

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 9 (1987) 95 - 99

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

Versuche zur Dauerkultivierung von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur

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

Einleitung

Steigende Anforderungen an die Reinheit und Standardisierbarkeit von *Toxoplasma*-Antigenen sowie stark verschärfte Tierversuchsbestimmungen führten in den letzten Jahren zu vermehrten Bemühungen, die Zucht von Toxoplasmen in der Maus durch die in der Gewebekultur zu ersetzen. Ein vollständiger Ersatz ist jedoch nur dann möglich und sinnvoll, wenn regelmäßig hohe Ernteraten erzielt werden und wenn gewährleistet ist, daß Rückgriffe auf Toxoplasmen aus der Maus nicht notwendig sind.

In der Literatur fehlen bisher Angaben über eine ökonomische Dauerkultivierung von Toxoplasmen mit beständig hohen Erntezahlen. In den meisten Arbeiten werden Zuchtmethoden beschrieben, bei denen immer wieder auf Toxoplasmen aus der Maus zurückgegriffen werden muß. Berichte über die Aufrechterhaltung von *Toxoplasma*-Infektionen in der Gewebekultur über viele Passagen hinweg liegen zwar vor (6, 8), doch gelang es dabei niemals gleichzeitig hohe Vermehrungsraten zu erzielen bzw. war für die Aufrechterhaltung beständig hoher Erntezahlen ein großer Material- und Kostenaufwand notwendig (7).

Wie wir bereits im Vorjahr berichten konnten, gelang es uns unter optimierten Kulturbedingungen befriedigende *Toxoplasma*-Vermehrungsraten zu erzielen, sodaß die Kosten für die Zucht der Toxoplasmen in der Gewebekultur nun nur noch unmaßgeblich höher liegen als für die Zucht in der weißen Maus (1, 2). Bei der Weiterkultivierung der Toxoplasmen auf neuen Wirtszellen trat jedoch regelmäßig bereits nach kurzer Zeit eine starke Abnahme der Vermehrungsraten ein, sodaß immer wieder auf Toxoplasmen aus der Maus zurückgegriffen werden mußte. In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche und Ergebnisse zur Dauerkultivierung von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur berichtet.

Material und Methoden

Toxoplasma-Stamm: BK, virulent.

Zelllinie: Humane Larynx-Karzinomzellen HEP-2; CCI 23, American Type Culture Collection (Rockville, USA).

Nährmedium: Minimum Essential Medium Eagle (modified), mit Earles Salzen und 2g/l Natriumbikarbonat (Flow Lab., GB).

Zusätze: 10% hitzeinaktiviertes (30 Minuten bei 56 ° C) fötales Kälberserum (Flow Lab.), seronegativ gegenüber *Toxoplasma gondii* im Indirekten Hämagglutinationstest, 1% L-Glutamin (Gibco), 1% Antibiotica/Antimycotica (Gibco), 1% Neomycin (Gibco).

Kultivierung: Die Zellen wurden in 75 cm² Polystyrolflaschen (Costar, NL) bei 37° C in einer 5% CO₂-Atmosphäre gezüchtet. Das Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen zum Zwecke der Weiterverdünnung erfolgte mit 0,25% Trypsin (Flow Lab.). Zum Auszählen der Toxoplasmen diente eine Bürker-Türk Zählkammer.

Ergebnisse

Erste Versuche zur Dauerkultivierung von *Toxoplasma gondii* wurden mit infizierten Zellmonolayern durchgeführt. Nach 7 Tagen, zum Zeitpunkt als der Zellrasen zerstört und eine maximale Vermehrung der Toxoplasmen eingetreten war, wurden die Toxoplasmen auf neue Zellmonolayer weiterverimpft. Bereits nach zwei Passagen sank die Vermehrungsrate jedoch stark ab. Die mikroskopische Untersuchung der Parasiten zeigte, daß die Toxoplasmen durchwegs lebten. Kriterien hierfür waren die Eigenbeweglichkeit und die Nicht-Anfärbbarkeit mit Trypan-Blau.

