

## Verschiedene Methoden der in-vitro Entwicklung metazyklischer Trypanosomen (*Trypanosoma brucei brucei* und *T. b. rhodesiense*)

R. Kaminsky\*, Isabel Cunningham, Esther Beaudoin

### Einleitung

Die afrikanischen Trypanosomen der Brucei-Gruppe (*Trypanosoma brucei brucei*, *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*) durchlaufen einen komplizierten Entwicklungszyklus (Abb. 1). Detaillierte Untersuchungen der immunologischen und biochemischen Eigenschaften der infektiösen, von der Tsetsefliege beim Stich injizierten Formen sind stark limitiert. So erreichen unter normalen Laborbedingungen nur etwa 4% der auf infizierten Säugetier-Wirten gefütterten Tsetsefliegen eine reife Infektion (HONIGBERG et al. 1976).

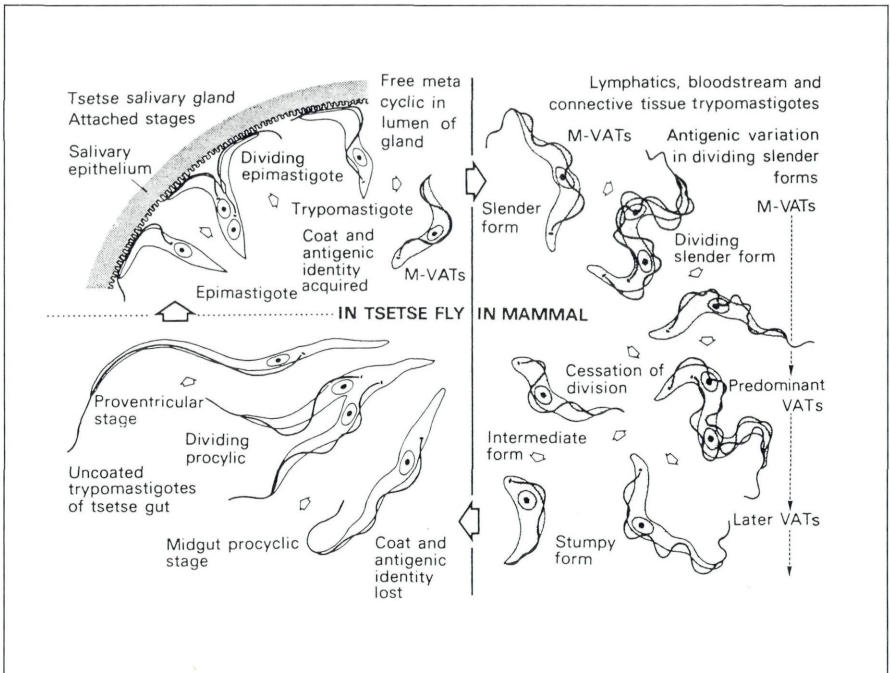


Abb. 1: Darstellung des Entwicklungszyklus von *Trypanosoma brucei* spp. (von VICKERMANN und BARRY)

\*) Feodor Lynen Stipendiat der Alexander von Humboldt Stiftung

In-vitro Methoden bieten hier eine Alternative; CUNNINGHAM und Mitarbeiter (1977, 1979, 1981; JONES et al. 1981) konnten in Kulturen von prozyklischen, nicht infektiösen Trypanosomen zusammen mit Tsetsefliegengewebe bei 28°C die Entwicklung metazyklischer *T. b. brucei* und *T. b. gambiense* nachweisen. Im folgenden sollen ähnliche Kultursysteme beschrieben werden, in denen sich ebenfalls metazyklische Formen entwickeln.

