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

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 145–151

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

Kriterien der Produktion von Toxoplasma-Antigen in der Gewebekultur

K. Hermentin, Eva Heppe, H. Auer, H. Aspöck

Einleitung

Seit Anfang der 30er-Jahre gibt es Versuche zur in vitro-Kultivierung von *Toxoplasma gondii*. Entscheidende Fortschritte ergaben sich jedoch erst Mitte der 50er-Jahre durch die Verwendung humaner Karzinomlinien als Wirtszellen. Seither wird *Toxoplasma gondii* in einer Reihe von humanen und tierischen Karzionomzellen wie HeLa (Cervix-Karzinom), HEp-2 (Larynx-Karzinom), Vero (African Green Monkey Kidney) mit unterschiedlichen Erfolgen gezüchtet.

In neuester Zeit kommt der in vitro-Kultivierung von *Toxoplasma gondii* in vermehrtem Maße Bedeutung zu. Dies liegt einerseits in den in einigen Ländern (so etwa in England, Deutschland und Österreich) stark verschärften Tierversuchsbestimmungen begründet, andererseits in den gesteigerten Anforderungen an die Reinheit und Standardisierbarkeit des Toxoplasma-Antigens. Außerdem eröffnen sich durch die Züchtung der Toxoplasmen in der Gewebekultur neue und bessere Möglichkeiten zur genauen Definierung von Stoffwechselantigenen bzw. des Toxoplasma-Eindringungsfaktors (cell penetration factor [CPF]).

Genaue Untersuchungen über die Technik der in vitro-Kultivierung wurden vor allem mit HeLa-Zellen durchgeführt (LUND et al. 1963; LYCKE und LUND 1964 a, b; MIROVSKY und VALKOUN 1981; VALKOUN 1983; VALKOUN und CINATL 1979). Ziel unserer Arbeit war es, die Kriterien der Produktion von Toxoplasma-Antigen in der HEp-2 Gewebekultur zu ermitteln und möglichst kostengünstige Strategien zur Gewinnung größerer Mengen nicht durch Wirtszellreste verunreinigter Toxoplasmen zu ermitteln.

Material und Methoden

Toxoplasma-Stamm:
BK, in kontinuierlicher Passage in SPF-Mäusen (OF 1-Swiss) gezüchtet.

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

Nährmedium:
Minimum Essential Medium Eagle (modified), mit Earles Salzen und 2 g/l Natriumbikarbonat (Flow Lab., GB). Zusätze: 10% hitzeinaktiviertes (30 Minuten bei 56° C) fötales Kälberserum (Gibco, GB), seronegativ gegenüber *Toxoplasma gondii* im Indirekten Hämagglutinationstest, 1% L-Glutamin (Gibco), 1% Antibiotica/Antimycotica (Gibco), 1% Neomycin (Gibco).

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

Kultivierung:
Die Zellen wurden in 25 cm^2 Polystyrolflaschen (Costar, NL) bei 37°C in einer 5% CO_2-Atmosphäre gezüchtet. Das Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen zum Zwecke der Weiterverdünnung erfolgte mit 0,25% Trypsin (Flow Lab.). Zum Auszählen von Wirtszellen und Toxoplasmen diente eine Bürker-Türk Zählkammer.

Ergebnisse und Diskussion

Gute Vermehrungsraten von *Toxoplasma gondii* werden in der Gewebekultur durch die Infektion von Zellmonolayern mit einer genau zu bestimmenden Anzahl an Erregern erreicht. In ersten Versuchen ermittelten wir daher die für unseren Toxoplasma-Stamm (BK) bei HEp-2 Zellmonlayern optimale Inokulationsmenge (Abb. 1).

