

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10 (1988) 33 - 39

Abteilung für Med. Parasitologie (Leiter: Univ. Prof. Dr. H. Aspöck)
des Hygiene-Instituts der Universität Wien (Vorstand: Univ. Prof. Dr. H. Flamm)

Toxoplasma gondii in der Gewebekultur — Einsatz in Forschung und Praxis

K. Hermentin, H. Auer, H. Aspöck

Einleitung

Seit etwa 2½ Jahren werden in der Abteilung für Med. Parasitologie des Hygiene-Instituts der Universität Wien Toxoplasmen in der Gewebekultur gezüchtet. Von Anfang an bis zum heutigen Zeitpunkt standen die Bemühungen um Reduktion der normalerweise für die Züchtung der Toxoplasmen notwendigen Tierversuche im Vordergrund. Daß darüberhinaus die Anwendung der in vitro-Methode auch neue und erweiterte Möglichkeiten im Forschungsbereich bietet und für die Praxis bei manchen Fragestellungen eine wertvolle Hilfe leistet, soll anhand einer Übersicht über die in den vergangenen 2½ Jahren durchgeführten Arbeiten gezeigt werden.

Material und Methoden

Toxoplasma-Stamm:

BK, virulent.

Zelllinie:

Humane Larynx-Karzinomzellen HEp-2; CCl 23, American Type Culture Collection (Rockville, USA).

Nährmedium:

Minimum Essential Medium Eagle (modified), mit Earles Salzen und 2 g/l Natriumkarbonat (Flow Lab., GB).

Zusätze: 10% hitzeinaktiviertes (30 Minuten bei 56° C) fötales Kälberserum (Flow Lab.), seronegativ gegenüber *Toxoplasma gondii* im Indirekten Hämagglutinationstest, 1% L-Glutamin (Gibco), 1% Antibiotica/Antimycotica (Gibco), 1% Neomycin (Gibco).

Kultivierung:

Die Zellen wurden in 25 und 75 cm² Polystyrolflaschen (Costar, NL) bei 37° C in einer 5% CO₂-Atmosphäre gezüchtet. Das Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen zum Zweck der Weiterverdünnung erfolgte mit 0,25% Trypsin (Flow Lab.). Zum Auszählen der Toxoplasmen diente eine Bürker-Türk Zählkammer.

Serologie:

Indirekter Immunofluoreszenztest, durchgeführt nach den Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes der BRD (3).

Antiseren: Anti-Maus-Serumproteine (Dako, DK) aus dem Kaninchen, Anti-Fötales-Kälberserum (Dako) aus dem Kaninchen.

Konjugate: Anti-Kaninchen IgG/FITC (Cappel, USA) aus dem Schaf, Anti-Human IgM/FITC (Atlantic Antibodies, USA) aus der Ziege.

Ergebnisse und Diskussion

Nach Etablierung der Gewebekultur an der Abteilung und Einführung der *in vitro*-Vermehrung von Toxoplasmen war es erstes Forschungsziel, die Kultivierungsbedingungen und Vermehrungsraten der Toxoplasmen zu verbessern. Erste Versuche mit Hela-Wirtszellen wurden schon bald abgelöst durch solche mit HEp-2-Zellen, da sich schnell zeigte, daß letztere besser für die *Toxoplasma*-Vermehrung geeignet sind und anschließend außerdem weit weniger Wirtszellreste im Medium übrigbleiben (unveröffentlicht).

Eine Überprüfung der Kriterien für die optimale *Toxoplasma*-Vermehrung ergab, daß in Abhängigkeit vom *Toxoplasma*- und Wirtszell-Inokulum die höchsten Ernteraten dann erzielt werden können, wenn Wachstum und Vermehrung der ungeschädigten Wirtszellen mit der *Toxoplasma*-Vermehrung und der damit zusammenhängenden Zerstörung der Wirtszellen über längere Strecken des Kultivierungszyklus hinweg Schritt halten (14). Eine Erhöhung des Erreger-Inokulums ist also meist nicht mit einer erhöhten Vermehrungsrate korreliert!

Eine Erhöhung der Ernteraten konnte im Unterschied zu herkömmlichen Methoden dadurch erzielt werden, daß zu Wirtszellen, die zum Zwecke der Ablösung vom Kulturf läschchen und zur Weiterverdünnung (Splitten) mit Trypsin behandelt worden waren, sofort Toxoplasmen zugesetzt wurden (10). Die Steigerung der Vermehrungsraten ist wahrscheinlich durch eine für den Parasiten erleichterte Wirtszellinvasion bedingt. Diese beruht vermutlich darauf, daß die Glycocalyx der Wirtszellen durch den Trypsinisierungsvorgang angegriffen wird (10).