## Material und Methoden

### 1. Trypanosomen-Stämme

Die folgenden Trypanosomen-Stämme wurden verwendet:

#### *Trypanosoma brucei brucei*

TRUM (Trypanosome Research University of Massachusetts) 252 und TRUM 397, beides prozyklische Formen, die von TREU 1194 (Blutformen) abstammen (HONIGBERG et al. 1976)

TRUM 480, prozyklische Formen, die von klonierten Blutformen von TREU 1194 abstammen

#### *Trypanosoma brucei rhodesiense*

TRUM 497 und TRUM 589, prozyklische Formen, die von EATRO (East African Trypanosome Research Organisation) 1895 aus Uganda abstammen (CUNNINGHAM 1986)

TRUM 590, prozyklische Formen, die von Blutformen von einer Maus gewonnen wurden, die mit in-vitro entwickelten metazyklischen Formen von TRUM 589 infiziert wurde

TRUM 545, Derivat von LVH (Langue Valley Hospital) 32 aus Kenya (CUNNINGHAM 1986)

### 2. Gewebe und Insektenzellen

Die Methoden zur Gewinnung der Tsetsefliegengewebe sind bereits ausführlich von CUNNINGHAM et al. (1981) beschrieben worden.

*Phormia regina*-Eier erhielten wir von E. BOWDEN aus der Zoologischen Abteilung der University of Massachusetts. *Phormia regina*-Eier wurden oberflächensterilisiert, in steriles Nährmedium überführt und bei 28°C bebrütet. Der Schlupf der Larven erfolgte nach 1–3 Tagen und nach weiteren 10–12 Tagen wurden die dann verpuppungsreifen Larven aus dem Nährmedium heraus zu sterilen Holzspänen gegeben. Nach etwa 7 Tagen befanden sich die Fliegen kurz vor dem Schlupf und konnten nach der gleichen Methode wie Tsetsefliegen seziiert werden. Das zur Aufzucht verwandte sterile Nährmedium ist von DETHIER und GOLDRICH (1971) beschrieben.

Zur Gewinnung der Mausembryo-Gewebe wurden 14–16 Tage alte Mausembryonen von CD-1 Mäusen verwendet.

*Drosophila melanogaster*-, *Aedes aegypti*- und *Anopheles gambiae*-Zellen wurden uns von I. SCHNEIDER (Walter Reed Army Institutes of Research, Washington) zugesandt.

### 3. Kulturmedien

Zur Kultivierung der Trypanosomen wurde CUNNINGHAM's Medium (1977) benutzt, mit der Änderung, daß dem Medium HEPES-Puffer in einer Endkonzentration von 25 mM zugegeben wurde. Alle Medien für Trypanosomen, die für die Versuche mit Insektenzellen gemischten Medien eingeschlossen, wurde 20% fötales Kälberserum zugesetzt.

Zur Kultivierung von *D. melanogaster*-Zellen benutzten wir SCHNEIDER's Drosophilla Medium, für *A. aegypti*-Zellen das Medium von MITSUHASHI und MARAMOROSCH (1964) und für *A. gambiae*-Zellen modifiziertes KITAMURA's Medium nach VARMA und PUDNEY (1969).

### 4. Kultursysteme mit Trypanosomen

Kulturen von prozyklischen Trypanosomen der verschiedenen Stämme wurden zunächst von tiefgefrorenem Material herangezüchtet. Proben dieser nicht infektiösen Trypanosomen wurden dann den verschiedenen Geweben bzw. Zellkulturen hinzugefügt und bei 28°C kultiviert. Vor dem Zusammenführen der Trypanosomen mit den Insektenzellen wurden diese wenige Tage an Mischungen aus CUNNINGHAM's Medium und dem jeweiligen Insektenzell-Medium adaptiert. Zwei bis dreimal wöchentlich wurden Trypanosomen aus den Kulturen entfernt und i.p. in CD-1 Mäuse inokuliert.

### 5. Separation der metazyklischen Trypanosomen aus den Kulturen

Zur Separation der metazyklischen Formen aus den Kulturen wurden DEAE-Cellulose Säulen verwendet, wobei die verschiedenen Trypanosomen auf Grund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladung getrennt werden. Die hier befolgte Methode entspricht der zur Diagnose von Blutproben verwandten Methode von LANHAM und GODFREY (1970) bzw. von LUMSDEN et al. (1977).

