

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 5 (1983) 17—20

Aus der Abteilung für Immundiagnostik (Leiter: Univ. Prof. Dr. G.A. Maekelt) des Tropeninstituts der Medizinischen Fakultät der Zentraluniversität von Venezuela (Vorstand: Univ. Prof. Dr. F. Pifano)

# Massenkultur von *Trypanosoma Cruzi* in partikel-freien, monophasischen, flüssigen Kulturmedien mittels Fermentertechnik

G. A. Maekelt

## Einleitung

Vor zwanzig Jahren, als die Landbevölkerung in Venezuela noch 40% der Gesamtbevölkerung betrug, wurde die Prävalenz der *T. cruzi*-Antikörperträger auf etwa 800.000 geschätzt. Auf Grund von klinischen epidemiologischen Felduntersuchungen dürfte die Zahl der wirklich Chagaskranken (elektrokardiographische Veränderungen) damals nicht unter 160.000 gelegen haben.

In den letzten zwanzig Jahren haben sich die epidemiologischen Fakten in Venezuela grundlegend geändert. Bei einer Gesamtbevölkerung von über 14 Millionen, einer der höchsten Geburtenraten der Welt und einer zunehmenden Landflucht, hat sich die Landbevölkerung auf unter 20% vermindert. Seit nun 30-jähriger systematischer und erfolgreicher Anwendung von Insektiziden mit residueller Wirkung auf domiziliäre Triatomen, ist die Chagaskrankheit unter der Landbevölkerung im Alter unter 30 Jahren praktisch unbekannt geworden.

Bis heute bilden serologische Untersuchungen die Grundlage jeder Studie über diese Tropenkrankheit. Für Venezuela ist das Tropeninstitut in Caracas das Zentrum der Serodiagnostik der Chagaskrankheit. Komplementbindungs- und indirekte Hämagglutinationsreaktionen sind im Lande die wichtigsten Stützen dieser Diagnostik. Besondere Bedeutung erlangte für uns die Antigenherstellung für diese Reaktionen. Voraussetzung für die Herstellung von Antigenen hoher Sensibilität und Spezifität ist es, reines Rohmaterial in genügender Menge zu erhalten. Dies wird erleichtert durch die Anwendung der Massenkultur von *T. cruzi* "in vitro" in flüssigen, partikelfreien, makromolekulären Medien. Die Fermentertechnik liefert uns hierfür die besten Möglichkeiten, reproduktive Ausbeute zu erhalten.

## Methoden

Von 1970—1977 wurde von uns ein modifiziertes, thermostabiles, hitzesterilisiertes, monophasisches, durch Filtrieren partikelfrei gemachtes, flüssiges Kulturmedium nach WARREN verwendet. Zur Fermentertechnik wurde ein Fünf-Liter-Glasgefäß, NEW BRUNSWICK, Modell MIKROFERM, mit konstanter Temperaturkontrolle (28°C), rotativer Agitation (300 rpm/min) und steriler Bodenbelüftung (125 ml/min) gewählt. Die Proben wurden zuerst manuell, später vollautomatisch mit leichtem Überdruck steril entnommen. Die Trypanosomenzählungen wurden elektronisch mittels des Prinzips von COULTER (Modell ZB-I) durchgeführt. Die Beimpfungen erfolgten durch Suspensionen von 25 ml (etwa  $5\,000 \times 10^6/\text{ml}$ ) gewaschener Epimastigoten von *T. cruzi*, ausgehend von einem biphasischen Hirn-Herz-Blut-Agarmedium. Nach Beendigung der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Trypanosomen in der SORVELL-Durchfluß-zentrifuge konzentriert und mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen.

Anschließend wurde das Feuchtgewicht, und nach Gefriertrocknung, das Trockengewicht bestimmt.

Nach 1977 entwickelten wir verschiedene thermolabile, monophasische, flüssige, durch Filtration (0,22  $\mu$  Milliporefilter) sterilisierte, partikelfreie, makromolekuläre Kulturmedien. Die Grundlage bildete jeweils eine Infusion von Herz und Hirn (DIFCO), zu der in steriler Form entweder menschliches Zitrat-Blutlysate, steriles menschliches Zitrat-Blutplasma und Hämin oder menschliches Zitrat-Blutplasma und Hämoglobininlösung hinzugefügt wurden. Die Kulturbedingungen sowie die elektronischen Zellzählungen, die Technik der Trypanosomenzählung, sowie die Gewichtsbestimmungen wurden unverändert beibehalten.

### Ergebnisse

Die Durchschnittswerte der Ergebnisse von 17 Experimenten mit dem hitzebeständigen Kulturmedium, modifiziert nach WARREN, waren folgende: Die Initialzählung betrug  $8,1 \times 10^6$  Trypanosomen/ml. Nach 177 Stunden (7,3 Tage) wurden Maximalwerte von  $51,7 \times 10^6$  Trypanosomen/ml gezählt. Das entsprach 6,5-facher Trypanosomenvermehrung oder 2,6 Teilungen der Trypanosomenpopulation. Die Generationszeiten betragen im Durchschnitt 68,1 Stunden (während der logarithmischen Vermehrungsphase: 58,9 Stunden). Die Ausbeute betrug 2,84 Feuchtgewicht/l (Tabelle Nr. 1).