Zusätzlich konnte durch die veränderte Kultivierungstechnik auch eine Verminderung der Wirtszellreste erreicht werden. Durch die Anhebung der Vermehrungsraten und durch die verbesserten Reinheitsgrade wurde schließlich eine günstige Kosten-Nutzen-Relation erzielt: die Kosten für die Zucht der Toxoplasmen in der Gewebekultur liegen nun nur noch unmaßgeblich höher als für die Zucht in der weißen Maus (16).

Trotz der verbesserten Reinheitsgrade ist bei der *in vitro*-Kultivierung von Toxoplasmen in der Regel noch ein zusätzlicher Reinigungsschritt erforderlich, um die verbleibenden geringen Mengen an Wirtszellresten zu entfernen. Viele der zur Verfügung stehenden Reinigungsmethoden sind zeit- und arbeitsaufwendig und daher praxisfern (z. B. Dichtegradientenzentrifugation, differenzierte Zentrifugation). Unter den einfachen, in der Praxis leicht durchzuführenden Reinigungsmethoden (5, 8, 9), die in der Mehrheit für die Reinigung von Toxoplasmen aus dem Mausperitonealexsudat entwickelt worden sind, erwies sich die Filtrierung durch Porenfilter mit 8 µm der Firma Nuclepore am geeignetsten (Tab. 1).

Bis vor kurzem sahen wir uns bei der *in vitro*-Kultur von Toxoplasmen in Karzinomzellen vor ein immer wiederkehrendes Problem gestellt: Bei der Weiterkultivierung der Toxoplasmen auf neue Wirtszellen trat regelmäßig bereits nach kurzer Zeit eine starke Abnahme der Vermehrungsraten ein, sodaß immer wieder nach einiger Zeit auf Toxoplasmen aus der Maus zurückgegriffen werden mußte. In jüngster Zeit konnte diese Schwierigkeit beseitigt werden. Versuche, die zu diesem Problem durchgeführt wurden, zeigten, daß es sich nicht um eine allgemeine Verringerung der *Toxoplasma*-Virulenz handelt, sondern um eine Verminderung an infektiösen Parasiten in der Kultur, bedingt durch einen Ausdünnungseffekt: nur ein bestimmter Teil der Toxoplasmen in der Kultur — nämlich jener, der erst vor kurzem die Wirtszellen verlassen hat, — ist zur Penetration neuer Zellen fähig. Länger im Medium frei vorliegende

Parasiten sind zwar lebend, können jedoch Wirtszellen nicht mehr penetrieren. Bei der Überimpfung von immer gleich bleibenden Mengen an Toxoplasmen kommt es daher von Mal zu Mal zur Verimpfung eines geringeren Prozentsatzes an infektiösen Toxoplasmen (15).

TABELLE 1
Vor- und Nachteile verschiedener, einfach durchzuführender Reinigungsmethoden

Methode	Eignung
Filterung über Glaswolle (Pyrex®, Corning, F)	ungeeignet, da Toxoplasma-Verluste von 70% (auch bei Silikonisierung der Glaswolle)
Filterung durch Borosilikatglasfilter, Porengröße 10 - 16 µm	sehr gut geeignet: hoher Reinheitsgrad der Toxoplasmen und gute Rückgewinnungsraten (ca. 60%), jedoch: rasches Verstopfen der Fritte erfordert aufwendige Reinigung
Filterung durch Membranfilter: Millipore® (Bedford, USA)	ungeeignet: in der Netzmatrix des Filters bleiben die Toxoplasmen hängen, geringe Rückgewinnung.
Filterung durch Membranfilter: Nuclepore® (Pleasanton, USA)	sehr gut geeignet: die Siebfiltermembran bedingt eine recht hohe Rückgewinnungsrate (ca. 60%) und einen hohen Reinheitsgrad (90 - 95%). Nachteil: relativ rasches Verstopfen und hohe Kosten der Filter. Es bewährten sich Porenfilter mit 8µm und ein Filtrieren ohne Vakuum.

Im Jahr 1986 gelang es erstmals, Toxoplasmen unter gänzlich standardisierten Bedingungen in serumfreien Medien zu züchten (11, 13).