## Ergebnisse

### Prozyklische Trypanosomen mit *Glossina morsitans*-Geweben

Die verschiedenen Gewebe (Köpfe mit Speicheldrüsen, Verdauungstrakte, Thorax-Muskel und Abdomenhüllen) wurden mit den prozyklischen Trypanosomen kultiviert und bewirkten die Entwicklung von epimastigoten und schließlich metazyklischen Formen. Diese Kulturansätze mit *Glossina morsitans*-Geweben sind auch für mehrere *T. b. rhodesiense*-Stämme erfolgreich und reproduzierbar gewesen (CUNNINGHAM 1986), wobei der Thorax-Muskel das günstigste Gewebe zu sein scheint (Tab. 1).

### Prozyklische Trypanosomen mit *Phormia regina*-Geweben

In Tabelle 2 ist die Entwicklung von metazyklischen *T. b. rhodesiense* in Kulturen mit *Phormia regina*-Köpfen und Verdauungstrakten wiedergegeben. Für die infektiösen Kulturen lag die Präpatenzperiode in den Mäusen mit 5–7 Tagen in der gleichen Größenordnung wie die bei den Kulturen mit Tsetsefliegengeweben. Mit *Phormia regina*-Geweben konnte die Entwicklung metazyklischer Formen für *T. b. brucei* (TRUM 252) und *T. b. rhodesiense* (TRUM 497, 545, 590) nachgewiesen werden (CUNNINGHAM und KAMINSKY, im Druck).

TABELLE 1:

Entwicklung der Infektiösität von *Trypanosoma brucei rhodesiense* (TRUM 497) kultiviert mit *Glossina morsitans*-Geweben in Cunningham's Medium bei 28°C

n Gewebe / Flasche	n Tage bis zum Nachweis infektiöser Formen	Dauer der Infektiösität (Tage)	Infektionen in Mäusen	
			n infiziert / n inokuliert	Präpatenz (Tage)
22 Köpfe mit Speicheldrüsen	9	34	9 / 13	4–6
5 Verdauungstrkt.	7	31	9 / 10	5–8
7 Abdomenhüllen	7	26	8 / 10	5–9
2 Thorax Muskl.	7	26	8 / 10	5–8
1 Thorax Muskel	7	22	7 / 10	5–7
Kontrolle	–	0	0 / 10	–

TABELLE 2:

Entwicklung der Infektiösität von *Trypanosoma brucei rhodesiense* (TRUM 497) kultiviert mit *Phormia regina*-Geweben in Cunningham's Medium bei 28°C

n Gewebe / Flasche	n Tage bis zum Nachweis infektiöser Formen	Dauer der Infektiösität (Tage)	Infektionen in Mäusen	
			n infiziert / n inokuliert	Präpatenz (Tage)
13 Köpfe mit Speicheldrüsen	18	26	6 / 8	5–7
4 Verdauungstrkt.	13	29	7 / 8	5–6
5 Abdomenhüllen	0	0	0 / 8	–
Kontrolle	–	0	0 / 8	–

#### Prozyklische Trypanosomen mit Insektzellen

Es stellte sich heraus, daß *Drosophila melanogaster*-Zellen nicht gut für die eine Kultur mit Trypanosomen geeignet waren, da sie nicht am Boden haften blieben und somit eine Trennung der Trypanosomen von den Zellen zu aufwendig würde.

Noch ungeeigneter waren *Aedes aegypti*-Zellen, da die mit ihnen zusammengeführten Trypanosomen schon nach wenigen Tagen abstarben.

