens einen Monat in Gefangenschaft, in den allermeisten Fällen aber bereits mehr als fünf Monate oder sie waren Nachzuchttiere. Die frisch abgesetzten Kotproben wurden, frei von Kontaminationen mit Bodenmaterial, in sterile Plastikröhrchen abgefüllt und innerhalb von 24 Stunden verarbeitet. Die Kotproben wurden 1:5 (w/v) in steriler Phosphat-gepufferten Salzlösung pH 7,4 aufgeschwemmt und dann durch Gaze gefiltert um große Partikeln zu entfernen. Bei Bedarf wurden störende Harnsäurekristalle aufgelöst. Die Sedimente wurden je 10 min mikroskopisch nach Endoparasiten durchmustert. Wenn in 80 µl Sedimentsuspension mindestens eine der charakteristischen Zysten der Amöbenfamilien Vahlkampfiidae oder Acanthamoebidae (Abb. 1) zu finden war, wurden die Amöben auf NNN-Agarplatten bei 24°C mit hitzeinaktivierten Enterobakterien kultiviert, vermehrt und kloniert. Jedes Isolat wurde zuerst nach Standardmethoden (9) determiniert, bei Bedarf dann gentechnologisch typisiert (10).

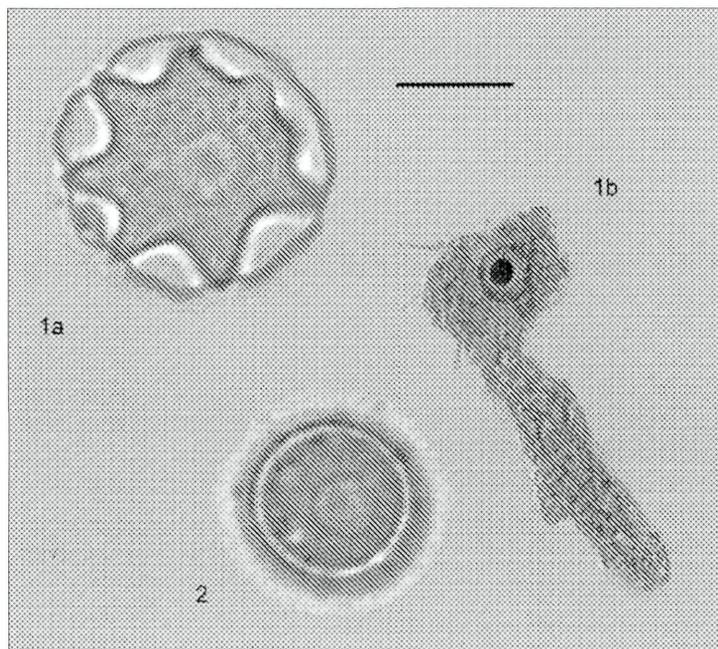


Abbildung 1:

(1a) Zyste und (1b) Trophozoit von *Acanthamoeba* sp. (2) Zyste von *Naegleria* sp.

Balken = 10 µm.

Die untere Nachweisgrenze unserer Kotaufarbeitungstechnik wurde durch eine zehnfach wiederholte Verdünnungsreihe von *Acanthamoeba*-Zysten in einer negativen Kotalaufschwemmung bestimmt. Konnten Amöben in den Kotproben nachgewiesen werden, so wurden die Glasscheiben und die Einrichtungen der Terrarien mittels Abstrichen untersucht. Die Enterobakterienfauna der amöbenhaltigen Kotproben und die Salmonellenkontamination aller Proben wurde durch Anzucht auf Kulturplatten (SMID) und Identifikation mittels api Systems (bioMerieux GesmbH, Wien, Österreich) bestimmt.

Die anamnestischen Daten wurden zum Zwecke der Erstellung epidemiologischer Aussagen mittels two tailed Fisher's exact test analysiert. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant eingestuft.

Ergebnisse

Die untere Nachweisbarkeitsgrenze unseres Verfahrens lag bei etwa 60 Zysten (SD: 8) pro g frischen Kotes, d. h. einer Zyste in 15 mg Kot. Aus allen Proben, in denen mikroskopisch Amöben gefunden wurden, konnten diese auch isoliert und vermehrt

werden. Sechs Fälle von Infestationen mit fl-Amöben wurden entdeckt, die Details sind in Tab. 1 aufgelistet. Es konnten keine Dauerausscheider festgestellt werden. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse einer Analyse mehrerer, potentiell das Auftreten von normalerweise freilebende Amöben im Reptilienkot beeinflussender Faktoren zusammengefasst.

