

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 99–103

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

In vitro-Haltung von *Protoscolices* von *Echinococcus multilocularis*

H. Auer, K. Hermentin, H. Aspöck

Einleitung

Bereits Ende des letzten und zu Beginn dieses Jahrhunderts wurden Versuche unternommen, Finnen von *Echinococcus* spp. zu kultivieren. DÉVÉ (1926) und COUTELEN (1927 a, b) waren die ersten, denen eine mehrwöchige in vitro-Haltung von *Echinococcus granulosus*-Zysten in mit Pferde- bzw. Rinderserum angereicherter Hydatidenflüssigkeit gelang. 30 Jahre später wurde erstmals über die erfolgreiche Kultivierung von *Echinococcus multilocularis* (Em) durch RAUSCH und JENTOFT (1957) berichtet. Den Autoren glückte die Produktion von *Protoscolices* (PS) aus undifferenziertem Keimschichtgewebe in einer mit Aszites und Antibiotica versetzten Hanks'schen Salzlösung nach 55 Tagen Kultur. SMYTH (1962), YAMASHITA et al. (1962) und WEBSTER und CAMERON (1963) testeten eine große Zahl von verschiedenen Kulturmedien und beschäftigten sich hauptsächlich mit der Sekundär-Vesikulation intakter *Scolices* von *Echinococcus granulosus* (Eg) und Em unter in vitro-Bedingungen. Schließlich gelang es SMYTH (1967) und SMYTH und DAVIES (1975), aus evaginierten PS von Em bzw. Eg adulte Bandwürmer zu züchten.

In unseren Versuchen ging es nicht darum, evaginierte PS von Em zur Weiterentwicklung zu bringen, vielmehr versuchten wir sie in serumarmen bzw. -freien Medien für einige Tage am Leben zu erhalten. Die dabei anfallenden, an Em-Stoffwechselprodukten reichen Kulturüberstände sollten uns als Antigenquelle für immunologisch-serologische Studien dienen. Über das technische *Procedere* unseres Em-in-vitro-Modells soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methoden (Abb. 1)

– In vivo-Haltung von Em

Metazestoden von Em (Stamm S 81) werden in unserem Laboratorium seit vielen Jahren in der Bauchhöhle von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) durch experimentelle ip-Infektion einer PS-Suspension gehalten.

– Isolierung der PS

Das Metazestoden-Material (MM) von einer ca. 3 Monate zuvor infizierten Wüstenrennmaus wurde unter aseptischen Bedingungen aus der Bauchhöhle entfernt. Nach sorgfältiger Zerkleinerung mit Skalpell und Schere wurde das MM mehrmals in vorgewärmter Hanks'scher Salzlösung (HBSS), versetzt mit 1% Antibiotica und Antimykotica, gewaschen; schließlich wurde das MM durch feinmaschige Metallsiebe (Porengröße: 180 µm, 230 µm) gedrückt. Nach zahlreichen weiteren Waschvorgängen in HBSS konnte eine von Zell- und Gewebsdetritus befreite, reine PS/HBSS-Suspension erhalten werden.

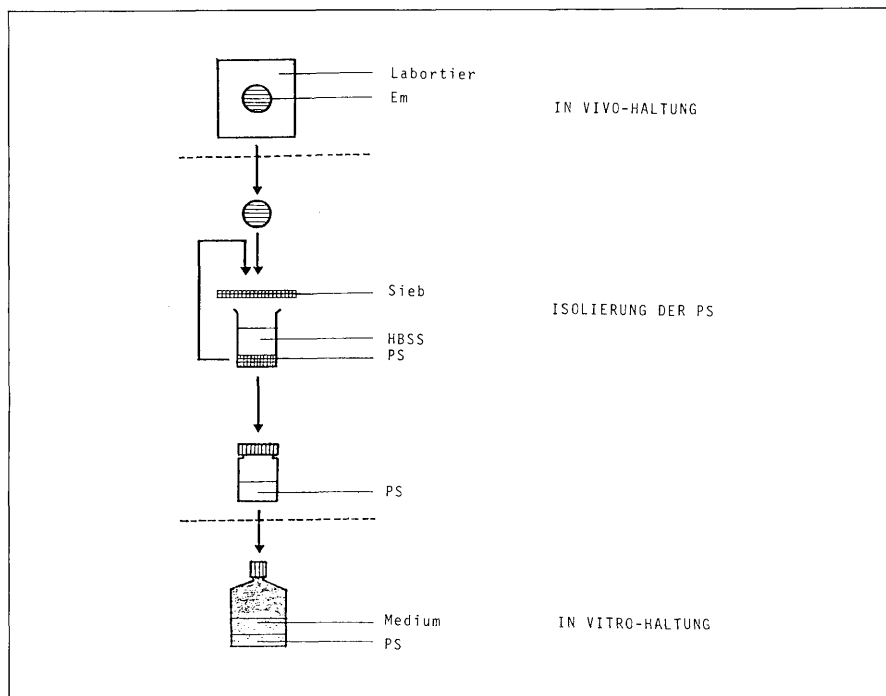


Abb. 1: In vitro-Haltung von Protoscolices (PS) von *Echinococcus multilocularis*: Technische Durchführung; HBSS: Hanks balanced salt solution