Aus den Ergebnissen mußte geschlossen werden, daß Toxoplasmen — obwohl lebend — ihre Fähigkeit, in Wirtszellen einzudringen, nach längerer oder kürzerer extrazellulärer Verweilzeit verlieren. Wir bemühten uns daher, Toxoplasmen kurz nach ihrem Freiwerden aus den Zellen weiterzuverimpfen. Hierzu wurden bereits am 4. Tag p. i., zu einem Zeitpunkt, zu dem die erste Vermehrung der Toxoplasmen und deren Freiwerden in ausreichendem Maße stattgefunden haben, die Trophozoiten auf neue Zellmonolayer verimpft. Die alten, infizierten Monolayer wurden mit frischem Medium versehen, und die Toxoplasmen wie zuvor am 7. Tag geerntet. Durch diese Methode gelangten Toxoplasmen zur Weiterkultivierung, die sich nur kurze Zeit (maximal einen Tag) frei im Medium befunden hatten. Die erzielten Vermehrungsraten lagen etwas höher als bei den ersten Versuchen (Abb. 1), jedoch nahm auch in diesem Fall die *Toxoplasma*-Vermehrung nach wenigen Passagen rasch ab. (Es sei hier angemerkt, daß die Weiterkultivierung natürlich durch starke Erhöhung der Inokulationsdosis gewährleistet werden hätte können, doch wäre das dem Ziel der Wirtschaftlichkeit zuwidergelaufen!)

Ein Mediumwechsel oder das Zufügen von fötalem Kälberserum einen Tag vor der Weiterkultivierung führte zu einer Verbesserung der Vermehrungsraten, dennoch war die längste zu erzielende Kultivierungsdauer unbefriedigend. In weiteren Versuchen wurde der Einfluß polykationischer Polypeptide auf die Vermehrungsrate untersucht. WERK et al. (9) berichten über eine erhöhte Zellinvasion durch Zusatz der Polypeptide (gemessen nach 30 Minuten) und vermuten, daß solche Polypeptide Bestandteile des Penetration-Enhancing Factors sind. Wir konnten durch den Zusatz polykationischer Polypeptide (10 ng/ml Poly-L-Lysin, Mg. 300.000, bzw. 10 ng/ml Poly-L-Histidin, Mg. 5.000 - 15.000, Sigma, USA) keine höhere *Toxoplasma*-Vermehrung (gemessen nach 4 Tagen) erzielen.

Bei früheren Versuchen hatten wir feststellen können, daß Toxoplasmen frisch trypsinierte Wirtszellen leichter penetrieren können als Zellen von Monolayern (3). Grund für die erleichterte Wirtszellinvasion ist vermutlich eine durch das Trypsinieren