Normalerweise müssen Toxoplasmen oder zumindest die Wirtszellen in serumhaltigen, nicht definierten Kulturmedien herangezogen werden. Dies bedingt jedoch, daß eine unbekannte Anzahl nicht bestimmbarer Proteine und anderer Substanzen in das Medium eingebracht werden, wodurch eine Standardisierung des Parasiten bzw. seiner Antigene unmöglich oder zumindest äußerst schwierig wird. Wir züchteten Wirtszellen und Toxoplasmen in zwei verschiedenen Medien (Iscove's, SHITE) mit definierten Zusätzen und einem Proteingehalt, der auf 0,003% (Iscove's) bzw. 0,1% (SHITE) herabgesetzt werden konnte (11).

Untersucht und vergleicht man einerseits Toxoplasmen, die aus der Gewebekultur im serumhaltigen Medium stammen, andererseits solche, die serumfrei kultiviert wurden und schließlich jene, die aus der Maus stammen, im Indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) auf Fremdproteine (Proteine aus dem fötalen Kälberserum [FKS], Mausproteine), so zeigt sich (Tab. 2), daß Toxoplasmen aus der Maus auch nach zweimaligem Waschen noch immer Mausproteine an der Oberfläche aufweisen (Antiserum: anti-Maus-Serumproteine). Gleichermaßen weisen Toxoplasmen aus der Gewebekultur mit serumhaltigen Medien Fremdproteine auf, die vom fötalen Kälberserum stammen (Antiserum: anti-FKS).

(Schwach positive Reaktionen mit dem „nicht homologenen“ Antiserum [Tab. 2] dürften aus Kreuzreaktionen mit unspezifischen Serumproteinen zurückzuführen sein.) Hingegen zeigen serumfrei kultivierte Toxoplasmen im IIFT weder Reaktionen mit dem anti-Maus-Serum noch mit dem anti-FKS-Serum (12).

TABELLE 2
**Ergebnisse des Indirekten Immunfluoreszenztests zum Nachweis von an Toxoplasmen
angelagerten Fremdproteinen.**
(+ = Positiv · — = Negativ · (+) = schwach positiv

	IIFT mit	
	anti-fötalem Kälberserum	anti-Maus Serumproteine
Toxoplasma gondii in Gewebekultur mit serumhaltigen Medien	+	(+)
Toxoplasma gondii in Gewebekultur serumfrei kultiviert	—	—
Toxoplasma gondii aus dem Peritonealexsudat von Mäusen	(+)	+

Für den Parasiten dürfte die hohe Affinität zu Fremdproteinen, d. h. die teilweise Maskierung seiner Oberfläche mit wirtseigenen Proteinen, darin ihre Bedeutung haben, daß die Immunabwehr des Wirtes umgangen bzw. herabgesetzt wird.

Im Forschungsbereich ergibt sich durch die Anlagerung von Fremdprotein an die Toxoplasmen bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern die Notwendigkeit, darauf zu achten, daß nicht fälschlicherweise monoklonale Antikörper gegen das Wirtprotein selektiert werden.

In der Diagnostik erbrachte die Anwendung von Toxoplasmen mit reduziertem Fremdproteinanteil (Toxoplasmen, die in serumfreien Medien mit stark vermindertem Proteingehalt gezüchtet wurden) eine Erhöhung der Sensitivität in serologischen Tests zum Nachweis von IgM-Antikörpern (Abb. 1). Voraussetzung hierfür ist die Unterbringung einer kompetitiven Hemmung, d. h. eine vorangehende Abtrennung der IgG-Fraktion ist notwendig. Außerdem müssen nach oder während der Serum-Inkubationszeit, ähnlich wie im Enzymimmuntest freie Antigen-Bindungsstellen mit Protein abgesättigt werden, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden.

Eine Erhöhung der Sensitivität ist überall dort von Bedeutung, wo besonders empfindliche serologische Tests gewünscht sind, beispielsweise zum Nachweis von IgM-Antikörpern aus dem Nabelschnurblut bei fraglicher konnataler Toxoplasmose bei Neugeborenen, und ist ferner für bestimmte Fragestellungen im Rahmen der Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft von Interesse (2).

