

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 10 (1988) 235 - 243

Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene (Vorstand: Prof. Dr. W. Bommer)
der Universität Göttingen (1)
Abteilung Klinische Chemie (Vorstand: Prof. Dr. D. Seidel)
des Universitätsklinikums Göttingen (2)

Glukose-Verbrauch als Kriterium für die indirekte Parasitämiebestimmung in *Plasmodium falciparum*-Kulturen

A. Kuhlencord¹, K. H. Nolte², Claudia Huppach¹, W. Bommer¹

Einleitung

Das zeitaufwendige und mühsame Bestimmen der Parasitämie in *Plasmodium falciparum*-Kulturen durch Auszählen von nach GIEMSA gefärbten Kulturausstrichen führte uns auf die Suche nach geeigneten Alternativen. Aufgrund der Tatsache, daß parasitierte im Vergleich zu nicht parasitierten Erythrozyten eine bis zu hundertfach erhöhte Laktatbildung haben (10), sowie im Hinblick auf die Ergebnisse von COOMBS und GUTTERIDGE 1975 (1), die zeigen konnten, daß der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung zur Anzahl mit *Plasmodium vinckei chabaudi* infizierter Erythrozyten proportional ist, stellten wir uns die Frage, ob diese Eigenschaften auch für *Plasmodium falciparum*-Kulturen zutreffen, und ob die Ermittlung des Glukoseverbrauchs zur Berechnung der Parasitämie herangezogen werden kann. Untersuchungen zur Präzision und Reproduzierbarkeit beider Methoden, unter Berücksichtigung einer Arbeitserleichterung, wurden hierzu durchgeführt.

Material und Methoden

Kulturbedingungen

Für diese Untersuchungen verwendeten wir den *Plasmodium falciparum*-Stamm FCB (Falciparum Columbia Bogota), der uns von den Behringwerken in Marbach zur Verfügung gestellt worden war. Die Kultivierung wurde nach der von JENSEN und TRAGER (4) beschriebenen Kerzentopf-Methode durchgeführt, mit der Abänderung, daß dem Kulturmedium (RPMI 1640) 15% Humanserum zugesetzt wurde. Die Glukosekonzentration des Kulturmediums wurde vor Versuchsbeginn zweifach bestimmt. Die Versuche wurden in Kulturschälchen mit einem Durchmesser von 3,5 cm gestartet. In jedes Versuchsschälchen wurden 3 ml einer mit Parasiten beimpften, mehrfach synchronisierten (7) Erythrozytensuspension mit $0,50 \times 10^6$ Zellen/ μ l — entsprechend einem Hämatokrit von ca. 4% — gegeben. Kontrollansätze enthielten keine Parasiten. Alle 12 Stunden wurde das verbrauchte Kulturmedium erneuert und bis zur Messung von Glukose und Laktat bei -20° C eingefroren. Das Volumen des entnommenen Mediums wurde durch Wägen kontrolliert. Jeder Versuch wurde doppelt angesetzt und zweimal durchgeführt. Die Anzahl der Erythrozyten/ μ l wurde mit einem ELT 800 der Fa. Dr. Molter bestimmt.

Mikroskopische Auszählung

Die jeweilige Parasitämie ermittelten wir durch Auszählen der parasitierten Erythrozyten in nach GIEMSA gefärbten Ausstrichen. Pro Kulturschale wurden zwei Ausstriche angefertigt, in denen 20×1.000 Erythrozyten ausgezählt wurden. Zwei erfahrene Personen (A und C) zählten unabhängig voneinander jeden Ausstrich aus.

Biochemische Methode

Der Glukoseverbrauch wurde nach der optimierten Hexokinase-Methode (Reagenzien der Fa. Boehringer, Mannheim) mit dem Hitachi-705-Analysenautomaten, die Laktatbildung nach der Glutamat-Laktat-Dehydrogenase-Methode (Reagenzien der Fa. DuPont, Frankfurt) in einem DuPont-ACA-II-Analysenautomaten bestimmt. Zur Beurteilung der Meßgenauigkeit und der Reproduzierbarkeit wurden in zwei Vorversuchen zehn Kulturschälchen parallel angelegt und in allen der Glukoseverbrauch bestimmt.