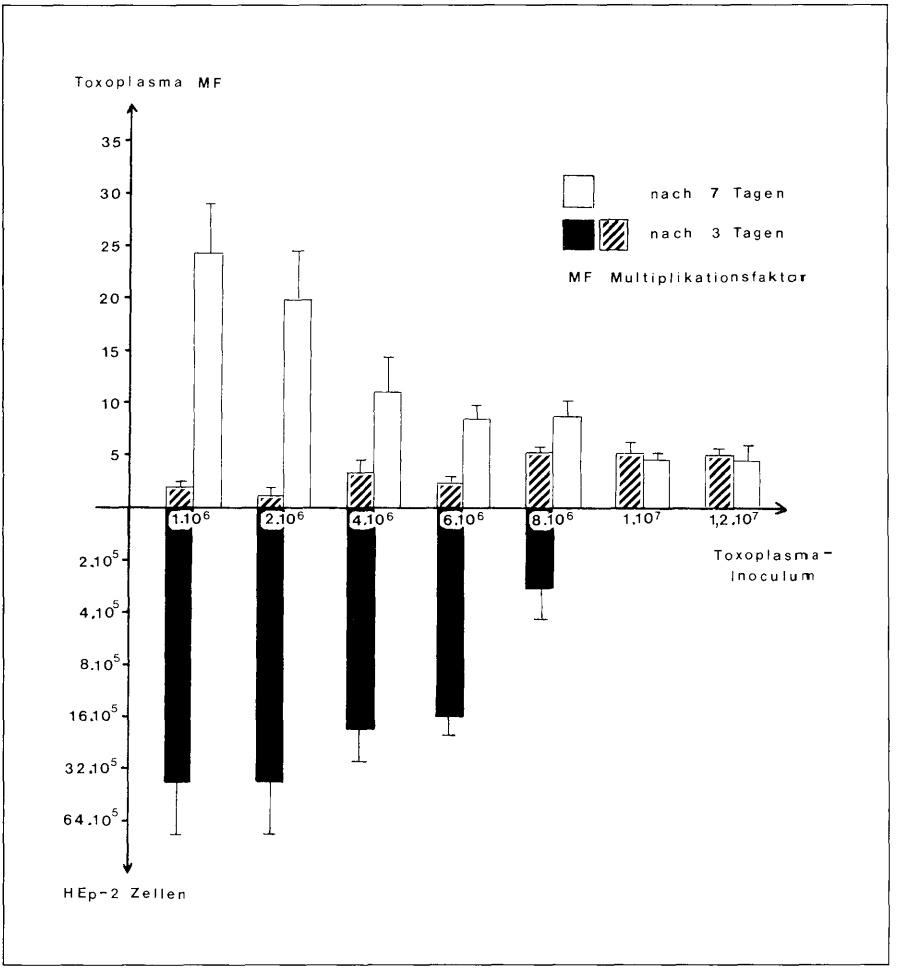

Abb. 1: Vermehrungsraten von Toxoplamsa gondii und HEp-2 Zellen nach drei und sieben Tagen bei Inocula von 1.10^6, 2.10^6, 4.10^6, 6.10^6, 8.10^6, 1.10^7 und $1{,}2.10^7$ Toxoplasmen auf HEp-2 Monolayer; 25 cm^2 Kulturflaschen.

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

Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Vermehrungsrate vom Erreger-Inoculum bzw. von den noch vorhandenen unzerstörten HEp-2 Zellen: Bei einem hohen Inoculum werden die HEp-2 Zellen rasch zerstört, sodaß bereits nach 3 Tagen keine Wirtszellen mehr zu Verfügung stehen und die Vermehrungsrate daher nach dem 3. Tag nicht mehr zunimmt. Bei geringerem Erreger-Inoculum ist der Zellrasen am 3. Tag im wesentlichen unbeschädigt und die Toxoplasma-Vermehrung gering, während am 7. Tag p.i. der Monolayer zur Gänze abgebaut ist; die Toxoplasmen haben sich stark vermehrt. Es haben hier sichtlich das Wachstum und die Vermehrung ungeschädigter Wirtszellen mit der Toxoplasma-Vermehrung und der damit zusammenhängenden Zerstörung der Wirtszellen über längere Strecken hinweg Schritt gehalten.