Mit *Anopheles gambiae*-Zellen dagegen konnten prozyklische Formen erfolgreich kultiviert werden. Die Insektzellen wuchsen zunächst allein zu einem ein- bis mehrzelligen „Layer“ heran, zu dem dann die Trypanosomen zugegeben wurden. Dabei war die Mischung aus CUNNINGHAM's Medium und modifiziertem KITAMURA's Medium wichtig. Bei Verwendung von CUNNINGHAM's Medium allein starben die *Anopheles gambiae*-Zellen bald ab, bei Mischungen aus gleichen Volumina beider Medien vermehrten sich die Trypanosomen zwar, jedoch konnten in diesen Kulturen nie metazyk-

lische Trypanosomen nachgewiesen werden. Eine Mischung aus 3 Volumen CUNNINGHAM's Medium und 1 Volumen mod. KITAMURA's Medium erwies sich als optimal. In diesen Kulturansätzen konnte eine Entwicklung metazyklischer Trypanosomen (*T. b. brucei* TRUM 480, TRUM 397 und *T. b. rhodesiense* TRUM 589) gezeigt werden (Tab. 3) (KAMINSKY et al., in Vorbereitung).

TABELLE 3:

**Entwicklung der Infektiösität von *Trypanosoma brucei brucei* (TRUM 397) kultiviert mit *Anopheles gambiae*-Zellen in verschiedenen Medien bei 28°C**

Medium	n Tage bis zum Nachweis infektiöser Formen	Dauer der Infektiösität (Tage)	Infektionen in Mäusen	
			n infiziert / n inokuliert	Präpatenz (Tage)
3 CM + 1 KM	19	25	10 / 10	3–7
1 CM + 1 KM	0	0	0 / 7	–
CM	17	1	1 / 8	7
Kontrolle ohne Zellen	0	0	0 / 10	–

CM = CUNNINGHAM's Medium; KM = mod. KITAMURA's Medium

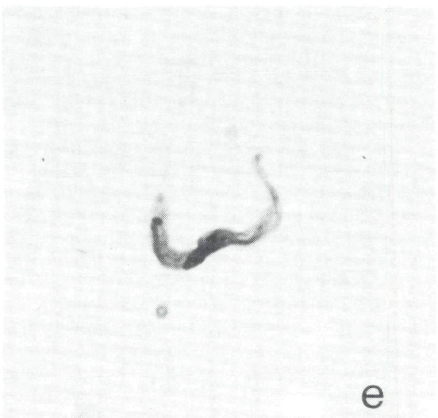
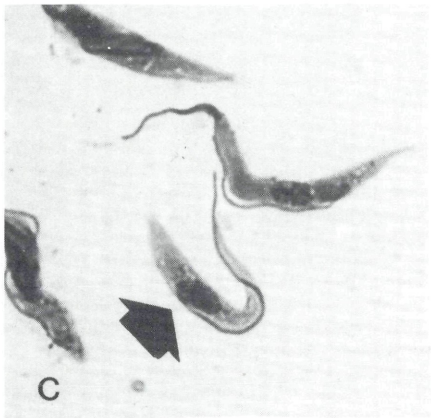
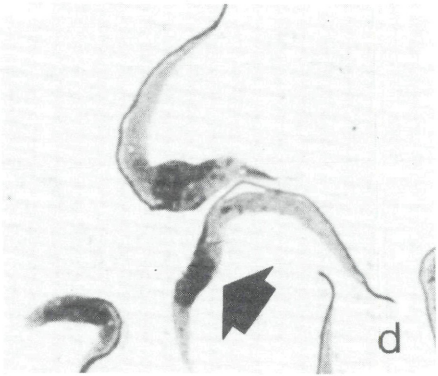
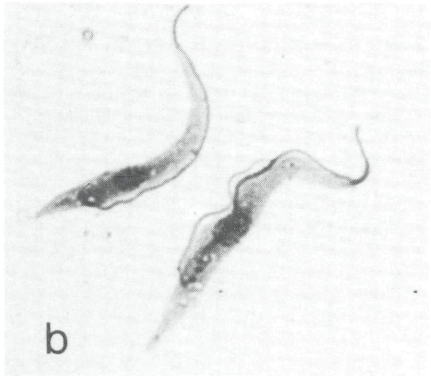
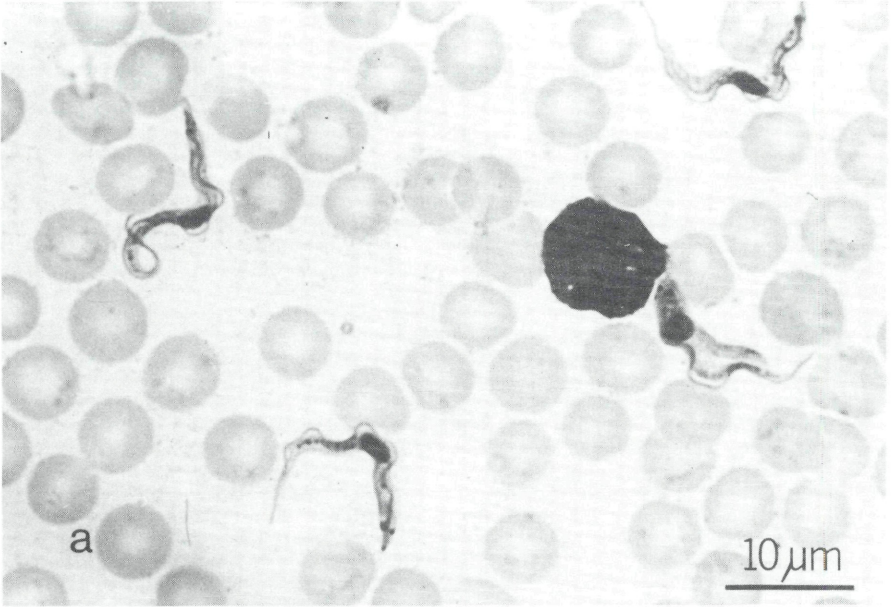
#### Prozyklische Trypanosomen mit Mausembryo-Geweben