Ergebnisse

Mikroskopische Auszählung

Die Ergebnisse der Bestimmung der Parasitämie durch Auszählen von nach GIEMSA gefärbten Blutausstrichen sind in der Abb. 1.1 - 1.3 an drei Beispielen graphisch dargestellt. Die Zählergebnisse waren normal verteilt. Die Mittelwerte, die die Personen A und C bestimmt hatten, variierten zwischen 3 und höchstens 11,8%. Die maximalen Abweichungen voneinander wurden bei Parasitämien unter 1% beobachtet. Dies entspricht dem systematischen Fehler, der in der Person begründet ist, der jedoch geringer ist als die zufälligen Abweichungen der ermittelten Parasitämien durch Auszählen von 10.000 Erythrozyten und somit vernachlässigt werden dürfte.

Der Variationskoeffizient wird mit zunehmender Parasitämie kleiner. Bei 1.000 ausgezählten Erythrozyten beträgt er 10 bis 30%, bei 5.000 Erythrozyten 5 bis 15%.

Biochemische Methoden

Die Vorversuche ergaben eine hohe Reproduzierbarkeit in der Versuchsdurchführung und eine große Meßgenauigkeit für den benötigten Bereich von 40 bis 180 mg% Glukose. Ein personenabhängiger Fehler kann beim Einsatz von Autoanalysen weitestgehend vermieden werden. Der aus Standardabweichung und Mittelwert ermittelte Variationskoeffizient betrug für diese Methode maximal 5% ($\bar{x} = 40 \text{ mg\%}$; $s = 1,94 \text{ mg\%}$).

Der Glukoseverbrauch der nicht parasitierten Erythrozyten blieb über den Beobachtungszeitraum nahezu konstant ($2,36 \mu\text{mol Glukose}/10^9 \text{ Erythrozyten}/12 \text{ Stunden}$). Wie in den Abb. 2.1 - 2.4 ersichtlich, stieg der Glukoseverbrauch durch parasitierte Erythrozyten proportional zur Anzahl der Parasiten pro Kulturschälchen an. Der Korrelationskoeffizient lag zwischen 0,91 und 0,99, wobei für p ein Wert kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) ermittelt werden konnte. Der Glukosebedarf erwies sich jedoch nicht als konstant über den 48-stündigen Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum* hin (Tab. 1). So wurde Glukose zum geringsten Teil zwischen 0 und 12 Stunden metabolisiert (Entwicklung von einer kleineren zur größeren zytoplasmareicheren Ringform). Der stärkste Glukoseverbrauch lag zwischen 24 und 36 Stunden nach Synchronisation (Entwicklung zum reifen Schizonten). Wie auch in der Abb. 2.3 deutlich zu erkennen, ist der Verlauf dieser Kurve am steilsten im Vergleich zu den drei anderen.