Mit den drei neuentwickelten thermolabilen Kulturmedien betrug die durchschnittliche Initialzählung  $2,7 \times 10^6$  Trypanosomen/ml. Nach 198 Stunden (8,2 Tage) wurden Maximalwerte von  $153,5 \times 10^6$  Trypanosomen/ml erhalten. Das entspricht einem dreifach höheren Maximalwert im Vergleich zur Kultur im thermostabilen Medium. Die Trypanosomen vermehrten sich um einen Faktor von 59,1 (9 mal höher als im modifizierten WARREN-Medium). Dies entsprach im Durchschnitt 5,8 geometrischen Teilungen (2,2 mal mehr als im modifizierten WARREN-Medium). Die durchschnittliche Generationszeit betrug 34,1 Stunden (2 mal kürzer als im modifizierten WARREN-Medium).

Als durchschnittliche Generationszeit (Verdopplungszeit) während der logarithmischen Vermehrungsphase wurde eine Zeit von 20,4 Stunden berechnet (2,9 mal kürzer als im WARREN-Medium). Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 5,6 g Feuchtgewicht/l (2,0 mal höhere Ausbeute als im modifizierten WARREN-Medium). Es wurde ein Durchschnittstrockengewicht von 0,99 g/l bestimmt (17,67% des Feuchtgewichtes) (Tabelle Nr. 2).

### Diskussion

Zum Erhalt größerer Mengen Rohmaterial von *T. cruzi* zur Antigenherstellung wurden sehr verschiedene Techniken der Massenkultur angewandt. Die meisten Laboratorien, auch kommerzielle, verwenden bis heute noch biphasische fest-flüssige Blutagarmedien in relativ kleinen Kulturgefäßen. Wir benutzten hierzu jahrelang Roux-Flaschen von 1 Liter Inhalt. Die Entwicklung von flüssigen, partikelfreien Medien bedeutete einen wesentlichen Fortschritt, nicht nur zur schnelleren und genaueren elektronischen Bestimmung von Zellzahl oder zur Trübungsmessung, sondern auch zur Ernte reinen Rohmaterials der Parasiten ohne Verunreinigung mit Bestandteilen des Mediums.

Die Massenkultur von *T. cruzi* in flüssigen Medien mittels Fermentertechnik brachte zudem die Vorteile der Standardisierung von Agitation, Temperaturkontrolle und Belüftung, sowie die der automatischen Probenentnahme. Die hierbei zur Anwendung kommenden eiweißreichen und zuckerhaltigen Nährmedien sind bei größerem Volumen außerordentlich anfällig für bakterielle oder mykotische Kontamination. Dies war der

Grund, weshalb wir über Jahre ein leicht herstellbares, hitzesterilisiertes, modifiziertes Medium nach WARREN benutzten. Die Ausbeute mit diesem Medium war jedoch nicht optimal. So entwickelten wir in den letzten Jahren drei verschiedene vergleichbare thermolabile, makromolekuläre Medien ähnlicher Zusammensetzung, bei denen Blutlysat, Hämoglobininlösung und/oder Blutplasma und Hämin filtersterilisiert zugegeben wurden. Erwartungsgemäß wurden mit diesen Medien wesentlich bessere Ausbeuten von Trypanosomenrohmaterial, wesentlich steilere Wachstumskurven und relativ kurze Verdopplungszeiten erreicht.

### **Zusammenfassung**

Drei neuentwickelte, chemisch nicht definierte, makromolekuläre, flüssige, partikel-freie, filtersterilisierte Kulturmedien wurden bei Anwendung der Fermentertechnik unter konstanten Bedingungen von Belüftung, Agitation und Temperaturregulierung für die Massenkultur von *T. cruzi* verwendet und mit einem thermostabilen, flüssigen Medium ähnlicher Zusammensetzung verglichen. Es wurden im Durchschnitt dreifach höhere maximale Wachstumswerte, 2,2 mal mehr geometrische Teilungen und 2,9 mal kürzere Generationszeiten erhalten. Die Ausbeute erreichte 5,6 g/l Feucht- und 1,0 g/l Trockengewicht von reinem Trypanosomenmaterial.

### **Summary**

Recently, for mass cultivation of *T. cruzi*, we developed three new liquid media, using a fermenter technique with fixed conditions of aeration, agitation and temperature control. These media were free of particles, filter-sterilized, macromolecular and chemically undefined. Comparing our media with a heat-stable liquid medium of similar composition, we obtained on an average, with our media, three times higher electronic trypanosome counts, 2.2 more geometric divisions and 2.9 times shorter generation times. The yield, consisting of raw material of pure trypanosomes, reached 5.6 g/l wet weight and 1.0 g/l dry weight.