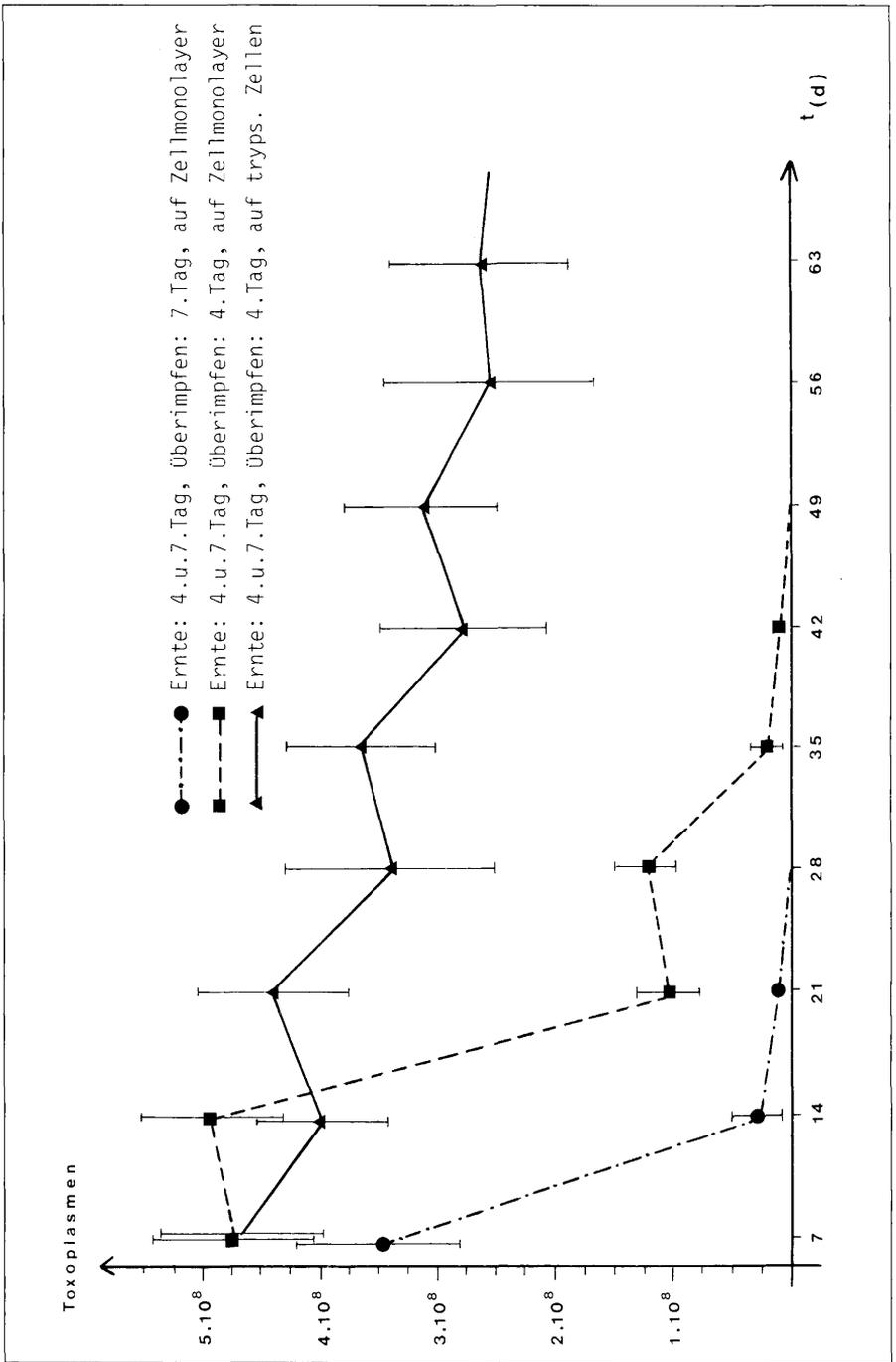


Abb. 1: Zahl der geernteten Toxoplasmen pro Passage (Ernten jeweils vom 4. und 7. Tag p. i. addiert) bei drei verschiedenen Methoden der Weiterkultivierung. Inoculum konstant $3 \cdot 10^6$ Toxoplasmen.

bedingte Beeinträchtigung der Wirtszell-Glycocalyx. Es wurden daher in einem weiteren Versuch Toxoplasmen zum Zwecke der Dauerkultivierung am 4. Tag p. i. geerntet und auf frisch-trypsinierte Zellen verimpft. Durch diese Vorgangsweise konnte erstmals eine kontinuierliche Kultivierung erzielt werden. Aus der Abbildung 1 sind die weitgehend konstanten Vermehrungsraten und Ernteergebnisse von etwa $2-3 \cdot 10^8$ Toxoplasmen/Passage ersichtlich.

Diskussion

Als Erklärung der dargestellten Ergebnisse bietet sich folgende Theorie an: Toxoplasmen sind obligatorisch intrazelluläre Parasiten. Liegen sie nach Platzen von Pseudozysten bzw. Zysten extrazellulär im umgebenden Medium vor, so versuchen sie schnellstmöglich wieder in neue Zellen einzudringen. Gelingt das nicht, so verlieren die freien Trophozoiten, wie mehrfach beschrieben wurde, rasch ihre Motilität und Infektiosität (5, 8).

Bei der *in vitro*-Kultur stehen im Verlauf der zunehmenden *Toxoplasma*-Vermehrung im Kulturfläschchen immer weniger unzerstörte Wirtszellen zur Verfügung, sodaß immer mehr Toxoplasmen extrazellulär im Medium verbleiben müssen und dadurch ihre Fähigkeit, Wirtszellen zu invadieren, verlieren. Werden nun Toxoplasmen für die Weiterkultivierung zu einem späten Zeitpunkt — etwa am 7. Tag p. i., wenn der Zellmonolayer aufgelöst und die maximale *Toxoplasma*-Vermehrung erreicht wurde — aus den Kulturfläschchen entnommen, so befindet sich, da keine Synchronisation in der Freisetzung der Toxoplasmen besteht, ein Teil der Parasiten schon seit längerer Zeit frei im Kulturmedium und hat seine Eindringungsfähigkeit verloren, während ein anderer Teil noch infektionstüchtig ist. Verimpft man solche Toxoplasmen in immer gleichbleibender Menge von Kultur zu Kultur, so kommt es mit jeder Passage zu einem Ausdünnungseffekt, da jeweils ein nicht genau zu bestimmender Prozentsatz der inokulierten Toxoplasmen nicht mehr zur Zellinvasion fähig ist. Durch Vorverlegung der Ernte auf den 4. Tag p. i. kann das Ausmaß des Verlustes an Infektiosität, wie die Versuche zeigten, vermindert werden. Ein zusätzliches Trypsinieren der Wirtszellen erleichtert das Eindringen der Toxoplasmen und führt zu gleichbleibenden Infektionsraten über einen längeren Zeitraum hinweg.