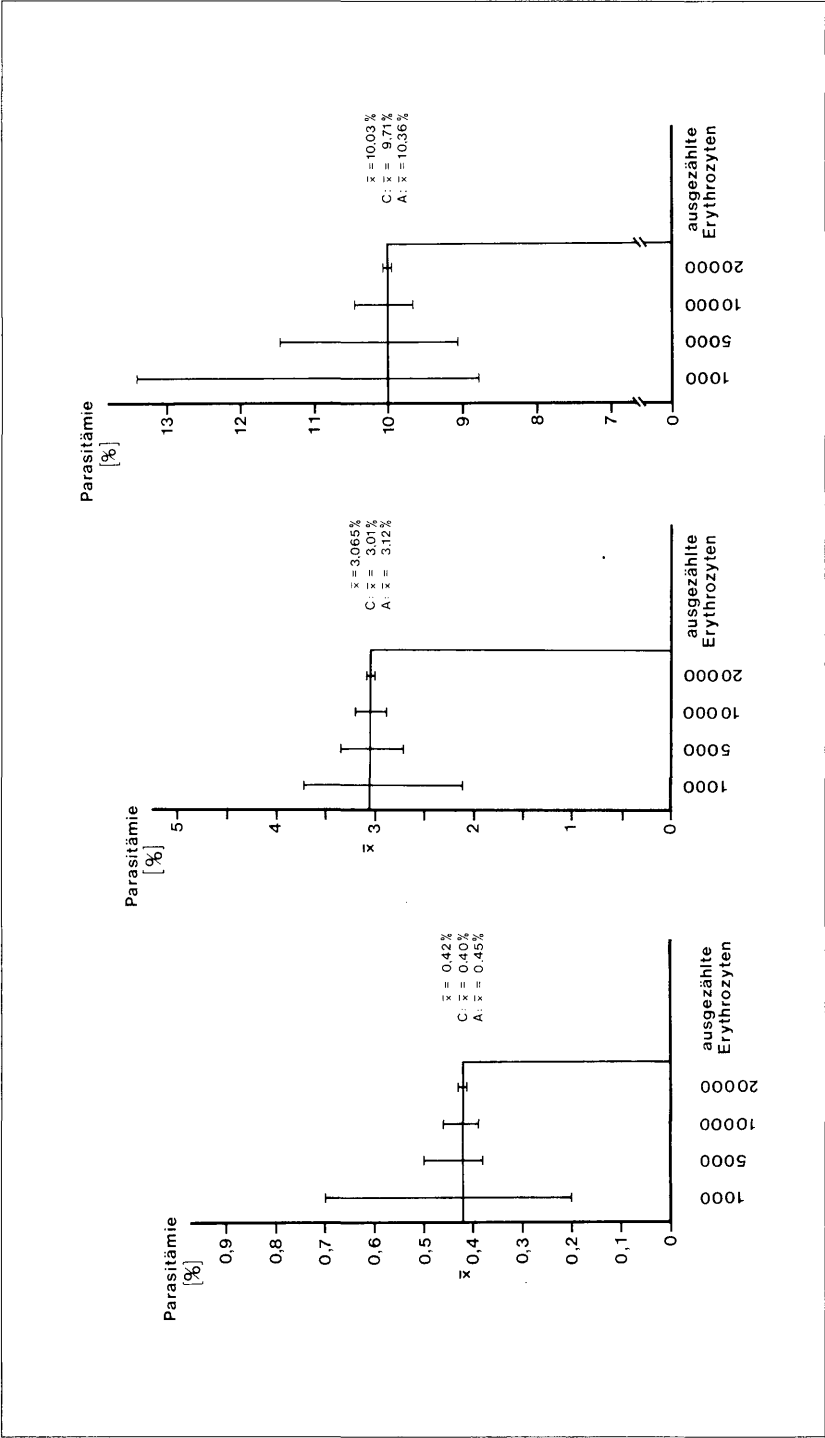


Abb. 1.1 - 1.3: Bestimmung der Parasitämie durch Auszählen von nach GiEMSA gefärbten Ausstrichen. Die Stäbe geben die Spannweite an.