Nur gelegentlich konnte bei den Kulturen mit Mausembryo-Geweben die Entwicklung metazyklischer Trypanosomen nachgewiesen werden. Bei diesen Kulturen erwies sich der manchmal auftretende Zerfall der etwa 0,5–1,0 cm großen Embryogewebe als problematisch. Die wenigen positiven Kulturen (*T. b. brucei* TRUM 397 und *T. b. rhodesiense* TRUM 589) verhielten sich in Bezug auf die Präpatenzperiode und den Infektionsverlauf ähnlich wie Kulturen mit Tsetsefliegengeweben. Der in Abbildung 2 dargestellte „geringe Befall“ der Mäuse mit Trypanosomen, die mit Trypanosomen aus Kulturen mit Mausembryo-Geweben inokuliert wurden, soll die nur gelegentliche Entwicklung zu infektiösen Kulturen andeuten.

#### Diskussion

Ausgehend von Blutformen (Abb. 3 a) kann in CUNNINGHAM's Medium bei 28°C die Entwicklung zu nicht-infektiösen prozyklischen Formen (Abb. 3 b, c) induziert werden. Vermutlich ist hier der Temperaturabfall einer der auslösenden Faktoren für die Umwandlung (VAN DER PLOEG et al. 1985). Die weitere Entwicklung im Vektor über epimastigote (Abb. 3 d) zu metazyklischen Formen (Abb. 3 e) läßt sich in-vitro weiterführen (Abb. 2).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Entwicklung infektiöser Formen in Kulturen von prozyklischen *T. b. rhodesiense* mit *Glossina*-Geweben in CUNNINGHAM's Medium bei 28°C möglich ist. Ähnliche Beobachtungen für *T. b. brucei* ssp. sind von CUNNINGHAM et al. (1981) und JONES et al. (1981) beschrieben worden. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß der Thorax-Muskel einer einzigen Tsetsefliege ausreicht, um in diesem Kultursystem metazyklische Formen zu produzieren. Die Notwendigkeit von *Glossina*-Geweben zur Entwicklung der metazyklischen Trypanosomen limitiert diese Methode, da Tsetsepuparia nicht immer zugänglich sind oder aber ihre Nutzung behördlich stark eingeschränkt ist wie beispielsweise in den USA.