Wenngleich dies eine Verbesserung der *in vitro*-Kultur von *Toxoplasma gondii* darstellt, ist die von uns praktizierte Methode für eine gleichzeitige Massen- und Dauerkultivierung noch immer zu arbeitsaufwendig und zu wenig praxisnah. Für weitere Verbesserungen wird es vermutlich notwendig sein, einerseits jene Faktoren ausfindig zu machen, welche die Aufrechterhaltung der Infektiosität der Toxoplasmen im Medium gewährleisten, oder andererseits Kulturbedingungen zu schaffen, bei welchen eine ständige Zuführung von Wirtszellen sowie laufende Ernte von Toxoplasmen möglich ist.

Zusammenfassung

Es wird über Versuche und Ergebnisse zur Massen- und Dauerkultivierung von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur berichtet. Als entscheidendes Hemmnis für die Weiterkultivierung der Toxoplasmen erweist sich die Tatsache, daß frei im Medium befindliche Trophozoiten — obwohl lebend — ihre Infektiosität schon nach kurzer extrazellulärer Verweilung verlieren. Es wird eine Methode der Weiterkultivierung

von Toxoplasmen beschrieben, die eine weitgehende Konstanz der Infektiosität und somit gleichbleibende Infektionsraten über längere Zeiträume hinweg gewährleistet.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, Gewebekultur, in vitro-Kultur.

Summary

Experiments on continuous cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture

Experiments on and results of mass and long-term propagation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture are reported. The main impediment to continuous cultivation of *Toxoplasma* appears to be due to a decrease of infectivity of trophozoites being extracellular in the culture medium. We describe a method for continuous cultivation of *Toxoplasma gondii* leading to constant infectivity and persistent infection rates for extended periods.

Key words

Toxoplasma gondii, tissue culture, in vitro culture (continuous cultivation).

Literatur

1. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., ASPÖCK, H. (1986): Kriterien der Produktion von Toxoplasma-Antigen in der Gewebekultur. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8, 145-151.
2. HERMENTIN, K., HEPPE, E., AUER, H., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1987): *Toxoplasma gondii* in tissue culture: multiplication rates, degrees of purity, cost-benefit relation. Zbl. Bakt. Hyg. A 265, 528.
3. HERMENTIN, K., ASPÖCK, H. (1987): Higher yields and increased purity of in vitro grown *Toxoplasma gondii*. Zbl. Bakt. Hyg. A (im Druck).
4. LUND, E., LYCKE, E., HAHN, E. (1960): Stability of *Toxoplasma gondii* in liquid media. Acta pathol. microbiol. scand. 48, 99-104.
5. LUND, E., LYCKE, E., SOURANDER, P. (1963): Some aspects on cultivation of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. Acta pathol. microbiol. scand. 57, 199-210.
6. SCHUHOVA, V. (1957): Langfristige Kulturen des *Toxoplasma gondii* in He-La-Zellen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 168, 631-636.
7. SRINIVASA, H., MITHAL, S., BALAYA, S. (1982): Maintenance of *Toxoplasma gondii* in Vero cell line. Indian J. Med. Res. 75, 521-528.
8. VALKOUN, A. (1983): Continual cultivation of *Toxoplasma gondii* on HeLa cells. Folia parasitol. 30, 289-294.
9. WERK, R., DUNKER, R., FISCHER, S. (1984): Polycationic polypeptides: a possible model for the penetration-enhancing factor in the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. J. Gen. Microbiol. 130, 927-933.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. K. Hermentin
Abteilung für 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: 1987

Band/Volume: [9](#)

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

Artikel/Article: [Versuche zur Dauerkultivierung von Toxoplasma gondii in der Gewebekultur. 95-99](#)