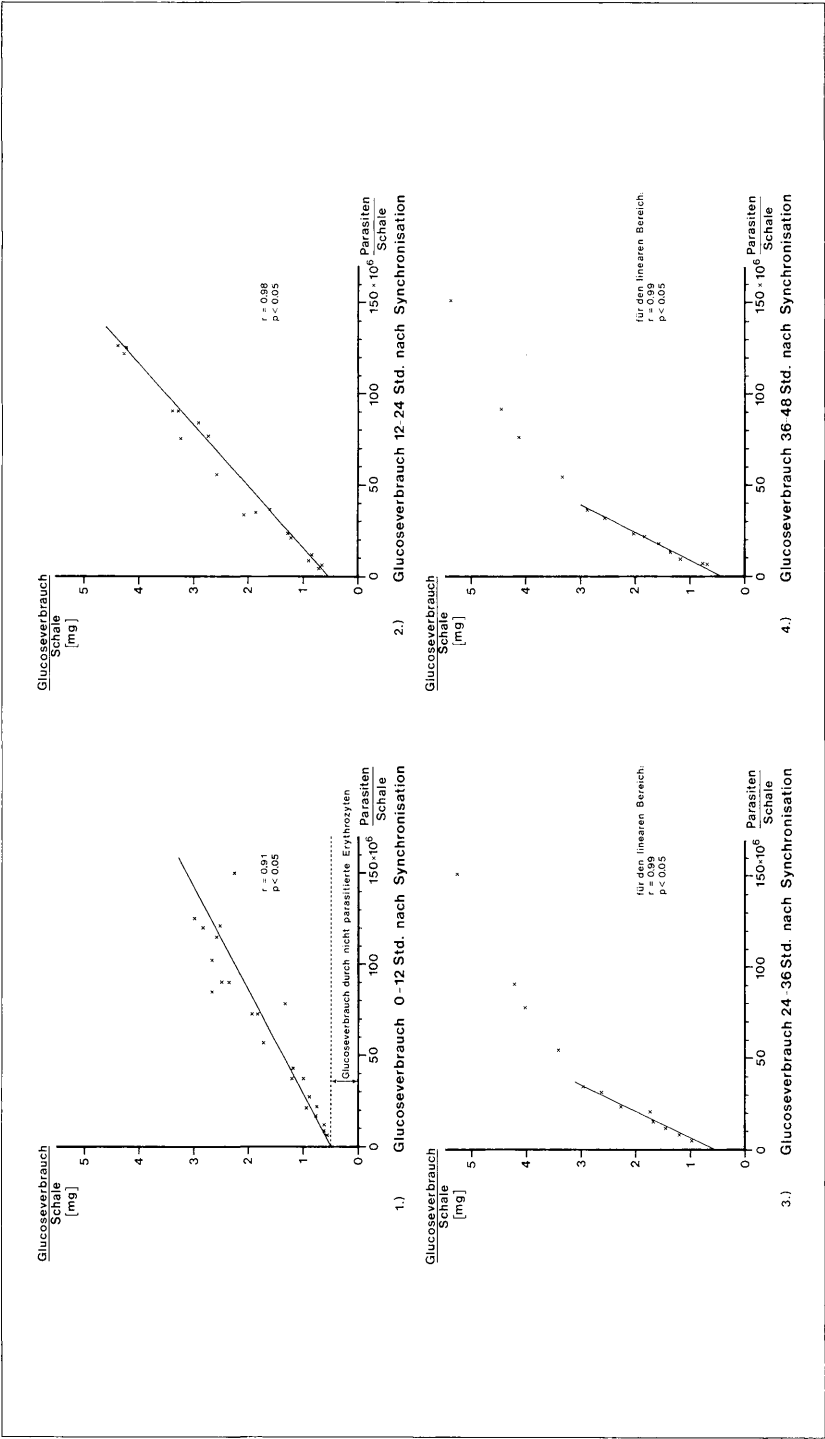


Abb. 2.1 - 2.4:
Glucoseverbrauch in verschiedenen parasitären Entwicklungsstadien: 1. = 0 - 12 Std. • 2. = 12 - 24 Std. • 3. = 24 - 36 Std. • 4. = 36 - 48 Std.

TABELLE 1
Glukoseverbrauch durch *Plasmodium falciparum*
(in mmol Glukose/Parasit/12 Std.)

JENSEN, M. et al., 1983 (5):	asynchrone Kultur:	75×10^{-12}
ZOLG, J. W. et al., 1984 (10):	synchrone Kultur: 0 - 12 Std.:	120×10^{-12}
Eigene Ergebnisse, 1987:	synchrone Kultur: 0 - 12 Std.:	97×10^{-12}
	12 - 24 Std.:	185×10^{-12}
	24 - 36 Std.:	392×10^{-12}
	36 - 48 Std.:	363×10^{-12}

Sieht man sich diese und die Abb. 2.4 an, fällt auf, daß der proportionale, quasi lineare Bereich nur bis zu einer Parasitämie von ca. 4% reicht. Das entspricht 40×10^6 parasitierten Erythrozyten/Kulturschälchen. Danach nähert sich die Kurve einer e-Funktion entsprechend asymptotisch dem maximalen Glukoseverbrauch (ca. 5,2 mg Glukose/Kulturschälchen). Diese Ergebnisse waren auch für einen zweiten und dritten Entwicklungszyklus mit oder ohne zwischenzeitliche Synchronisation reproduzierbar (Abb. 3). Der größte Teil (74,9%) der aufgenommenen Glukose wurde zu Laktat metabolisiert. Dieses trifft sowohl für die parasitierten als auch für die nicht parasitierten Erythrozyten zu (Tab. 2).