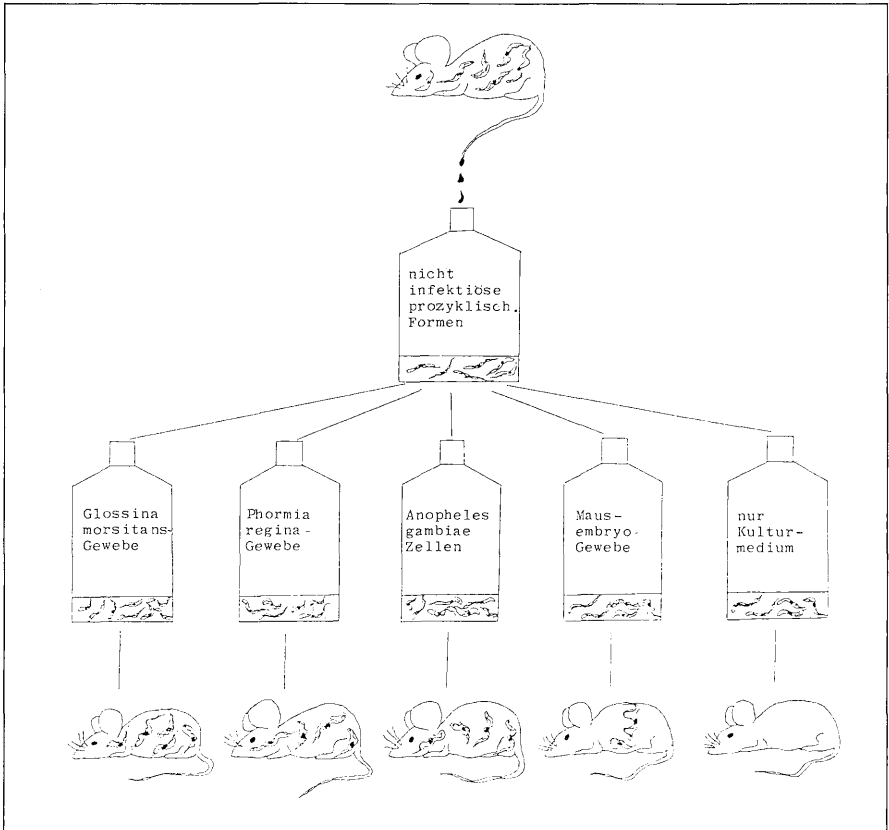


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Methoden zur in-vitro Entwicklung metazyklischer *Trypanosoma brucei* ssp.

In diesem Fall kann man auf Kulturen mit *Phormia regina*-Gewebe ausweichen. Für Mäuse infektiöse Formen konnten in Kulturen mit *Phormia regina*-Gewebe ausgehend von prozyklischen *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* produziert werden. Unter Berücksichtigung der Präpatenzperiode in den infizierten Mäusen scheint es, daß die in Kulturen mit *Phormia regina*-Gewebe entwickelten metazyklischen Trypanosomen ähnlich denen sind in Kulturen mit *Glossina*-Gewebe. Eine Einschränkung dieses Kultursystems ist die Gewährleistung einer sterilen Aufzucht der Fliegen.

Abb. 3: Mikrophotographien von GIEMSA gefärbten Entwicklungsstadien von *T. b. rhodesiense*

- a = Blutformen („long slender“, „intermediate“ und „short stumpy“)
  - b = prozyklische Formen aus Kulturen mit *Phormia regina*-Gewebe, beachte Teilungsform
  - c = prozyklische Formen, beachte Form (Pfeil) mit dem Kinetoplasten an Nukleus angrenzend
  - d = epimastigote Form (Pfeil)
  - e = metazyklisch-ähnliche Form nach Separation durch DEAE-Cellulose Säule.
- Der Maßstab in a gilt ebenso für b bis e.

