

Vergleichende Untersuchungen über Enzymmuster unterschiedlich kultivierter Toxoplasmen

Ch. Harmer¹, Regina Sommer², M. Manafi², A. Hassl¹, H. Aspöck¹

Einleitung Eine Infektion mit dem ubiquitären Parasiten *Toxoplasma gondii* führt beim Menschen zu sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern. Das klinische Spektrum der Toxoplasmose kann von einer inapparenten bis zu einer letal endenden, meist zentralnervösen Verlaufsform reichen. Diese verschiedenen Erkrankungsformen könnten durch die Infektion mit biologisch unterschiedlichen Toxoplasmastämmen hervorgerufen werden. Jedoch ist eine Charakterisierung der morphologisch nicht zu unterscheidenden Isolate von *Toxoplasma gondii* bislang nur durch die Virulenz in der Maus möglich. Eine schnelle und einfache Typisierung der Toxoplasmastämme auf biochemischer Basis ist bis heute nicht durchführbar.

Vor kurzem wurde ein biochemisches Verfahren etabliert, das zu einer Erhebung des Enzymprofils von Toxoplasmen geeignet ist (7). Dieses System wurde in Folge angewandt, um neun Maus-virulente Toxoplasmastämme zu charakterisieren und ihren Verwandtschaftsgrad festzustellen (6).

Toxoplasmen werden in der Abteilung für Medizinische Parasitologie routinemäßig in der Maus, für die Antigenherstellung von serologischen Tests, gezüchtet. Im Bestreben, eine in vitro Kultivierung von *Toxoplasma gondii* aufzubauen, wird der Parasit im kleineren Rahmen auch in einer serumfrei geführten Gewebekultur propagiert. Für uns stellte sich die Frage, ob die Wirtszellen, in denen die Parasitenvermehrung abläuft, Einfluß auf das Enzymmuster der Toxoplasmen nehmen. Wir haben daher vier Maus-virulente Toxoplasmastämme in vivo und in vitro gezüchtet, um die Enzymmuster der unterschiedlich kultivierten Erreger zu vergleichen.

Material und Methoden SPF-Mäuse (weiblich, 20 g, OF 1 Swiss, Versuchstieranstalt Himberg) wurden mit 10^8 Trophozoiten eines Toxoplasmastammes i. p. beimpft. Folgende Toxoplasmastämme wurden getestet: RH-Wien, T, ALT und BK-Wien (Charakteristika in Tab. 1). Die Trophozoiten wurden 48 Stunden nach der Infektion geerntet.

In vitro-System Hep2-Zellen (humane Larynxkarzinomzellen) wurden mit Toxoplasmen im Verhältnis 1 : 4 versetzt. Die Zellen und die Toxoplasmen wurden im serumfreien und proteinarmen PC-1 Medium (Ventrex, Portland, USA), in Kulturflaschen (25 cm², Costar, Cambridge, USA), bei 37° C in einer 5% CO₂ Atmosphäre gezüchtet. Dem Medium wurde 1% L-Glutamin (Gibco, Gaitersburg, USA) und 2% Serumersatz (Ventrex) beigegeben, um ein besseres Ansetzen der Zellen am Boden der Kulturflasche und eine bessere Vermehrung der Zellen zu gewährleisten. Die erste Ernte aus der Zellkultur erfolgte nach 48 Stunden, nur diese dabei gewonnenen Toxoplasmen wurden erneut mit Hep2-Zellen versetzt. Für diese Studie wurden erst die Toxoplasmen der sechsten in vitro-Generation verwendet.

Tabelle 1:

Spezifikation der vier Toxoplasma-Stämme.

Alle vier Stämme sind für die Maus virulent und bei allen vier beträgt die Periodizität 48 Stunden.

Stamm	Herkunft	Isolierungsmaterial	propagiert seit	isoliert in	Autor
RH-Wien	human	Hirn	1939	USA	8
BK-Wien	human	Ventrikelflüssigkeit	1948	NL	3
ALT	human	Fötus	1967	BRD	11
T	unbekannt	unbekannt	1976	vermutlich A	Thalhammer, pers. Mitt.

Von nun an wurden sowohl die in vivo als auch die in vitro gezüchteten Erreger gleich behandelt. Die Toxoplasmen wurden dreimal bei 375 g (5 Minuten) abzentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Toxoplasma-Pellet in 145 mM sterilem NaCl resuspendiert und auf Dichte und Reinheit kontrolliert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Toxoplasma-Pellet in einem 10 mM Phosphatpuffer aufbewahrt.