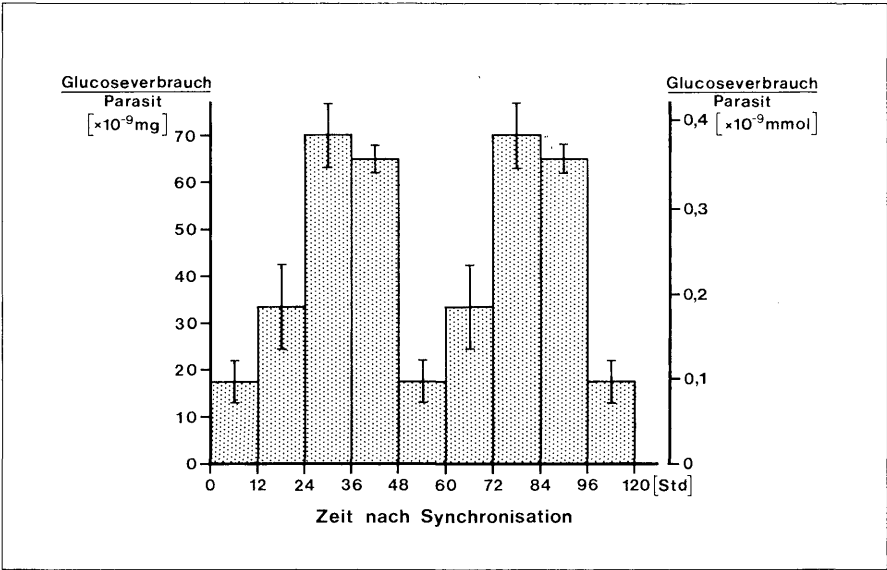


Abb. 3:
Glukoseverbrauch in Abhängigkeit vom Entwicklungszyklus

TABELLE 2
Glukosemetabolisierung zu Laktat
(in $\mu\text{mol}/10^9 \text{ Ery's}/12 \text{ Std.}$)

	Glukose- verbrauch	Laktat- bildung	in Prozent
Für uninfizierte Erythrozyten:			
COOMBS, G. H. et al., 1975 (1):	—	—	85,0%
SHAKESPEARE, P. G. et al., 1973 (8):	—	2,16 - 2,68	—
ZOLG, J. W. et al., 1984 (10):	2,48	3,72	75,0%
Eigene Ergebnisse, 1987:	2,36	3,67	77,7%
Für parasitierte Erythrozyten:			
COOMBS, G. H. et al., 1975 (1):	—	—	85,0%
ZOLG, J. W. et al., 1984 (10):	120	145	60,4%
Eigene Ergebnisse, 1987:	97	145,4	74,9%

Der Anteil der Umwandlung zu Laktat ist unabhängig von der Parasitämie und vom Entwicklungsstadium der Parasiten (Abb. 4).