Wir untersuchten in der Folge, ob diese Art Gleichgewicht zwischen dem Zellabbau durch die Toxoplasmen und dem Aufbau durch die Teilung der ungeschädigten Zellen sich auch dann hervorrufen läßt, wenn Toxoplasmen nicht auf voll ausgebildete Monolayer gebracht werden, sondern zu Zellen sofort nach dem Trypsinisierungs- und Splittvorgang zugesetzt werden. Es zeigte sich (Abb. 2), daß bereits nach 4 Tagen höhere Toxoplasma-Vermehrungsraten im Vergleich zu den infizierten Zellmonolayern (nach 7 Tagen) auftraten, obwohl weit weniger HEp-2 Wirtszellen zur Verfügung standen. Dies erklären wir uns einerseits dadurch, daß frisch mit Trypsin behandelte Zellen leichter von Toxoplasmen penetriert werden können, da die Oberflächenmembran irritiert ist, andererseits daß Zellen aus Monolayern bzw. fast ausgebildeten Monolayern eine starke Teilungsaktivität aufweisen.

Als zusätzlicher positiver Effekt tritt bei Kulturen, die sofort nach dem Trypsinisieren infiziert werden, eine weitaus geringere Verunreinigung durch tote Zellreste im Überstand auf, als dies bei infizierten Monolayern der Fall ist.

Betrachtet man die einzelnen Toxoplasma-Vermehrungsraten (Abb. 2) genauer, so läßt sich – in ähnlicher Weise wie bei infizierten Zellmonolayern – erkennen, daß bei hohen Toxoplasma-Inocula bereits nach 3 Tagen die Wirtszellen vollständig zerstört sind und daher die Vermehrungsrate gering ist. Bei niedrigen Toxoplasma-Inocula tritt eine starke Vermehrung erst nach dem 3. Tag p.i. auf und hat am 4. Tag sicherlich noch nicht ihr Maximum erreicht, da zu diesem Zeitpunkt noch viele unzerstörte HEp-2 Zellen zur Verfügung stehen.

Ein bei der in vitro-Kultivierung besonders auf der Kostenseite ins Gewicht fallender Faktor betrifft das Serum, welches für das Zellwachstum zugefügt werden muß. Wir untersuchten, ob das häufig verwendete, besonders teure, fötale Kälberserum durch andere, billigere Seren ersetzt oder ob die Serenkonzentration vermindert werden kann, ohne die Toxoplasma-Vermehrungsrate herabzusetzen. Wie aus der Tabelle 1 zu ersehen ist, traten sowohl bei einem Zusatz von 10% Kälberserum als auch von 10% Neugeborenen-Rinderserum und 3% fötalem Kälberserum (FCS) nur geringe Vermehrungsraten auf. Bei Medien, die keinen Serumzusatz enthielten, kam es zu keiner Toxoplasma-Vermehrung. Serum bzw. bestimmte im Serum enthaltene Substanzen sind also essentielle Bestandteile für die Toxoplasmen. Die besten Ergebnisse wurden mit 10% FCS erzielt, sodaß alle Versuchsansätze mit dieser Konzentration durchgeführt wurden.

Weitere, von uns überprüfte Faktoren, betreffen den Einfluß des Na-Bikarbonatgehaltes, den Einfluß des Nachpufferns des Nährmediums sowie den Einfluß des Bewegens der Kulturflaschen auf die Vermehrungsrate (Tab. 2).