Das Testsystem bestand aus dem im Handel erhältlichen API-ZYM Teststreifen (Bio-Merieux, Nürtingen, BRD) und den experimentellen Teststreifen API Aminopeptidasen, API Glykosidasen und API Esterasen. Insgesamt wurden 84 verschiedene Enzyme mit dem API-ZYM Testsystem ausgetestet. Diese 84 Enzyme setzten sich aus 60 Aminopeptidasen, 10 Esterasen und 8 Glykosidasen zusammen, sowie aus dem käuflichen API-ZYM Streifen, auf dem noch die saure und die alkalische Phosphatase, Phosphoamidase, Trypsin, und Chymotrypsin ausgetestet wurden.

Auf jedem Teststreifen befinden sich 20 Nöpfchen, in jedes dieser Nöpfchen wurden nun 10^5 lebende Toxoplasmen in 100 μ l Phosphatpuffer pipettiert. Die Teststreifen wurden bei hoher Luftfeuchtigkeit 18 Stunden bei 37°C inkubiert. In den Nöpfchen befinden sich die Substrate, welche mit einer β -Naphthylamidgruppe gekoppelt sind. Im Falle der Umsetzung des Substrates durch ein Enzym, wird das β -Naphthylamid abgespalten. Nach einer Inkubationszeit wird ein Reagens (Zym A, Zym B) zugegeben, das mit dem abgespaltenen β -Naphthylamid reagiert und dabei eine Farbänderung erfährt. Die Intensität der Farbreaktion wurde mit freiem Auge abgelesen, subjektiv ausgewertet und in drei Klassen eingeteilt: in negativ (weiße Farbreaktion), in positiv (orange Farbreaktion) und in hoch positiv (rot-violette Farbreaktion).

Ergebnisse Die Enzymmuster der verschiedenen kultivierten Toxoplasmen sind aus Tabelle 2 zu entnehmen. Von den insgesamt 84 Enzymen wurden bei 32 Enzymen für alle vier Stämme und in beiden Kultivierungssystemen idente Ergebnisse ermittelt. Bei sieben Enzymen ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf den Nachweis bei den einzelnen Stämmen, bei vollkommener Übereinstimmung in den beiden Kulturverfahren. Für fünf Enzyme ergaben sich erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Kultursystemen, bei völliger Übereinstimmung der Befunde der vier Toxoplasma-Stämme in jedem der beiden Systeme. Bei 39 Enzymen war zumindest bei einem Toxoplasma-Isolat das Enzymmuster unterschiedlich zwischen in vivo- und in vitro-Kultivierung.

Diskussion Der ubiquitär verbreitete Parasit *Toxoplasma gondii* zeigt morphologisch eine erstaunliche Homogenität, obwohl, wie viele Untersuchungen gezeigt haben, kein Zweifel daran bestehen kann, daß bei den zahlreichen bekannten Merkmalen zum Teil erhebliche Unterschiede bestehen (9, 10). In jüngster Zeit wurde in mehreren Laboratorien versucht, nicht-morphologische Merkmale für die Differenzierung von Toxoplasma-Stämmen zu finden und Gesetzmäßigkeiten aufzudecken, die eine Korrelation solcher Merkmalsmuster mit bestimmten Eigenschaften der Stämme erlauben.

Vor kurzem wurden vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Toxoplasmastämmen unternommen, die auf der Basis der Isoenzymanalyse beruhen (1, 2, 4, 5). Diese Isoenzymstudien wurden mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamid- oder in Agarosegelen durchgeführt. Die Methode der Isoenzymanalyse ist jedoch für eine schnelle Stammcharakterisierung bzw. eine Identitätsüberprüfung von *Toxoplasma gondii*-Trophozoiten nicht geeignet, weil diese Methode zeit- und personalintensiv ist.

In einer dieser Studien (4) wurden 35 Toxoplasma-Isolate auf 15 verschiedene Enzyme ausgetestet. Mit Ausnahme der sauren Phosphatase wurden jedoch andere Enzyme untersucht, als wir mit dem API-ZYM Testsystem ausgetestet haben. Im Falle dieses Enzyms konnte in allen ausgetesteten Toxoplasma-Isolaten und in allen Untersuchungen übereinstimmend eine sehr hohe Enzymaktivität festgestellt werden.