Diskussion

Das Auftreten von freilebenden, potentiell parasitischen Amöben im Kot von Reptilien wird sehr widersprüchlich kommentiert. Da diese Amöben ubiquitäre Organismen sind, vermuten manche Bearbeiter, dass so gut wie immer Pseudoparasitismus in Form von Aufnahme und Ausscheidung der unveränderten Zysten vorliegt (7). Dagegen sprechen allerdings die Befunde dieser Studie; insbesondere konnten wir nicht in allen Fällen einer Zystenexkretion die gleichen Amöbenarten auch aus den Terrarien und deren Einrichtung isolieren. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (7) postulieren wir daher das Vorliegen einer vorübergehenden Besiedlung des Darmsystems der Wirtstiere durch diese Amöben. Diese Besiedlung scheint jedoch zu keinerlei erkennbarer Beeinträchtigung oder zu Krankheitssymptomen zu führen, wie übereinstimmend von uns und anderen beobachtet werden konnte (1, 2). Es handelt sich daher mit größter Wahrscheinlichkeit um Kommensalismus.

Das Auftreten von fl-Amöben in den Kotproben unseres Reptilienkollektivs ist ein verhältnismäßig seltenes Ereignis (6/374; 2%) verglichen mit den Inzidenzen, die andere Autoren beschrieben (42 - 93%; 6). Die Häufigkeit könnte allerdings von uns auf Grund der Anwendung eines wenig sensitiven Screening-Verfahrens unterbewertet werden. Da in früheren Studien keine Angaben zur unteren Nachweisgrenze der eingesetzten Techniken gemacht wurden ist eine Datenkorrektur nicht möglich. Es erscheint uns außerdem unmöglich, im Freiland gesammelte Kotproben von möglicherweise nachträglich eingewanderten Amöben zu befreien.

Bemerkenswert ist, dass die mit der Zugehörigkeit zu einer Unterordnung verbundenen anatomischen und physiologischen Eigenheiten eines Reptils wenig Einfluss auf die Häufigkeit der Amöbenexkretion zu haben scheinen. Auch das Terrarienklima hat wenig Bedeutung, in unserem Untersuchungskollektiv sind in Wüstenterrarien lebende Reptilien selten von Amöben kolonisiert. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Erhebungen an freilebenden Wüstenreptilien (6, 7). Da Zysten

Tabelle 1:

Freilebende, potentiell parasitische Amöben und syntop auftretende Bakterien im Kot von Reptilien und im Terrarium.

Tt: Thermotoleranz des Stammes (= Vermehrung bei 40°C).

Nr.	Wirtspecies	Probe	Amöbenspecies	Tt	Bakterienflora
1	<i>Chelus fimbriatus</i>	Kot	<i>Acanthamoeba</i> sp.	nd	<i>Citrobacter braakii</i> <i>Alcaligeoes denitrificans</i> <i>Pseudomonas spp.</i>
		Terrarium	<i>Acanthamoeba lenticulata</i> <i>Acanthamoeba triangularis</i>	+ -	
2	<i>Iguana iguana 1</i>	Kot	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli 1</i>
		Terrarium	<i>Acanthamoeba</i> sp.	+	
3	<i>Varanus prasinus</i>	Kot	<i>Naegleria</i> sp. <i>Echinamoeba</i> sp.	- nd	<i>Salmonella</i> serovar 1 <i>Klebsiella spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Providenzia rettgeri</i> <i>Enterobacter aerogene</i> <i>Proteus mirabilis</i>
4	<i>Iguana iguana 2</i>	Kot Terrarium	<i>Naegleria australiensis</i> keine!	+	<i>Citrobacter freundii</i>
5	<i>Laudakia stellio</i>	Kot	<i>Vahlkampfia lobospina</i> <i>Hartmanella vermiformis</i>	+ nd	<i>Hafnia alvei</i> <i>Klebsiella pneumoniae ozeanae</i> <i>Escherichia coli type 1</i> <i>Enterobacter intermedius</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
6	<i>Cordylus cataphractus</i>	Kot	<i>Vahlkampfia</i> sp.	nd	<i>Hafnia alvei</i> <i>Escherichia fergusonii</i>

von fl-Amöben selbst aus heißem Wüstensand isoliert werden konnten (5), wäre zu erwarten, dass die Terrarieneinrichtung ein geeigneter Träger für den Transport und die Verteilung von Amöben ist.