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

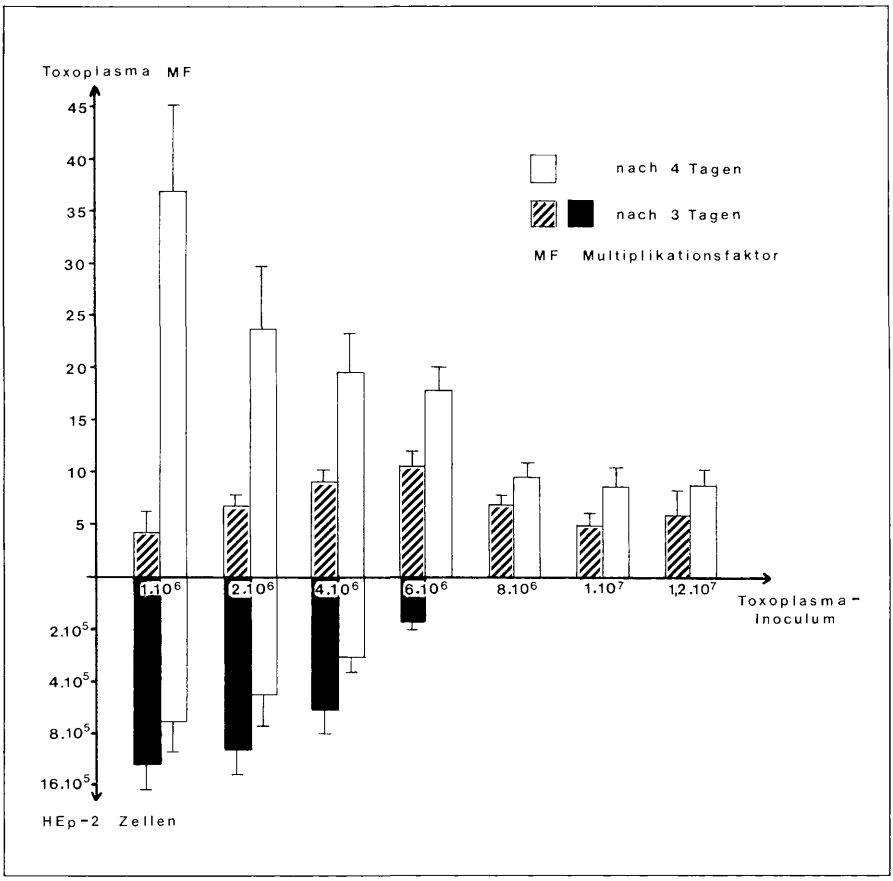

Abb. 1: Vermehrungsraten von Toxoplamsa gondii und HEp-2 Zellen nach drei und vier Tagen bei Inocula von 1.10^6, 2.10^6, 4.10^6, 6.10^6, 8.10^6, 1.10^7 und $1{,}2.10^7$ Toxoplasmen auf $1{,}5.10^6$ HEp-2 Zellen, frisch trypsinisiert; 25 cm^2 Kulturflaschen.

TABELLE 1: **Einfluß der Serumart und Serumkonzentration auf die Vermehrungsrate der Toxoplasmen** (Inoculum: 6.10^6 Toxoplasmen auf 1.10^6 HEp-2 Zellen, frisch trypsinisiert; 25 cm^2 Kulturflaschen)

Serumart und Serumkonzentration	Vermehrungsrate nach	
	3 Tagen	4 Tagen
10% Kälberserum	2,00 ± 0,85	9,10 ± 1,90
10% Neugeborenen-Rinderserum	2,10 ± 0,72	8,60 ± 1,40
10% Fötales Kälberserum	8,50 ± 1,73	14,60 ± 3,21
3% Fötales Kälberserum	0,86 ± 0,34	8,80 ± 1,72
0% Serum	0,51 ± 0,32	1,09 ± 0,29

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

TABELLE 2: **Einfluß der Faktoren Na-Bikarbonatgehalt, Nachpuffern des Mediums, Bewegen der Kulturflaschen auf die Vermehrungsrate der Toxoplasmen** (Inoculum: 6.10^6 Toxoplasmen auf 5.10^6, 1.10^6, $1{,}5.10^6$ HEp-2 Zellen, frisch trypsinisiert; 25 cm^2 Kulturflaschen)

Faktoren		Toxoplasma-Vermehrungsrate bei Inoculum von					
		5.10^5 HEp-2		1.10^6 HEp-2		$1{,}5.10^6$ HEp-2	
		3 d	4 d	3 d	4 d	3 d	4 d
$NaHCO_3$-Gehalt des Nährmediums	0,02380 M	3,0	7,1	9,4	11,4	9,9	19,3
	0,03626 M	3,5	15,6	7,9	14,8	11,6	18,1
	0,07140 M	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	–
Nachpuffern des Mediums auf pH 7,4		3,8	7,7	11,4	11,8	11,2	19.5
ohne Nachpuffern des Mediums		3,3	7,1	9,9	11,2	10,1	21,5
Bewegen der Kulturflaschen		3,2	11,1	6,8	19,1	10,3	22,9
ohne Bewegen d. Kulturflaschen		3,7	7,9	6,8	17,2	9,8	18,2