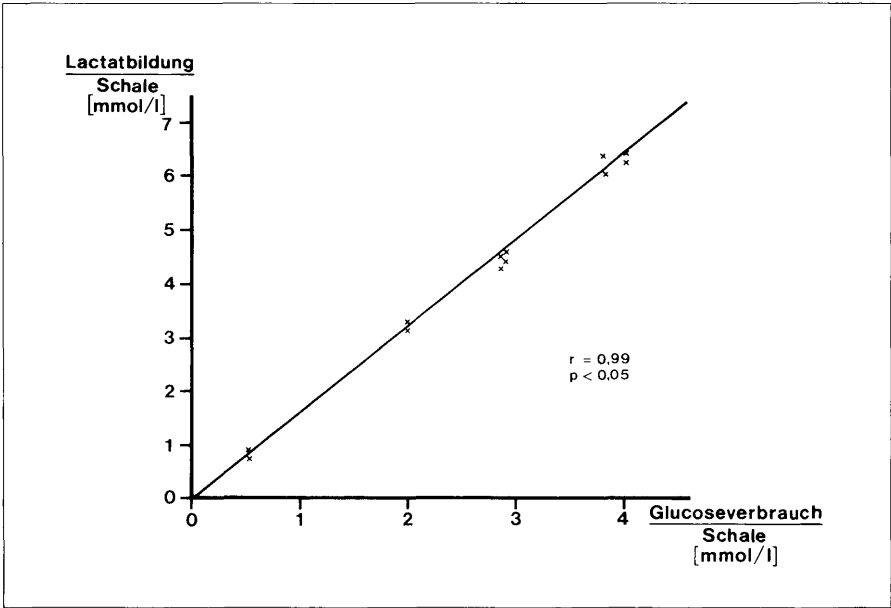


Abb. 4:
Glukosemetabolisierung zu Laktat

Diskussion

Der Glukoseverbrauch durch *Plasmodium falciparum* erwies sich als signifikant proportional zur Anzahl der Parasiten. Die ermittelten Werte entsprechen den in der Literatur zitierten Werten (Tab. 1). Deutlich zeigte sich jedoch eine Abhängigkeit der Glukosemetabolisierung vom Entwicklungsstadium der Parasiten. Der stoffwechselaktivste Entwicklungsschritt — die Entwicklung zum reifen Schizonten 24 bis 36 Stunden nach Synchronisation — entspricht dem stärksten Glukoseverbrauch zwischen den Mediumwechseln. Diese Ergebnisse spiegeln auch die Resultate von GRITZMACHER und REESE (2) wider, welche die Stoffwechselaktivität anhand der Protein- und Nukleinsäure-Synthese mittels Aufnahme von L- (^{35}S) Methionin und 2,8,5'- (^3H) Adenosin untersuchten. Der Vorteil bei der Bestimmung des Glukoseverbrauches liegt im Verzicht auf radioaktive Substanzen. Die Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Parasiten macht es aber erforderlich, daß man nicht allein vom ermittelten Glukoseverbrauch auf die Parasitämie schließen kann, sondern daß man immer noch einen Ausstrich von der Kultur benötigt, um zu wissen, welchen Glukoseverbrauch pro Parasit man für die Errechnung der Parasitämie zugrunde legen muß. Der Zeitaufwand ist trotzdem viel geringer als die Ermittlung der Parasitämie durch das Auszählen von nach GIEMSA gefärbten Blutausstrichen. Sollen pro Kulturschälchen im Ausstrich 1.000 Erythrozyten zur Ermittlung der Parasitämie ausgezählt werden, sind in Abhängigkeit von Parasitämie und Qualität des Ausstriches 8 bis 10 min. erforderlich. Demgegenüber sind im Analysenautomaten 180 Einzelbestimmungen pro Stunde möglich. Das bedeutet, daß in bis zu 180 Kulturschälchen die Parasitämie in kürzester Zeit ermittelt werden kann.

Die obere Grenze des Meßbereiches ergibt sich aus der Abb. 2.3 und 2.4, die sich aus dem linearen Bereich der Kurve ergibt. Vermutlich ist der bei höheren Parasitämien verminderte Metabolismus auf einen Abfall des pH-Wertes und/oder die Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten zurückzuführen. Auch ein Anstieg der Laktatkonzentration könnte zu einer Hemmung der Parasitenentwicklung führen. Wie JENSEN und Mitarbeiter (5) zeigen konnten, führt die alleinige Zugabe von Laktat bei Ausgleich des pH-Wertes zu einer Hemmung des Parasitenwachstums. Diese Ergebnisse erfordern eine besondere Beachtung: Um eine ungehinderte Parasitenentwicklung zu erzielen, wie es in vergleichbaren Studien erforderlich ist, dürfte entweder bei 12-stündigem Mediumwechsel die Parasitämie nicht über 4% ansteigen, oder es müßte der Mediumwechsel in kürzeren Intervallen (z. B. alle 6 Std.) durchgeführt werden. Die untere Grenze des Meßbereiches ergibt sich aus der Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Standardabweichung für die Glukosebestimmung. Geht man davon aus, daß ein Wert x_i erst dann von einem Wert x_o statistisch abweicht, wenn er sich um mehr als 2 Standardabweichungen vom Wert x_o unterscheidet, so muß der Wert x_i um mehr als 3,88 mg% (0,2 mmol/l) Glukose vom Ausgangswert x_o abweichen. Dieses entspricht einer Parasitämie von ca. 0,6% für die ersten 12 Stunden nach Synchronisation bzw. durch den erhöhten Glukosebedarf 24 bis 36 Stunden nach Synchronisation von ca. 0,15% für die oben angegebenen standardisierten Kulturbedingungen.

Diese Werte sind auch maßgebend für die Präzision, die somit bei Parasitämien unter einem Prozent im Bereich der Parasitämiebestimmung durch Auszählen von 1.000 Erythrozyten liegt, sich jedoch linear der Präzision durch Auszählen von 1.000 Erythrozyten bei Parasitämien über 10% nähert.

