©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10 (1988) 9 - 14

Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. M. Seitz)

# Versuche zur Infektion von Gewebekulturzellen von *Aedes albopictus (Diptera; Culicidae)* mit gereinigten Sporen von *Nosema algerae*

**C. Adl-Amini, W. A. Maier, H. Becker-Feldmann, H. M. Seitz**

## Einleitung

Mikrosporidien der Gattungen *Nosema* und *Vavraia* reduzieren in Stechmücken-Populationen die Überlebensrate und damit auch die Dichte der Mücken. In den an Mikrosporidiose erkrankten Culiciden wird außerdem die Entwicklung von Plasmodien stark behindert (6). Daher liegt es nahe, Mikrosporidien zur Bekämpfung der Malaria einzusetzen. Voraussetzung für eine derartige biologische Bekämpfung ist jedoch die Massenproduktion von Sporen. Dies sollte möglichst in dem zur Bekämpfung vorgesehenen Wirtsgewebe stattfinden, um Veränderungen der Wirtsspezifität oder Virulenz als Folge der Vermehrung in einem fremden Wirt vorzubeugen. Neben der Produktion in *Anopheles* wurden auch Infektionsversuche in Insektenzellkulturen durchgeführt, um die Entwicklung der Mikrosporidien in vitro untersuchen zu können.

## Material und Methoden

Zellen:

Die Versuche wurden mit Epithelzellen der Culiciden-Spezies *Aedes albopictus* (CCL-126) der Firma Flow durchgeführt.

Medien:

Als günstigstes Medium für diese Zellinie hat sich das Kulturmedium von Mitsuhashi und Maramorosch (M & M) mit 10% FKS bei einem pH-Wert von 7,0 - 7,2 erwiesen. Die optimale Wachstumstemperatur lag zwischen 26 - 28° C. Als geeignetes Medium für die Aktivierung der Mikrosporidiensporen hat sich RPMI 1640 mit 10% FKS und 7,5% $NaHCO_3$ (Konzentration: 2,7 ml/100ml Medium) erwiesen (1).

Sporen:

Die Sporen wurden aus Homogenaten von infizierten *Anopheles stephensi*-Larven und Adulten gewonnen. Für die Infektion der *Aedes albopictus*-Zellinie wurden gereinigte, sterile und aktivierte Suspensionen von *Nosema algerae*-Sporen verwendet (1).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Vorbehandlung von Sporen:

10 Millionen Sporen wurden in 5 ml RPMI 1640 bei einem pH-Wert von 7,0 resuspendiert. Um diese Suspension von Mikroorganismen zu befreien, wurde sie für 5 Stunden bei 27° C in 1 ml einer Antibiotika-Mischung, bestehend aus 3,5 ml Penicillin-Streptomycin (5000 U/mg), 2,5 ml Kanamycin (5000 U/mg) und 1,5 ml Fungizone (250 U/mg) (Fa. Flow.), inkubiert. Danach wurde diese Suspension zweimal in RPMI 1640 bei einem pH-Wert von 7,0 jeweils 10 min. bei 4000 g zentrifugiert, um die Antibiotika aus der Suspension herauszuwaschen. Anschließend wurde eine Verdünnung von 100.000 Sporen/0,25 ml RPMI 1640 bei einem ph-Wert von 7,0 aus dieser Suspension hergestellt.

Kultivierung der Zellen:

Zuerst wurde die *Aedes albopictus*-Zellinie von ihrem ursprünglichen Medium (Mitsuhashi und Maramorosch mit 10% FKS bei einem pH-Wert von 7,2) auf das für die Sporenausstülpung geeignete Medium (RPMI 1640 mit 10% FKS und 7,5% $NaHCO_3$ bei einem pH-Wert von 7,4) adaptiert und weitergezüchtet. Jeweils 300.000 dieser Zellen wurden auf einem runden Deckglas in einer TCC 24 well-Platte (Fa. Costar) für 48 Stunden bei 28° C kultiviert.