Auch in Kulturen von prozyklischen *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* mit *Anopheles gambiae*-Zellen konnte die Entwicklung metazyklischer Trypanosomen nachgewiesen werden. Der Infektionsverlauf war in Mäusen, die mit Trypanosomen aus diesen Kulturen inokuliert wurden, ähnlich dem von Mäusen, die mit Trypanosomen aus Kulturen mit *Glossina*-Gewebe inokuliert wurden. In Bezug auf ihre Handhabung sind Kulturen mit Insektenzellen einfacher als Kulturen mit Insektengewebe, jede Bearbeitung von Fliegen bzw. Fliegenpuppen entfällt. Es muß aber noch ausführlicher gezeigt werden, ob Kulturansätze mit Insektenzellen (hier *Anopheles gambiae*-Zellen) auch für andere Stämme der Brucei-Gruppe ebenso erfolgreich sind wie Kulturen mit *Glossina*-Gewebe.

Mausembryo-Gewebe sind für die in-vitro Entwicklung metazyklischer Trypanosomen weniger gut geeignet, da sie nur sporadisch zur Entwicklung infektiöser Trypanosomen führen.

Ein Problem der Separation metazyklischer Trypanosomen aus Kulturen mit prozyklischen ist ihre geringe Anzahl. Quantitative Untersuchungen von Kulturen mit *Glossina*-Gewebe (CUNNINGHAM und TAYLOR 1979; CUNNINGHAM 1986) haben ergeben, daß in infektiösen Kulturen die Gesamtzahl der metazyklischen Trypanosomen etwa  $3 \times 10^3$ /ml beträgt, etwa soviel wie die von einer infizierten Tsetsefliege mit dem Speichel abgegebenen metazyklischen Formen (3000–12000, BRUN et al. 1979).

Ziel weiterer Untersuchungen ist daher erstens die Separationsmethode zu verfeinern und zweitens Kulturansätze zu entwickeln, in denen sich eine größere Anzahl metazyklischer Trypanosomen entwickeln.

## Zusammenfassung

Wenn prozyklische Formen verschiedener Trypanosomen-Stämme von *Trypanosoma brucei brucei* und *T. b. rhodesiense* zusammen mit *Glossina morsitans*- oder *Phormia regina*-Gewebe in einem flüssigen Medium bei 28°C kultiviert werden, entwickeln sich einige von ihnen zu metazyklischen Formen. Der Thorax-Muskel einer einzigen Tsetsefliege reichte für die Transformation des Stammes *T. b. rhodesiense* TRUM 497 aus. Für Mäuse infektiöse Trypanosomen konnten ebenfalls in Kulturen von prozyklischen *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* mit *Anopheles gambiae* Zellen in Mischungen aus Trypanosomen- und Insektenzell-Medium produziert werden. Ähnliche Kulturen mit Mausembryo-Gewebe führten nur zu gelegentlichen Infektionen von Mäusen. Prozyklische Trypanosomen, die ohne Gewebe oder Zellen kultiviert wurden, waren nicht infektiös. Die metazyklischen Formen konnten aus den infektiösen Kultur-Populationen mit DEAE-Zellulose-Säulen separiert werden.

## Summary

Variety methods of the in-vitro development of metacyclic trypanosomes (*Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. rhodesiense*)

When procyclic forms of different stocks of *Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. rhodesiense* were grown in a liquid medium at 28°C in the presence of *Glossins morsitans* and *Phormia regina* explants, some of them developed into metacyclic forms. Only one explant of *Glossina* thoracic muscle was necessary for the transformation with the *T. b. rhodesiense* stock TRUM 497. Trypanosomes infective to mice were also produced in cultures of procyclic *T. b. brucei* and *T. b. rhodesiense* with *Anopheles*



*gambiae* cells grown in mixtures of the trypanosome and the insect cell medium. Similar cultures with mouse embryo tissues gave rise to only occasional infections in mice. Procyclic trypanosomes cultivated without tissues or cells were not infective. The metacyclic forms could be separated from the infective culture populations by DEAE-cellulose columns.