Vor der Transferierung in die Kulturf Flaschen wurden die PS auf ihre Vitalität (Bewegungsaktivität, Flimmerzell-Aktivität) mikroskopisch untersucht.

– In vitro-Haltung der PS

Je ca. 25.000 PS wurden mittels einer Pipette in 8 je 10 ml Nährmedium enthaltende 25 cm² Gewebekulturf Flaschen (Costar®, USA) transferiert; 4 verschiedene Nährlösungen wurden – jeweils in 2 Ansätzen – verwendet: MEM, MEM + 0,5% FCS, RPMI 1640, RPMI 1640 + 0,5% FCS; alle Nährlösungen enthielten 1% Antibiotica/Antimykotika (alle Medien und Reagenzien: Flow Lab. und Gibco, UK).

Die Kulturf Flaschen (Gasphase: 100% Luft) wurden aufrecht in einem Brutschrank bei 37° C gelagert und mehrmals pro Tag geschüttelt. Alle 48 Stunden wurden die Nährlösungen gewechselt und die Vitalität der PS überprüft. Der Anteil vitaler PS wurde nach Auszählen von 3 mal 100 PS (pro Flasche) in % angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Der Großteil (über 90%) der aus dem Metazestodengewebe isolierten PS evaginierte bereits während der Isolierungs- und Reinigungsphase in der HBSS; dies dürfte in ursächlichem Zusammenhang mit den wechselnden mechanischen (Druck), thermischen (hohe Temperaturen in der Sterilbank) und chemischen (pH-Änderungen) Bedingungen während dieser Präparationsphase stehen.

Nach der Transferierung in die mit verschiedenen Medien versehenen Kulturfラスchen zeigten die evaginierten *Scolices* hohe Bewegungsaktivität. In den beiden mit 0,5% FCS angereicherten Medien MEM und RPMI 1640 blieb die hohe Motilität der PS etwa 3 Wochen erhalten (Abb. 2); bis zum 27. Tag der *in vitro*-Haltung konnten noch in mehr als 50% der PS aktive Flimmerzellen beobachtet werden. Nach dem 27. Kulturtag nahmen die autolytischen Vorgänge rasch zu.

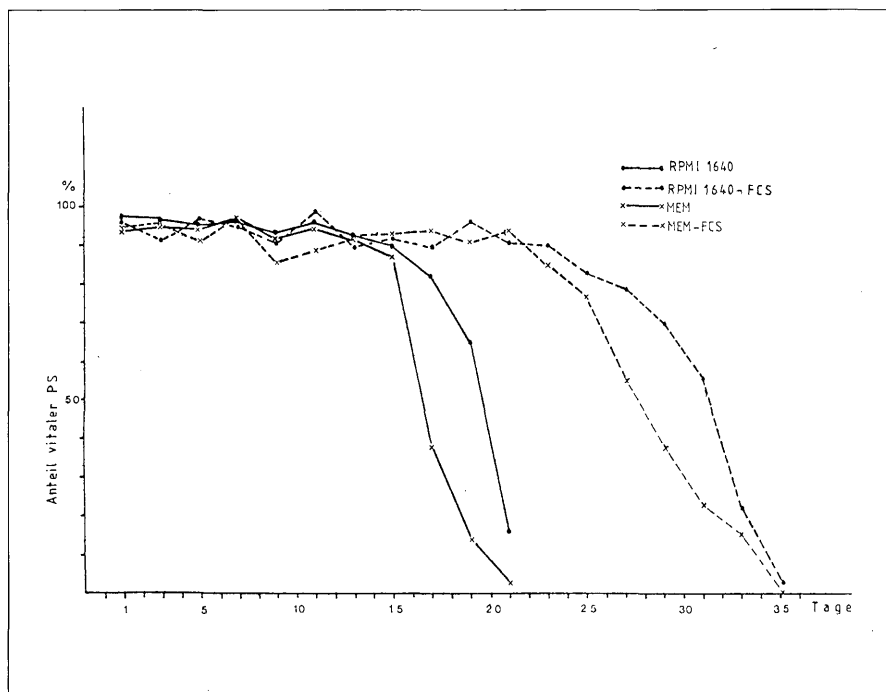


Abb. 2: *In vitro*-Haltung von Protoscolices (PS) von *Echinococcus multilocularis* in verschiedenen Medien: MEM, MEM + 0,5% FCS, RPMI 1640, RPMI 1640 + 0,5% FCS

In den beiden serumfreien Kulturen konnten die PS zwei Wochen am Leben gehalten werden; nach dem 15. Tag der *in vitro*-Haltung nahmen die autolytischen Prozesse zu.