Nach einer Untersuchung, die von DVORAK und HOWE (1977) mit Toxoplasmen und sekundären, embryonalen Rinderskelettmuskelzellen durchgeführt wurde, liegt das Optimum des Na-Bikarbonatgehaltes bei 36,2 mmol/l, also etwas höher als die in den käuflichen Medien vorhandene Menge von 23,8 mmol/l. Unterhalb und oberhalb dieser Konzentration fanden die Autoren eine geringere Vermehrungsrate. Für HEp-2 Zellen konnten wir keinen bedeutenden Unterschied bei Verwendung 23,8 mmolarer und 36,2 mmolarer Lösungen feststellen; klar war jedoch zu erkennen, daß ein höherer Gehalt hemmend auf die Toxoplasma-Vermehrung wirkt.

Das Nachpuffern des Mediums (am 2. und 3. Tag p.i.) erbrachte keinen Einfluß auf die Vermehrungsrate. Ebenso ließ das Bewegen der Kulturflaschen im Gegensatz zur Ruhighaltung keine Unterschiede erkennen. Allerdings erfolgte das Bewegen der Flaschen nur zweimal pro Tag für kurze Zeit.

Die guten Toxoplasma-Vermehrungsraten bei Verwendung frisch trypsinisierter Zellen legten die Frage nahe, ob eine etwas „aggressivere" Behandlung der Wirtszellen mit Trypsin zu einem höheren Befall und zu einer größeren Toxoplasma-Vermehrung führt. Drei verschiedene Trypsinisierungsmethoden wurden untersucht (Tab. 3). Beim üblichen, schonenden Trypsinisierungsvorgang kommen die Zellen nur für zirka 1 Minute mit 0,25% Trypsin in Kontakt, während beim starken Trypsinisieren die Trypsinlösung für etwa 4–5 Minuten – bis zum Ablösen der Zellen vom Fläschchenboden – auf den Zellen verbleibt. Danach wird die Enzymaktivität mit serumhältigem Medium abgestoppt. Trypsin-EDTA ist eine Mischung, die zum Ablösen stark haftender Zelltypen verwendet wird und die Zelloberfläche stärker angreift als Trypsin.

Die Verwendung schonend trypsinisierter Zellen führte zu Vermehrungsraten wie sie auch in den vorhergegangenen Versuchen auftraten. Stark trypsinisierte Zellen hin-

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

gegen führten zu einer so hohen Toxoplasmen-Vermehrung am 3. Tag, daß zu diesem Zeitpunkt bereits alle Wirtszellen völlig zerstört und aufgelöst waren und am 4. Tag keine Zählung mehr vorgenommen werden konnte. Bei HEp-2 Zellen, welche mit Trypsin (0,05%)-EDTA (0,02%) behandelt wurden, ergab sich ebenfalls eine im Vergleich zu den schonend trypsinisierten Wirtszellen höhere Vermehrungsrate.

TABELLE 2: **Einfluß der Trypsinisierungsart der HEp-2 Zellen auf die Vermehrungsrate der Toxoplasmen** (Inoculum: 6.10^6 Toxoplasmen auf 5.10^5, 1.10^6, $1{,}5.10^6$ HEp-2 Zellen, frisch trypsinisiert; 25 cm^2 Kulturflaschen)

Trypsinisierungsart	Toxoplasma-Vermehrungsrate bei Inoculum von					
	5.10^5 HEp-2		1.10^6 HEp-2		$1{,}5.10^6$ HEp-2	
	3 d	4 d	3 d	4 d	3 d	4 d
schonend trypsinisiert	7,0	14,3	11,0	16,3	10,5	14,6
stark trypsinisiert	10,7	–	22,2	–	24,2	–
Trypsin-EDTA	11,0	13,3	17,0	19,6	19,1	20,1