Einige unserer Amöbenisolate vermehrten sich gut bei 40°C, eine Eigenschaft die üblicherweise als Anzeiger für eine mögliche Pathogenitätsentwicklung in Säugetieren angesehen wird (9). Diese Amöben besitzen also die Fähigkeit, Erkrankungen (Meningoenzephalitis und Keratitis) in den menschlichen Pflegern hervorzurufen. Kot von in Gefangenschaft gehaltenen Reptilien muss daher als potentielles Gesundheitsrisiko für den Menschen angesehen werden.

Da fl-Amöben Enterobakterien als Nahrung aufnehmen, diese aber teilweise unverdaut wieder ausscheiden (3, 9), wurde in dieser Studie auch die syntop vorkommende Fäkalbakterienflora bestimmt. Allerdings wurde nur eine schwache Assoziation mit Pseudomonaden nachgewiesen, Bakterien, die eine bevorzugte Nahrung für fl-Amöben sind (3) und zudem sehr häufige Umweltkeime sind. Es konnte keine Verbindung zwischen fl-Amöben und den im Reptiliendarm häufig zu findenden Salmonellen hergestellt werden. Das Gefährdungspotential der syntop auftretenden Bakterien für die menschliche Gesundheit wird von WALOCHNIK et al. (11) diskutiert.

Da der Aktionsradius der fl-Amöben unklar ist, bedarf ihre Rolle während der Keimangleichung zwischen verschiedenen Tieren innerhalb eines Terrariums und zwischen den Tieren und dem Terrarianer weiterhin der Aufklärung (4).

Diese Studie liefert den ersten Nachweis von *NAEGLERIA AUSTRALIENSIS* in Österreich und weltweit den ersten Nachweis dieser Spezies sowie von *ACANTHAMOEBA POLYPHAGA* im Kot von Reptilien.

Tabelle 2:

Die Exkretion von Amöben im Kot von in Terrarien gehaltenen Reptilien beeinflussende Faktoren. Signifikante p-Werte sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	n =	positive	p-Wert
Unterordnung der Wirtstiere:			
Serpentes	118	0	0,183
Lacertilia	229	5	0,412
Pleurodira (Chelonia)	27	1	0,364
Terrariumklima:			
subtropisch arid	112	2	1,000
mäsich (Wald)	58	0	0,600
tropisch humid	186	3	1,000
semiaquatisch	18	1	0,258
Nahrung:			
Wirbeltiere	98	0	0,202
Insekten und andere Wirbellose	214	3	0,999
Pflanzen	18	2	0,029
gemischtes Futter	44	1	1,000
Syntop auftretende Salmonellen-Infestation	75	1	1,000
Syntop auftretende Pseudomonas-Infestation	75	4	0,016

Zusammenfassung

Diese retrospektive Studie war den Fragen gewidmet, ob Reptilien als exotische Haustiere Wirte und Verteiler von normalerweise freilebenden, potentiell pathogenen Amöben sein können und ob die syntop auftretenden Fäkalbakterienflora ein Gesundheitsrisiko für die Tiere und für die Pflegepersonen darstellt. In 374 Kotproben von in Gefangenschaft gehaltenen Reptilien wurden sechs Fälle der Ausscheidung von Zysten solcher Amöben nachgewiesen. Aus den Proben und von den Oberflächen der Terrarien wurden 11 Amöbenstämme der Gattungen *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmanella* und *Echinamoeba* isoliert, vermehrt, physiologisch charakterisiert und genetisch bis auf Speziesniveau typisiert. Überdies wurde die begleitende Enterobakterienflora bestimmt und anamnestiche Daten bearbeitet. Amöbenzysten werden zwar selten (Häufigkeit: 2%), aber manchmal in erheblichen Mengen im Kot von klinisch unauffälligen Reptilien aus allen üblicherweise als Haustieren gehaltenen Unterordnungen gefunden. Der Terrarientyp scheint keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Zysten-

exkretion zu haben, auch Dauerausscheider scheinen kaum zu existieren. Allerdings ist die Fähigkeit dieser Amöben als ursächliches pathogenes Agens zu fungieren weiterhin unklar, ebenso ihre Rolle als Transportmedium für medizinisch wichtige Bakterien: nur *Pseudomonas* sp. wurde regelmäßig gefunden, es gab keine Korrelation mit dem Nachweis von Salmonellen.