Infektion der Zellen mit Sporen:

Die verdünnten Sporensuspensionen (s. o.) wurden zu den Zellen gegeben, die auf den runden Deckgläsern gewachsen waren. Die maximale Inkubationszeit betrug 4 Stunden. Alle 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 5, 10, 15, 20, 30 Minuten, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 Stunden wurden die Deckgläser mit Methanol fixiert und mit Giemsalösung (1 : 20) gefärbt.

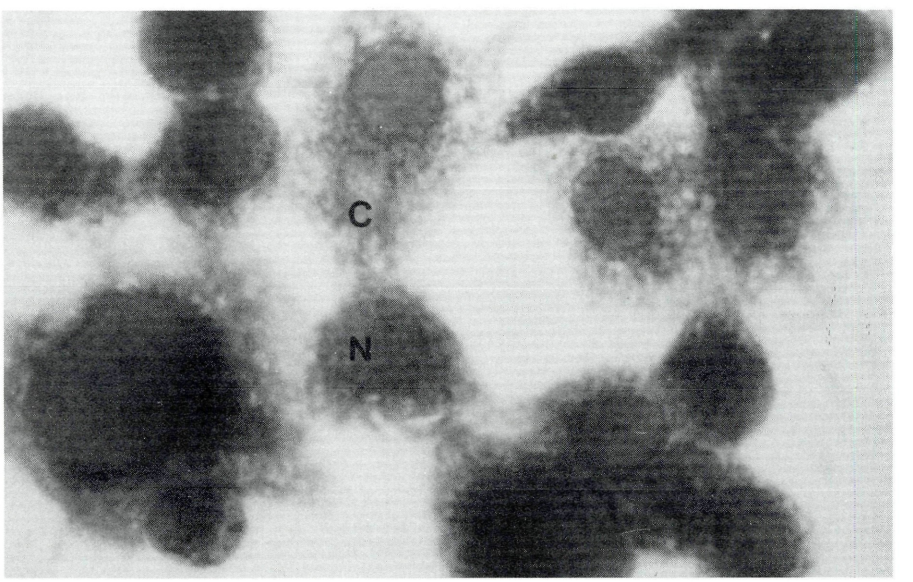


Abb. 1:
Gewebekulturzellen von *Aedes albopictus*
*N = Nucleus der Gewebekulturzelle · C = Cytoplasma der Gewebekulturzelle*
*Vergr. 1664 : 1*