## Literatur

- BRUN, R., JENNI, L., TANNER, M. (1979): Pleomorphic *Trypanosoma brucei* strains: In-vitro transformation of metacyclic forms and subsequent cultivation of the resulting bloodstream forms. In: The in vitro cultivation of the pathogens of tropical diseases. UNDP/WORLD BANK/WHO, Schwabe & Co AG, Basel, 207–210.
- CUNNINGHAM, I. (1977): New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *J. Protozool.* 24, 325–329.
- CUNNINGHAM, I. (1986): Infectivity of *Trypanosoma rhodesiense* cultivated at 28°C with various tsetse fly tissues. *J. Protozool.* 33, 226–231.
- CUNNINGHAM, I., HONIGBERG, B. M. (1977): Infectivity reacquisition by *Trypanosoma brucei brucei* cultivated with tsetse salivary glands. *Science* 197, 1279–1282.
- CUNNINGHAM, I., TAYLOR, A. M. (1979): Infectivity of *Trypanosoma brucei* cultivated at 28°C with tsetse fly salivary glands. *J. Protozool.* 26, 428–432.
- CUNNINGHAM, I., KAMINSKY, R. (1986): Development of metacyclic forms of *Trypanosoma brucei* spp. in cultures containing explants of *Phormia regina* Meigen. *J. Parasitol.* (im Druck).
- CUNNINGHAM, I., HONIGBERG, B. M., TAYLOR, A. M. (1981): Infectivity of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei* stocks cultivated at 28°C with various tsetse fly tissues. *J. Parasitol.* 67, 391–397.
- DETHIER, V. G., GOLDRICH, N. (1971): Blowflies: Alteration of adult taste responses by chemical present during development. *Science* 173, 242–244.
- HONIGBERG, B. M., CUNNINGHAM, I., STANLEY, H. A., SU-LIN, K.-E., LUCKINS, A. G. (1976): *Trypanosoma brucei*: Antigenic analysis of bloodstream, vector, and culture stages by the quantitative fluorescent antibody method. *Exp. Parasitol.* 39, 496–522.
- JONES, T. W., CUNNINGHAM, I., TAYLOR, A. M., GRAY, A. R. (1981): The use of culture derived metacyclic trypanosomes to studies on the serological relationships of stocks of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 560–565.
- LANHAM, S. M., GODFREY, D. M. (1970): Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28, 521–534.
- LUMSDEN, W. H. R., KIMBER, C. D., STRANGE, M. (1977): *Trypanosoma brucei*: detection of low parasitaemias in mice by a miniature anion-exchanger/centrifugation technique. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 421–424.
- MITSUHASHI, J., MARAMOROSCH, K. (1964): Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 22, 435–460.
- VAN DER PLOEG, L. H. T., GIANNINI, S. H., CANTOR, C. R. (1985): Heat shock genes: Regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 228, 1443–1446.
- VARMA, M. G. R., PUDNEY, M. (1969): The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti* (L.) larvae in different media. *J. Med. Ent.* 6, 432–439.

## KORRESPONDENZADRESSE

Dr. Ronald Kaminsky  
ILRAD  
P.O.Box 30709, Nairobi, Kenya

# 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: 1986

Band/Volume: [8](#)

Autor(en)/Author(s): Kaminsky Ronald, Cunningham Isabel, Beaudoin Esther

Artikel/Article: [Verschiedene Methoden der in-vitro Entwicklung metazyklischer Trypanosomen \(Trypanosoma brucei brucei und T. b. rhodesiense\). 163-171](#)