Das morphologische Zustandsbild der PS änderte sich – wie beabsichtigt – während der *in vitro*-Haltung nur unwesentlich. Eine geringgradige Größenzunahme und eine Reduktion der Kalkkörperchen der PS konnte sowohl in den serumfreien, als auch in den mit FCS angereicherten Medien beobachtet werden. In den serumhaltigen Medien konnte überdies die beginnende Ausbildung von Exkretionskanälchen festgestellt werden. Der morphologische Status entspricht somit der Präsegmentationsstufe 2 (serumfreie Medien) bzw. 3 (serumhaltige Medien) nach dem Wachstum-Zeit-Diagramm nach SMYTH (1979) (Abb. 3).

Mit der – wenn auch zeitlich begrenzten – *in vitro*-Haltung von PS von Em in serumfreiem Medium glauben wir die notwendige Voraussetzung für die biochemische und immunologische Charakterisierung von metabolischem Em-Antigen geschaffen zu haben; über erste Ergebnisse wurde bereits berichtet (AUER und ASPÖCK 1985).

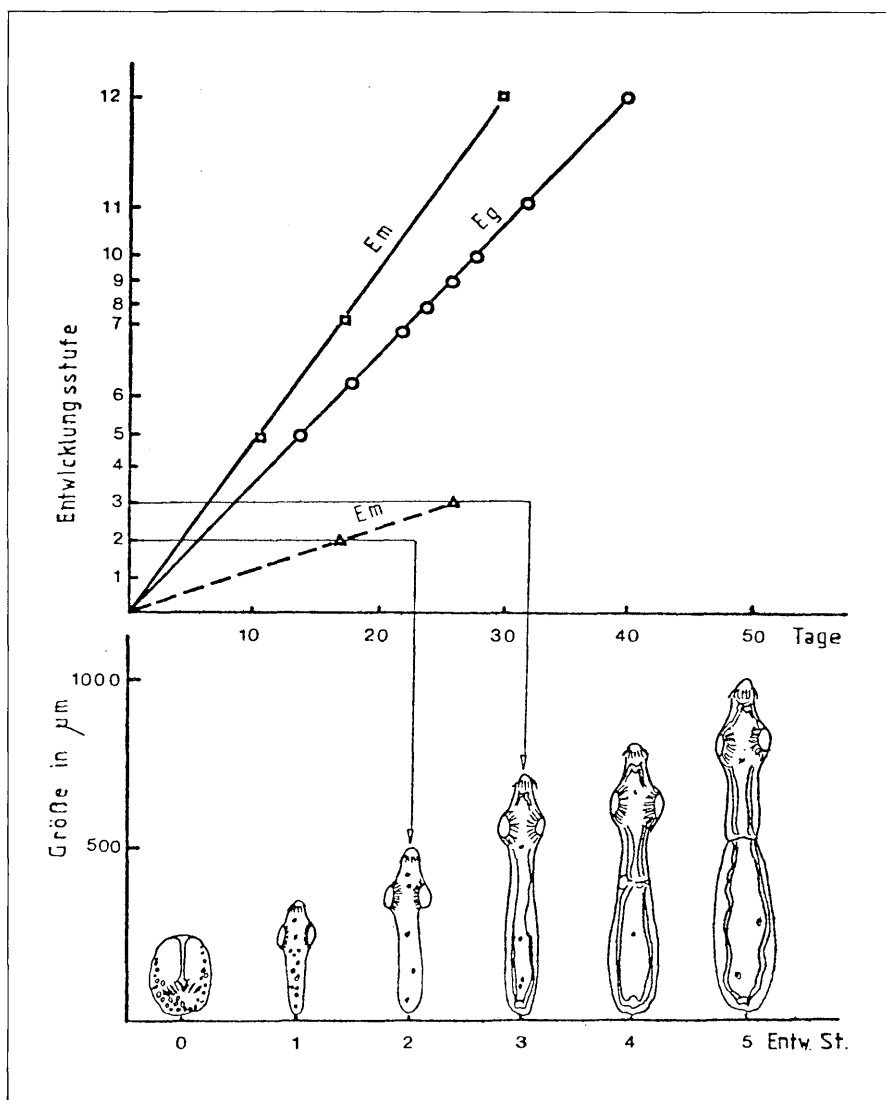


Abb. 3: Wachstum-Zeit-Diagramm von *Echinococcus multilocularis* und *Echinococcus granulosus* unter in vivo-Bedingungen (verändert nach SMYTH 1979)