Derzeit sind wir bemüht, die Gewebekultur zur Erregerisolierung, z. B. bei Material, das von AIDS-Patienten stammt, einzusetzen. Lange Zeit galt der Einsatz der Gewebekultur für Isolierungsversuche als ungeeignet oder weniger sensitiv, verglichen mit dem Mausinokulationstest (1). Heute kann diese Ansicht nicht mehr als zutreffend gelten. Neueste vergleichende Untersuchungen zeigten, daß die Gewebekultur-

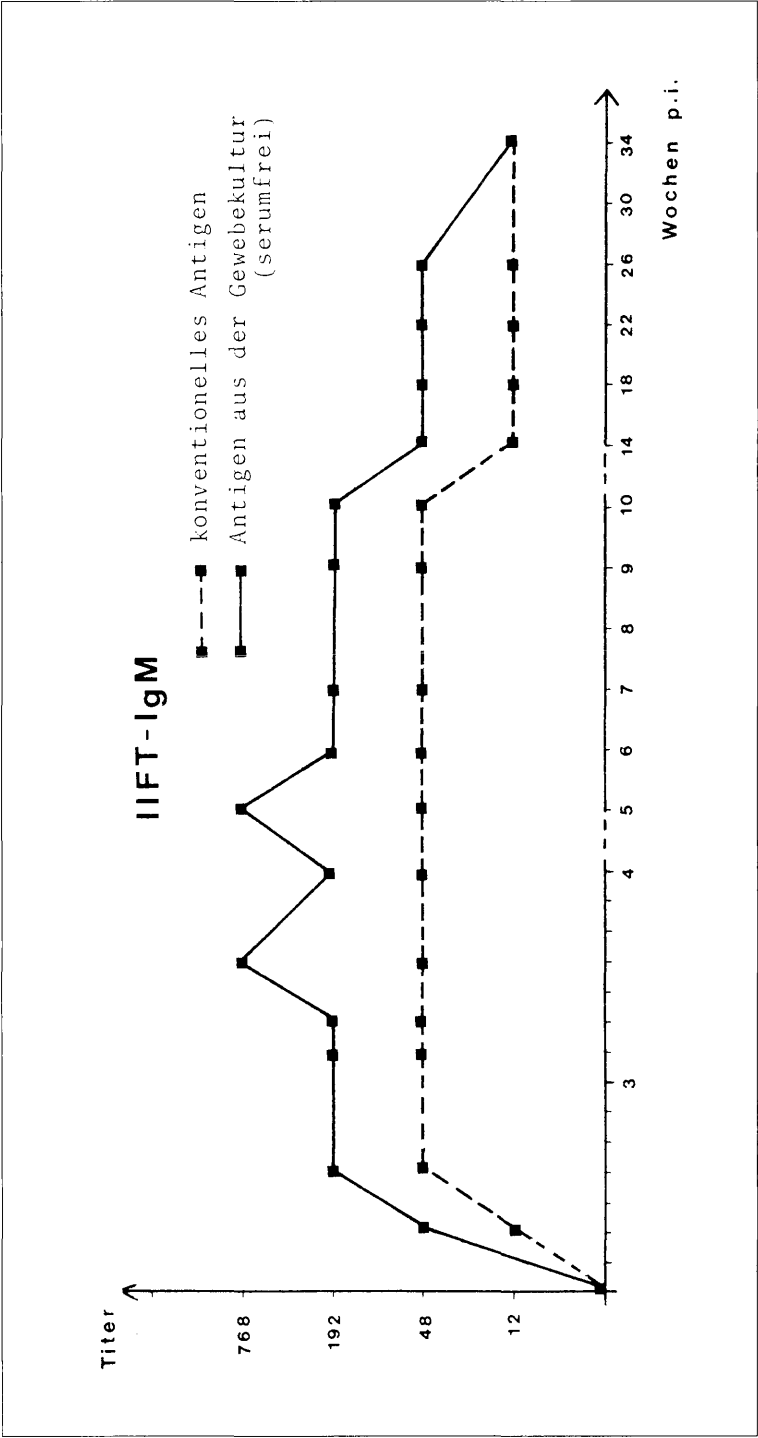


Abb. 1

Titerverlaufscurve nach einer Laborinfektion mit *Toxoplasma gondii*: Ergebnisse des Indirekten Immunfluoreszenztests zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper (nach vorangegangener Entfernung der IgG-Antikörper) unter Verwendung zweier unterschiedlicher Antigene.

Methode zumindest genauso sensitiv ist wie der Maus-Inokulationstest (7). Der Vorteil der Gewebekultur liegt darin, daß das Ergebnis bereits nach etwa einer Woche vorliegt und nicht, wie beim Maus-Inokulationstest, nach 4 - 6 Wochen. Die rasche Diagnosestellung ist vor allem bei AIDS-Patienten von entscheidender Bedeutung. Bisher wurde die Gewebekultur erfolgreich zum Nachweis von Toxoplasmen aus dem Blut (17, 18) sowie bei frischinfizierten Schwangeren aus der Plazenta (6) und in einem Fall postmortem zur Isolierung von Toxoplasmen aus Blut und Leber (4) eingesetzt.