Eine Alternative zur Ermittlung der Parasitämie mittels Glukoseverbrauch ist die Laktatbildung. Wie aus Abb. 4 ersichtlich, wird der größte Teil der Glukose zu Laktat

metabolisiert. Die Umwandlungsrate zu Laktat betrug 74,9%. Diese Ergebnisse entsprechen anderen Literaturangaben (Tab. 2). Weitere Untersuchungen über die Metabolisierung der verbleibenden 25,1% Glukose müssen noch durchgeführt werden. Die Freisetzung von Pyruvat aus den Erythrozyten (6), die Existenz eines Pentose-Phosphat-Weges bzw. die Bildung von Azetat und anderen flüchtigen Substanzen sind noch nicht vollständig geklärt (3, 9).

Zusammenfassung

Die Parasitämie in *Plasmodium-falciparum*-Kulturen wurde durch Bestimmung des Glukoseverbrauchs ermittelt. Es zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl der Parasiten und der metabolisierten Glukose. Zu berücksichtigen ist, daß der Glukosebedarf pro Parasit abhängig vom Entwicklungsstadium ist. Der größte Teil (74,9%) der aufgenommenen Glukose wurde zu Laktat metabolisiert. Die Umwandlung zu Laktat erwies sich als unabhängig vom Entwicklungsstadium.

Schlüsselwörter

Malaria, *Plasmodium falciparum*, In vitro-Kultur, Glukoseverbrauch, Laktatbildung.

Summary

Glucose consumption as a criterion for indirect measure of parasitemia in *Plasmodium falciparum* cultures

The parasitaemia in *Plasmodium falciparum* cultures was calculated by means of measuring the glucose consumption. A linear correlation between the number of parasites and the metabolized glucose was observed. It has to be noticed that the glucose consumption depends on the stage of development of the parasite. The main part of the glucose (74,9%) is transformed into lactate.

Key words

Malaria, *Plasmodium falciparum*, In vitro culture, carbohydrate metabolism.

Literatur

1. COOMBS, G. H., GUTTERIDGE, W. E. (1975):
Growth in vitro and metabolism of *Plasmodium vinckei chabaudi*.
J. Protozool. 22, 555 - 560.
2. GRITZMACHER, C. A., REESE, R. T. (1984):
Protein and nucleic acid synthesis during synchronized growth of *Plasmodium falciparum*.
J. Bacteriology 160, 1165 - 1167.
3. HOMEWOOD, C. A., NEAME, K. D.:
Biochemistry of material parasites, in: KREIER, J. P. (Hrsg.): Malaria.
Vol. 1, 345 - 405, Academic Press, New York, 1980.
4. JENSEN, J. B., TRAGER, W. (1977):
Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method.
J. Parasitol. 63, 883 - 886.
5. JENSEN, M., CONLEY, M., HELSTOWSKI, L. D. (1983):
Culture of *Plasmodium falciparum*: the role of pH, glucose, and lactate.
J. Parasitol. 69, 1060 - 1067.

6. JUNGERMANN, K., MÖHLER, H.:
Biochemie.
1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1980.
7. LAMBROS, C., VANDERBERG, J. P. (1979):
Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture.
J. Parasitol. 65, 418 - 420.
8. SHAKESPEARE, P. G, TRIGG, P. I. (1973):
Glucose catabolism by the simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*.
Nature 241, 538 - 540.
9. SHERMAN, I. W.:
Metabolism, in: PETERS W., RICHARDS, W. H. G.: Antimalarial drugs I, Handbook of experimental pharmacology.
Vol. 68, 31 - 81, Springer-Verlag, Berlin, 1984.
10. ZOLG, J. W., MACLEOD, A. J., SCAIFE, J. G., BEAUDOUIN, R. (1984):
The accumulation of lactic acid and its influence on the growth of *Plasmodium falciparum* in synchronized cultures.
In Vitro 20, 205 - 215.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. med. A. Kuhlencord
Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene
Windausweg 2
D-3400 Göttingen
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): Kuhlencord A., Nolte Karl-Heinz, Huppach Claudia, Bommer Wolfgang

Artikel/Article: [Glukose-Verbrauch als Kriterium für die indirekte Parasitämiebestimmung in Plasmodium falciparum-Kulturen. 235-243](#)