Zusammenfassung

Es wird ein in vitro-Modell zur Haltung von Protoscolices von *Echinococcus multilocularis* in serumfreiem Medium vorgestellt. Es ist gelungen, evaginierte Protoscolices 2 Wochen in RPMI 1640- bzw. MEM-Medium – ohne Zusatz von Serumproteinen –, am Leben zu halten. Dieses Modell ermöglicht die Produktion von reinem metabolischem Em-Antigen und kann als basale Voraussetzung für die biochemische und immunologische Charakterisierung von Em-Antigen angesehen werden.

Summary

In vitro maintenance of protoscolices of *Echinococcus multilocularis*

A model is described for the in-vitro maintenance of protoscolices of *Echinococcus multilocularis* in synthetic tissue culture media without any serum proteins. We succeeded in maintaining evaginated protoscolices of *Echinococcus multilocularis* in MEM as well as in RPMI 1640 for 2 weeks. This model may be considered as a promising method for the production of pure metabolic antigens leading to a successful biochemical and immunological characterization of Em antigen.

Verzeichnis der im Text und in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen

Eg:	<i>Echinococcus granulosus</i>
Em:	<i>Echinococcus multilocularis</i>
FCS:	foetales Kälberserum
HBSS:	Hank's balanced salt solution
MEM:	Minimal essential Medium
MM:	Metazestoden-Material
PS:	Protoscolices
RRMI 1640:	Medium für Zell- und Gewebekultur

Literatur

- AUER, H., ASPÖCK, H. (1985): Studies on antigens from in vitro cultivated protoscolices of *Echinococcus multilocularis* and their possible use in the serodiagnosis of human echinococcosis. Proc. 2nd Int. Symp. Taeniasis/Cysticercosis and Echinococcosis/Hydatidosis, Dec. 1985. Ceske Budejovice, CSSR (im Druck).
- COUTELEN, F. (1927a): Essai de culture in vitro de scolex et d'hydatides echinococciques. Ann. Parasit. hum. comp. 5, 1–19.
- COUTELEN, F. (1927b): Sur l'évolution vésiculaire in vitro des scolex echinococciques. Ann. Parasit. hum. comp. 5, 239–242.
- DÉVÉ, F. (1926): Evolution vésiculaire du scolex echinococcique obtenue in vitro. La culture artificielle du kyste hydatide. C. r. Séanc. Soc. Biol. 94, 440–441.
- RAUSCH, R., JENTOFT, V. L. (1957): Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXI. Observations on the propagation of the larval *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 in vitro. J. Parasit. 43, 1–8.
- SMYTH, J. D. (1967): Studies on tapeworm physiology. XI. In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscolex to the strobilate stage. Parasitology 57, 111–133.
- SMYTH, J. D. (1979): *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*: in vitro culture of the strobilar stages from protoscolices. Angew. Parasitol. 20, 137–147.
- SMYTH, J. D., DAVIES, Z. (1975): In vitro suppression of segmentation in *Echinococcus multilocularis* with morphological transformation of protoscolices into monozoic adults. Parasitology 71, 125–135.
- WEBSTER, G. M., CAMERON, T. W. M. (1963): Some preliminary observations on the development of *Echinococcus* in vitro. Can. J. Zool. 41, 185–195.
- YAMASHITA, J., OHBAYASHI, M., SAKAMOTO, T., ORIHARA, M. (1962): Studies on Echinococcosis. XIII. Observations on the vesicular development of the scolex of *E. multilocularis* in vitro. Jap. J. vet. Res. 10, 85–96.

ANSCHRIFT DER AUTOREN:

Dr. Herbert Auer, Dr. Kurt Hermentin, Univ.-Prof. Dr. Horst Aspöck
Abt. Med. Parasitologie, Hygiene-Institut der Universität
Kinderspitalgasse 15, A-1095 Wien

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: 1986

Band/Volume: [8](#)

Autor(en)/Author(s): Auer Herbert, Hermentin Kurt, Aspöck Horst

Artikel/Article: [In vitro-Haltung von Protoscolices von Echinococcus multilocularis. 99-103](#)