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

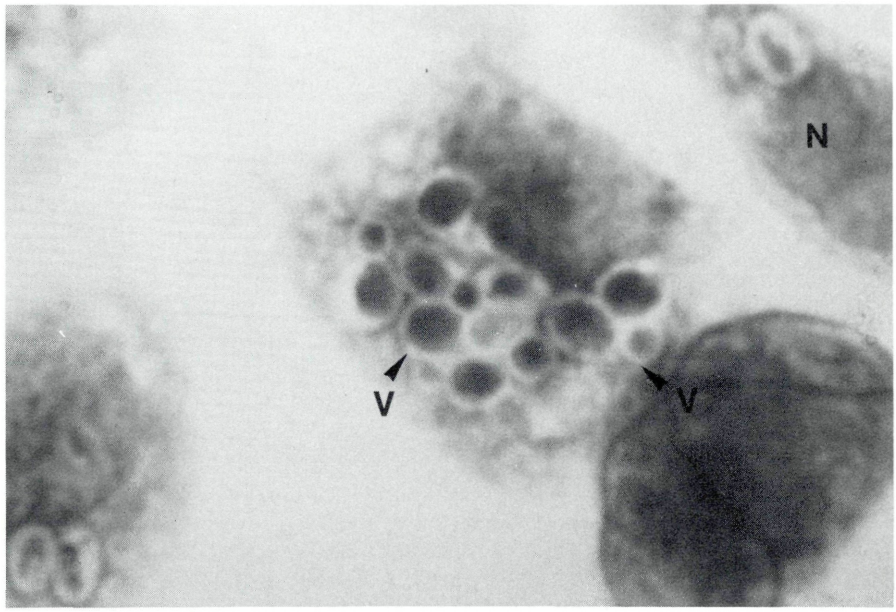


Abb. 2:
Gewebekulturen, infiziert mit *N. algerae* (24 hpi)
N = Nucleus der Gewebekulturzelle · V = Vegatative Stadien der Parasiten
Vergr. 2080 : 1

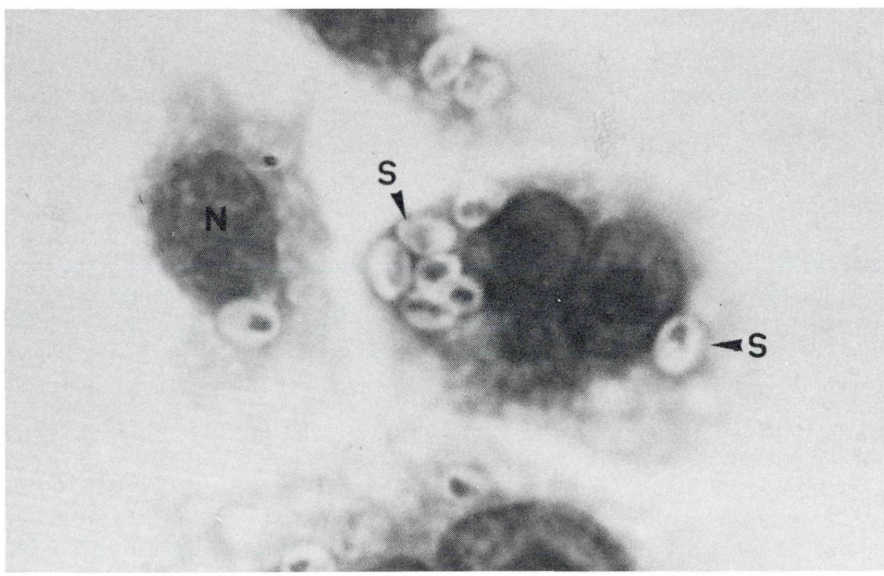


Abb. 3:
Gewebekulturzellen, infiziert mit *N. algerae* (48 hpi)
N = Nucleus der Gewebekulturzelle · S = Sporen von *N. algerae*
Vergr. 2080 : 1

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

## Ergebnisse

Dekontamination der Sporen:

Vorversuche haben gezeigt, daß die Sporen, wie zu erwarten, trotz der Reinigung mit Percoll noch nicht vollkommen frei von Bakterien und Pilzen waren. Deshalb wurden sie mit Antibiotika behandelt. Danach traten keine Kontaminationen in der Zellkultur mehr auf. Die Antibiotika mußten allerdings so dosiert werden, daß sie einerseits die Mikroorganismen abtöteten, andererseits aber nicht die Keimung der Sporen verhinderten. Eine Überdosierung von Antibiotika verhindert nämlich die Ausschleuderung der Polfäden in vitro. Die Aktivierung der Sporen ist für die Infektion der Wirtszellen wichtig, da offenbar nur über diesen Prozeß die Amöboidkeime in die Zellen eindringen können.

Infektion der Zellen mit Sporen:

Auf den gefärbten Deckgläsern kann man im Zeitraum von 5 bis 60 min. nach der Inkubation eine Ausstülpung der Polfäden beobachten. An der Polfadenspitze erscheint ein zweikerniger Amöboidkeim. Die Ausschleuderung der Sporen erfolgt anscheinend ungerichtet, da viele Amöboidkeime frei im Medium lagen. Nach 2 Stunden können in die Zellen eingedrungene Amöboidkeime gefunden werden. Nach 24 Stunden (Abb. 2) kann man Vermehrungsstadien der Mikrosporidien in den Zellen erkennen. Die intrazelluläre Vermehrung der Mikrosporidien ist in vitro nach 48 Stunden abgeschlossen (Abb. 3). Nach 72 Stunden liegen die Sporen der neuen Generation frei im Medium. Die Wirtszellen sind nicht mehr zu erkennen.