Betrachtet man nun die dargestellten Ergebnisse nochmals im Zusammenhang, so erscheint folgende Vorgangsweise stichwortartig am besten geeignet, um zu möglichst vielen, wenig mit Wirtszellresten verunreinigten Toxoplasmen zu gelangen: Infektionen von $1-1{,}5.10^6$ Wirtszellen, welche stark trypsinisiert wurden, mit etwa 1.10^6 Toxoplasmen. Nährmedium: Minimum Essential Medium mit 2 g/l Natriumbikarbonat und 10% fötalem Kälberserum. Ernte der Toxoplasmen 4 Tage p.i.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kriterien der Produktion von Toxoplasma-Antigen in der HEp-2 Gewebekultur zu ermitteln und kostengünstige Strategien zur Gewinnung größerer Mengen nicht durch Wirtszellreste verunreinigter Toxoplasmen zu erstellen. Durch die Infektion frisch trypsinisierter Wirtszellen mit *Toxoplasma gondii* konnte im Unterschied zur herkömmlichen Methode der Infektion von Zellmonolayern eine höhere Vermehrungsrate der Toxoplasmen, ein höherer Reinheitsgrad und eine verkürzte Vermehrungsperiode erreicht werden. Die Vermehrungsrate hängt dabei wesentlich von der Art des Trypsinisierens ab. Ein weiterer, für die Vermehrung essentieller Faktor stellt die Zufügung von Serum dar, wobei sich fötales Kälberserum als am besten geeignet erwies. Andere Faktoren wie leichte Erhöhung des Na-Bikarbonatgehalts des Mediums, pH-Wert-Konstanthaltung und Bewegen der Kulturflaschen erwiesen sich als nicht bedeutend.

Summary

Criteria of Toxoplasma antigen production in tissue culture

Criteria of the production of Toxoplasma antigen in HEp-2 tissue culture were evaluated and low cost procedures for good yields of *Toxoplasma gondii* free of host cell

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

debris are described. In contrast to the conventionally used method of infecting cell monolayers a higher yield and higher purity of Toxoplasma as well as a shortened multiplication period was obtained by the immediate infection of trypsinized host cells. Most essential for a good multiplication rate was the process of trypsinization. Another important factor was the addition of serum (particularly foetal calf serum) to the culture medium. Other factors like slightly raised concentration of sodium-bicarbonate, constant pH and movement of culture flasks proved to be of no significant influence.

Literatur

DVORAK, J. A., HOWE, C. L. (1977): Toxoplasma gondii – vertebrate cell interactions. I. The influence of bicarbonate ion, CO_2, pH and host cell culture age on the invasion of vertebrate cells in vitro. J. Protozool. 24, 416–419.

LUND, E., LYCKE, E., SOURANDER, P. (1963): Some aspects on cultivation of Toxoplasma gondii in cell cultures. Acta. pathol. microbiol. scand. 57, 199–210.

LYCKE, E., LUND, E. (1964 a): A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of Toxoplasma gondii. 1. Acta pathol. microbiol. scand. 60, 209–220.

LYCKE, E., LUND, E. (1964 b): A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of Toxoplasma gondii. 2. Acta pathol. microbiol. scand. 60, 221–233.

MIROVSKY, P., VALKOUN, A. (1981): Preparation of purified Toxoplasma gondii suspensions. Folia Parasitol. 28. 23–27.

VALKOUN, A. (1983): Continual cultivation of Toxoplasma gondii on HeLa cells. Folia Parasitol. 30, 289–294.

VALKOUN, A., ČINÁTL, J. (1979): Propagation of Toxoplasma gondii in suspension cultures of HeLa cells. Folia Parasitol. 26, 165–167.

KORRESPONDENZADRESSE

Dr. Kurt Hermentin
Hygiene-Institut der Universität
Abteilung für Med. Parasitologie

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): Hermentin Kurt, Heppe Eva, Auer Herbert, Aspöck Horst

Artikel/Article: Kriterien der Produktion von Toxoplasma-Antigen in der Gewebekultur. 145-151