### **Danksagung**

Wir möchten hiermit herzlichen Dank für die wertvolle technische Hilfe von Lic. Biol. Frl. Maria Saldivia aussprechen.

Die vorliegende Arbeit wurde ermöglicht durch die finanzielle Unterstützung von CONICIT (Nationaler Rat für wissenschaftliche und technologische Forschung, Forschungsprojekt N 0 S1-108).

### **Literatur**

MAEKELT, G.A. (1981): El cultivo "in vitro" de *Trypanosoma cruzi*. Monographie (Offset-kopiert). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto de Medicina Tropical: 333 Seiten, 61 Tabellen, 22 Abbildungen, 139 Literaturhinweise.

### **ANSCHRIFT DES AUTORS:**

Univ. Prof. Dr. G. A. Maekelt  
Instituto de Medicina Tropical  
Facultad de Medicina  
Universidad Central de Venezuela  
Caracas / Venezuela  
Apartado de Correos 2109

TABELLE 1

**Wachstum von T.cruzi (\*) in vier verschiedenen flüssigen Massenkulturmedien**  
(New Brunswick-"Mikroferm"-Fermenter: 5 Liter)

Kulturmedien	Wachstumsphase (**)	Inkubation (Stunden)	Trypanosomenzählung (x 10 <sup>6</sup> /ml)		Vermehrungsfaktor (x)	Anzahl geometrischer Teilungen (x)	Generationszeiten (Stunden)	Ausbeute gramm/liter	
			initial	maximal				feucht	trocken
ICC-SCF	tot	177	8,1	51,7	6,5	2,6	68,1	2,8	?
	log	141	8,8	50,8	5,7	2,4	58,9	—	—
ICC-SL	tot	236	2,1	161,3	76,8	6,2	37,6	5,5	1,09
	log	138	2,1	98,6	44,9	5,4	25,1	—	—
ICC-P.H	tot	166	2,6	171,8	65,3	6,1	27,5	5,2	0,85
	log	111	4,2	131,5	30,1	4,9	22,4	—	—
ICC-P.Hb	tot	192	3,6	127,6	35,1	5,1	37,4	6,1	1,03
	log	41	5,7	44,0	7,6	2,9	13,9	—	—

ICC-SCF = Thermoresistentes Kulturmedium nach WARREN, modifiziert (Infusion von Hirn und Herz mit Zitratblut, aufgekocht, filtriert, hitzesterilisiert).

ICC-SL = Thermolabiles, filtersterilisiertes Kulturmedium (Infusion von Hirn und Herz mit lysiertem Gesamtzitratblut).

ICC-P.H = Thermolabiles, filtersterilisiertes Kulturmedium (Infusion von Hirn und Herz mit Blutplasma und Hämin).

ICC-P.Hb = Thermolabiles, filtersterilisiertes Kulturmedium (Infusion von Hirn und Herz mit Blutplasma und Hämoglobinlösung).

(\*) = Stamm "Petra Mendoza", isoliert 1955 aus dem Blut eines Chagaskranken (akute Form).

(\*\*) = tot: Gesamtwachstumsphase, log: logarithmische Wachstumsphase.

TABELLE 2

**Vergleichsstudie über das Wachstum von T.cruzi (\*) in vier verschiedenen flüssigen Massenkulturmedien** (New Brunswick-"Mikroferm"-Fermenter: 5 Liter)

Kulturmedien	Wachstumsphase (**)	Inkubation (Stunden)	Trypanosomenzählung (x 10 <sup>6</sup> /ml)		Vermehrungsfaktor (x)	Anzahl geometrischer Teilungen (x)	Generationszeiten (Stunden)	Ausbeute gramm/liter	
			initial	maximal				feucht	trocken
ICC-SCF	tot	177,0	8,1	51,7	6,5	2,6	68,1	2,8	?
X(17x)(▲)	log	141,0	8,8	50,8	5,7	2,4	58,9	—	—
ICC-SL	tot	198,0	2,7	153,5	59,1	5,8	34,1	5,6	0,99
ICC-P.H ICC-P.Hb X(3x)(●)	log	96,6	4,0	91,3	27,5	5,1	20,4	—	—

(▲) = Thermostabiles Medium (ICC-SCF) nach WARREN, modifiziert (Durchschnittswerte von 17 Experimenten des gleichen Mediums).

(●) = Thermolabile Medien (ICC-SL, ICC-P.H, ICC-P.Hb) (Durchschnittswerte von drei verschiedenen Medien).

(\*) = Stamm "Petra Mendoza", isoliert 1955 aus dem Blut eines Chagaskranken (akute Form).

(\*\*) = tot: Gesamtwachstumsphase, log: logarithmische Wachstumsphase.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://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: 1983

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Maekelt G. A.

Artikel/Article: [Massenkultur von Trypanosoma Cruzi in partikelfreien, monophasischen, flüssigen Kulturmedien mittels Fermentertechnik. 17-20](#)