## Diskussion

Nachdem eine vollständige Reinigung und Dekontamination der *Nosema algerae*-Sporen erreicht war, konnte dieses Sporenmaterial erfolgreich für in vitro-Infektionen von Moskito-Kulturzellen eingesetzt werden.

Um *Nosema*-Sporen in Zellkultur aktivieren zu können, inkubierten verschiedene Autoren (3, 4, 5, 8) sie vor der Infektion 40 min. mit 0,1 N KOH. In unseren Experimenten wurde dieser Vorgang im Gegensatz dazu in RPMI mit 10% FKS und $NaHCO_3$ bei einem pH-Wert von 7,4 erzielt (1). Diese Behandlung erscheint uns wesentlich schonender und physiologischer. Fast alle Sporen schleuderten schon einige Sekunden nach der Inkubation im Zellkulturmedium ihren Polfaden aus. Die Entwicklungszeit der Mikrosporidien in den Zellen betrug unter unseren Bedingungen 48 Stunden. Nach 72 Stunden waren die Gewebekulturen lysiert, und die Sporen lagen frei im Kulturmedium. Nach AVERY et al. (2) ist der in vivo-Entwicklungszyklus von *Nosema algerae* in 72 Stunden abgeschlossen. Auch UNDEEN (7) vermehrte *Nosema algerae* in Schweine-Nieren-Kulturzellen innerhalb von 2 bis 3 Tagen. STREETT et al. (7) gelang die Vermehrung von *N. algerae* in drei verschiedenen Insektenzellinien. In jeder der drei Wirtszelltypen dauerte die Sporenentwicklung drei Tage. Allerdings benötigten KURTTI et al. (5) für den kompletten Entwicklungszyklus einer zweikernigen Mikrosporidien-Art in einer *Heliothis zea*-Zellinie (Lepidoptera : Noctuidae) sechs Tage. Das Infektionsverhältnis Zelle zu Sporen lag bei anderen Autoren (3, 4, 5, 7, 8) zwischen 1 : 10 bis 1 : 30. Hier wurden die Sporen während des gesamten Experiments im Kulturgefäß belassen. In unseren Experimenten betrug das Verhältnis von Zellen zu Sporen 3 : 1 und die Inkubationszeit betrug maximal 4 Stunden.

Zwei Autoren (3, 4) beobachteten bei Infektionen von zwei verschiedenen Gewebekulturzellen mit *Nosema bombycis* eine extrazelluläre, sekundäre, infektiöse Form

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

von *Nosema bombycis.* Solche Formen wurden von anderen Autoren (5, 7, 8) nicht beobachtet. In der vorliegenden Arbeit konnte eine solche extrazelluläre sekundäre Form ebenfalls nicht beobachtet werden.

STREET et al. (7) konnten eine Infektion von *Nosema algerae* in drei verschiedenen Insektenzellinien nur über sechs Passagen aufrechterhalten. Wir wollen überprüfen, ob unsere Mikrosporidien sich längere Zeit in vitro vermehren lassen. Außerdem muß untersucht werden, ob dieses Material zur Infektion unserer *Anopheles*-Larven geeignet ist.

Weitere Untersuchungen, vor allem mit Hilfe der Elektronenmikroskopie, sollen Einzelheiten des Eindringens und der Vermehrung der Parasiten in den Wirtszellen klären. Außerdem soll geprüft werden, ob die Massenproduktion von Sporen in vitro die in vivo-Produktion übertreffen könnte.