Schlüsselwörter

Freilebende Amöben, Reptilien, opportunistische Parasiten, Herpetologie, Veterinär-Mikrobiologie.

Summary

Free-living amoebas as opportunistic intestinal parasites of reptiles

This retrospective study was dedicated to the questions whether reptiles as exotic pet animals may act as hosts and distributor of free-living, potentially pathogenic amoebas and whether the syntopically occurring faecal bacteria flora may be a potential health hazard for the animals as well as for the keepers. In 374 faeces samples of captive reptiles six cases of excretion of cysts of such amoebas could be detected. From these samples and from the inanimate terraria surfaces 11 strains of amoeba genera *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmanella*, and *Echinamoeba* could be isolated, multiplied, physiological characterised, and genotyped to species level. Moreover, the accompanying enterobacterial flora was determined and anamnestic data were prepared. Amoeba cysts are rarely but sometimes in substantial numbers found in the faeces of clinically inconspicuous reptiles of all suborders usually kept as pets (incidence: 2%). The terraria type seem to have no influence on the incidence of amoeba excretion and there seem to be no long lasting excretion. Yet, the ability of these amoebas to act as the causative pathogen remains unclear as well as their role as vector of medical important bacteria: only *Pseudomonas* sp. was regularly found syntopically occurring with amoeba cysts whereas there is no correlation with the finding of *Salmonella* sp.

Key words

Free-living amoeba, reptiles, opportunistic pathogens, herpetology, veterinary microbiology.

Danksagung Die Autoren danken Mag. J. Walochnik für ihre großzügige Kooperation.

Literatur

1. BOSCH, I., DEICHSEL, G. (1972):
Morphologische Untersuchungen an pathogenen und potentiell pathogenen Amöben der Typen „Entamoeba“ und „Hartmanella-Acanthamoeba“ aus Reptilien.
Z. Parasitenkunde 40, 107-129.
2. FRANK, W., BOSCH, I. (1972):
Isolierung von Amöben des Typs „Hartmanella-Acanthamoeba“ und „Naegleria“ aus Kaltblütern.
Z. Parasitenkunde 40, 139-150.
3. HALL, J., VOELZ, H. (1985):
Bacterial endosymbionts of Acanthamoeba sp.
J. Parasitol. 71, 89-95.
4. HASSL, A. (1998):
Krankheiten und Krankheitsabwehr.
In: R. Hofrichter (ed.): Amphibien. pp. 108-110. Naturbuch Verlag Augsburg.
5. LASTOVICA, A. J (1980):
Isolation distribution and disease potential of Naegleria and Acanthamoeba (Order: Amoebida) in South Africa.
Trans. Roy. Soc. South Africa 44, 269-278.
6. MADRIGAL SESMA, M. J., ZAPATERO RAMOS, L. (1989):
Isolation of free-living amoebas from the intestinal contents of reptiles.
J. Parasitol. 75, 322-324.
7. MADRIGAL SESMA, M. J., CHAMARRO GARCIA, L., GUILLEN, L. P. (1988):
Free-living amoebas and coldblooded animals.
J. Parasitol. 74, 883-884.
8. MARTINEZ, A. J., VISVESVARA, G. S. (1997):
Free-living, amphizoic and opportunistic amebas.
Brain Pathology 7, 583-598.
9. PAGE F, C. (1991):
Nackte Rhizopoda.
In: Matthes D. (ed.): Protozoenfauna Band 2 pp. 7-170. G. Fischer, Stuttgart New York.
10. WALOCHNIK, J., HASSL, A., SIMON, K., BENYR, G., ASPÖCK, H. (1999):
Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living amoebae from necrotic tissue of Basiliscus plumifrons (Sauria: Iguanidae).
Parasitol. Res. 85, 601-603.
11. WALOCHNIK, J., PICHER, O., ASPÖCK, C., ULLMANN, M., SOMMER, R., ASPÖCK, H. (1998):
Syntopes Vorkommen und humanmedizinisch relevante Interaktion von "Limax-Amöben" und Bakterien in Feuchthabitaten im Krankenhaus.
Mit. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 20, 93-100.

Korrespondenzadresse Univ.-Prof. Dr. Andreas Hassl
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

Tel.: +43 664 2302413
Fax: +43/1 403 8343 90
E-Mail: andreas.hassl@univie.ac.at