Dies zeigt, daß der Einsatz der Gewebekultur nicht nur von akademischem Interesse ist, sondern auch handfeste, praktische Bedeutung hat.

Zusammenfassung

In einer Übersicht wird auf die in den letzten 2½ Jahren bei der in vitro-Kultivierung von *Toxoplasma gondii* erzielten Forschungsergebnisse eingegangen sowie über die Möglichkeiten der Anwendung der in vitro-Kultur bei *Toxoplasma gondii* in Forschung und Praxis berichtet.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, Gewebekultur, in vitro-Kultur

Summary

Toxoplasma gondii in tissue culture — application in research and practice

The results of the past two and a half years' study on *Toxoplasma gondii* in tissue culture are presented and fields of application in research and practice are outlined.

Key words

Toxoplasma gondii, tissue culture, in vitro culture.

Literatur

1. ABBAS, A. M. A. (1967):
Comparative study of methods used for the isolation of *Toxoplasma gondii*.
Bull. WHO 36, 344 - 346.
2. ASPÖCK, H., FLAMM, H. (1984):
Die Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft.
Api bio Merieux-Monographien 1, Nürtingen, 10 - 26.
3. BUNDESGESUNDHEITSLATT (1967):
Empfehlungen für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktionen mittels Mikromethode.
Bundesgesundheitsbl. 20, 108 - 112.
4. CHANG, C. H., STULBERG, C., BOLLINGER, R. O., WALKER, R., BROUGH, A. J. (1972):
Isolation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture.
J. Pediatr. 81, 790 - 791.

5. DAHL, R. J., JOHNSON, A. M. (1983):
Purification of *Toxoplasma gondii* from host cells.
J. Clin. Path. 36, 602 - 604.
6. DEROUIN, F., MAZERON, M. C., GARIN, Y. J. F. (1986):
Toxoplasmose congénitale. Diagnostic rapide par mise en évidence de toxoplasmes dans le placenta par culture cellulaire.
Presse Méd. 15, 1684.
7. DEROUIN, F., MAZERON, M. C., GARIN, Y. J. F. (1987):
Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*.
J. Clin Microbiol. 25, 1597 - 1600.
8. DEMPSTER, R. P. (1984):
Toxoplasma gondii: Purification of zoites from peritoneal exudates by eight methods.
Exp. Parasitol. 57, 195 - 204.
9. GRIMMWOOD, B. G., HECHERY, K., STEVENS, R. W. (1979):
Toxoplasma gondii: Purification of trophozoites propagated in cell culture.
Exp. Parasitol. 48, 282 - 286.
10. HERMENTIN, K., ASPÖCK, H. (1987):
Higher yields and increased purity of in vitro grown *Toxoplasma gondii*.
Zbl. Bakt. Hyg. A 267, 272 - 276.
11. HERMENTIN, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987 a):
in vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* under defined, serum-free conditions.
J. Parasitol. 73 (im Druck).
12. HERMENTIN, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987 b):
Serodiagnosis of toxoplasmosis: Influence of host deriving proteins attached to trophozoites.
Trop. Med. Parasitol. 38, 255.
13. HERMENTIN, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987 c):
In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* under defined conditions.
Zbl. Bakt. Hyg. A 267, 285.
14. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., ASPÖCK, H. (1986):
Kriterien der Produktion von *Toxoplasma*-Antigen in der Gewebekultur.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 145 - 151.
15. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987):
Versuche zur Dauerkultivierung von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 9, 95 - 99.
16. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1987):
Toxoplasma gondii in tissue culture: Multiplication rates, degrees of purity, cost-benefit relation.
Zbl. Bakt. Hyg. A, 265, 528.
17. HOFFLIN, J. M., REMINGTON, S. (1985):
Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS.
Arch. Intern. Med. 145, 925 - 926.
18. SHEPP, D. H., HACKMANN, R. C., CONLEY, F. K., ANDERSON, L. B., MEYERS, J. D. (1985):
Toxoplasma gondii reactivation identified by detection of parasitemia in tissue culture.
Ann. Intern. Med. 103, 218 - 221.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. H. Aspöck
Hygiene-Institut der Universität Wien,
Abt. für Med. Parasitologie
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien
Austria

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): Hermentin Kurt, Auer Herbert, Aspöck Horst

Artikel/Article: [Toxoplasma gondii in der Gewebekultur Einsatz in Forschung und Praxis. 33-39](#)