**Zusammenfassung**

Die Sporen von *Nosema algerae* wurden vor der Infektion der Gewebekulturzellen gereinigt und durch Antibiotika dekontaminiert. Eine unbedingte Voraussetzung zur Infektion der Kulturzellen ist die Aktivierung der Sporen. Diese wurde in RPMI 1640 mit 10% FKS und 7,5% $NaHCO_3$, bei einem pH-Wert von 7,4 erzielt.

Die Vermehrung der Mikrosporidien begann nach 48 Stunden in *Aedes albopictus*-Zellen und endete nach 72 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren keine Gewebekulturzellen mehr vorhanden.

**Schlüsselwörter**

Mikrosporidien, Anopheles, Zellkultur, Sporen.

**Summary**

## Experimental Infection of tissue cells of *Aedes albopictus (Diptera; Culicidae*), with sterilized spores of *Nosema algerae (Microsporida; Microspora)*

The spores of *Nosema algerae* before being introduced into the tissue culture cells were purified and decontaminated with antibiotics.

A precondition for the infection of the culture cells is the extrusion of spore filaments. This was achieved with RPMI 1640 as culture medium supplement with 10% fcs and 7.5% $NaHCO_3$ adjusted to ph 7.4. An increase in the number of microsporidia was observed after 48 hours in *Aedes albopictus* cells, and reached its peak after 72 hours. At this moment epithelial cells were no longer visible.

**Key words**

Microsporidia, Anopheles, cell culture, spores.

**Literatur**

1. ADL-AMINI, C., MAIER, W. A., SEITZ, H. M. (1987):
Versuche zur hochgradigen Reinigung und in vitro-Aktivierung der Sporen von Nosema algerae (Microsporida, Microspora) aus Anopheles stephensi (Diptera) unter physiologischen Bedingungen. Mitteilung DGaaE, Heidelberg (im Druck).

2. AVERY, S. W., ANTHONY, D. W. (1983):
Ultrastructural study of early development of Nosema algerae in Anopheles albimanus. J. of Invertebrate Pathology 42, 87 - 95.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

3. ISHIHARA R. (1969):
The life cycle of Nosema bombycis as revealed in tissue culture cells of Bombyx mori.
J. of Invertebrate Pathology 14, 316 - 320.

4. KAWARABATA, T., ISHIHARA, R. (1984):
Infection and development of Nosema bombycis (Microsporida : Protozoa) in a cell line of Antheraea eucalypti.
J. of Invertebrate Pathology 44, 52 - 62.

5. KURTTI, T. J., BROOKS, M. A. (1977):
The rate of development of a microsporidian in moth cell culture.
J. of Invererbrate Pathology 29, 126 - 132.

6. SCHENKER, W., MAIER, W. A., WEYLER, D., BECKER-FELDMANN, H., CHIORALIA, G., ADL-AMINI, C., SEITZ, H. M. (1987):
Effects of Vavraia culicis (Microsporida) upon malaria infection in Anopheles mosquitoes.
3rd International Conference on Malaria and Babesiosis Abstracts p. 170, Annecy.

7. STREET, D. A., DAVID, R., HINK, W. F. (1980):
Replication of Nosema algerae in three insect cell lines.
J. Protozool. 27, pp. 113 - 117.

8. UNDEEN, A. H. (1975):
Growth of Nosema algerae in pig kidney cell cultures.
J. Prozozool. 22, 107 - 110.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dipl. Biol. C. Adl-Amini
Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn

Sigmund-Freud-Straße 25
D-5300 Bonn
Bundesrepublik Deutschland

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: 10

Autor(en)/Author(s): Maier Walter A., Adl-Amini C., Becker-Feldmann H., Seitz Hanns Martin

Artikel/Article: Versuche zur Infektion von Gewebekulturzellen von Aedes albopictus (Diptera; Culicidae) mit gereinigten Sporen von Nosema algerae. 9-14