Es wurde auch eine Studie über unterschiedlich kultivierte Toxoplasmen (in vivo: in der Maus; in vitro: in humanen Fibroblastenzellen) mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung durchgeführt (5). Dabei konnten keine Unterschiede beim Isoenzymmuster zwischen in vivo und in vitro gezüchteten Toxoplasmen festgestellt werden, mit einer Ausnahme, der Laktatdehydrogenase. Allerdings wurden in diese Untersuchung nur zehn Enzyme einbezogen, davon kein einziges, das auch wir getestet haben. Die Ergebnisse der Isoelektrischen Fokussierung und des API-ZYM Testsystems sind daher nur bedingt vergleichbar.

Mit Hilfe des API-ZYM Testsystems ist es möglich, 84 verschiedene Enzyme innerhalb von 24 Stunden auszutesten. In einer früheren Arbeit (7) konnte gezeigt werden, daß verschiedene Toxoplasma-Stämme unterschiedliche Enzymmuster aufweisen. Die Enzymprofile des Erregers können aber zumindest teilweise vom Kultursystem beeinflusst sein.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß bei 39 der 84 untersuchten Enzyme eine vollständige Übereinstimmung der vier Toxoplasma-Isolate zwischen in vivo- und in vitro- Kultivierung besteht. Diese Enzyme könnten für eine Charakterisierung der einzelnen Toxoplasma-Stämme geeignet sein. Interessant sind die fünf Enzyme (L-tyrosin-arylamidase, L-histidin-arylamidase, Methionin-arylamidase, γ -Glutamyltransferase, L-seryl-L-methionin-arylamidase), die eine vollständige Übereinstimmung zwischen den Stämmen eines Kulturverfahrens zeigten, aber keine Übereinstimmung zwischen den beiden Kultursystemen. Mit Hilfe dieser fünf Enzyme könnte es in Zukunft vielleicht möglich werden, von einer Antigenprobe das Kulturverfahren zu ermitteln, was insbesondere zur Überprüfung schlecht definierter Antigene für Serotests wichtig sein kann.

Als Kontrolle haben wir Wirtszellen (Mausmakrophagen, Hep2-Zellen) mit Hilfe des API-ZYM Testsystems ausgetestet. Diese Kontrollen wurden durchgeführt, um sicher zu sein, daß bei Vorliegen einer Verunreinigung der Toxoplasma-Suspension mit Wirtszellen die Enzyme letzterer nicht das Enzymmuster der Toxoplasmen entscheidend beeinflussen. Tabelle 2 zeigt jedoch, daß die Qualität unserer Toxoplasma-Suspension für die Untersuchung geeignet war, da kein einziges Enzymmuster eines Toxoplasma-Isolates in allen oder auch nur einem Großteil der untersuchten Enzymen mit dem Muster der Wirtszellen übereinstimmte.

In dieser Arbeit konnte erneut gezeigt werden, daß der API-ZYM Testkit für die Erstellung eines Enzymprofils von *Toxoplasma gondii* hervorragend geeignet ist. Im Vergleich zur Isoenzymanalyse mittels isoelektrischer Fokussierung besticht der API-ZYM Testkit durch seine einfachere Handhabung und seine wesentlich geringeren Kosten, sowie durch die erhebliche Zeitersparnis.

	in vivo					in vitro				
	RH	T	ALT	BK	MM	RH	T	ALT	BK	H
AMINOPETIDASEN										
L-tyrosin a.	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
L-pyrrolidon a.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
L-phenylalanin a.	2	1	1	2	1	0	0	0	0	2
L-lysin a.	1	1	1	2	1	0	0	0	0	2
L-hydroxyprolin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L-histidin a.	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Glyzin a.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
L-asparat a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L-arginin a.	2	1	1	1	1	0	0	0	1	2
L-alanin a.	2	1	2	1	1	0	0	0	1	2
N-benzoyl-leuzin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-benzyl-zystin a.	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Methionin a.	1	1	1	1	1	0	0	0	0	2
Glyzyl-glyzin a.	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
Glyzyl-phenylalanin a.	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
Glyzyl-prolin a.	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2
Leuzyl-glyzin a.	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
L-seryl-tyrosin a.	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
N-CBZ-arginin-4-methoxy a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-glutamin a.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
α-L-glutamat a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L-isoleuzin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L-ornithin a.	1	1	1	0	1	1	1	1	0	2
L-prolin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
L-serin a.	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
L-threonin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L-tryptophan a.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-CBZ-glyzyl-glyzyl-arginin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-Alanin a.	2	2	2	2	1	0	0	1	1	2
L-alanyl-L-arginin a.	1	2	1	2	1	0	0	1	1	2
L-alanyl-L-phenylalanyl-L-prolin a.	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1
L-alanyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-alanin a.	0	1	2	1	0	0	0	1	1	0
L-arginyl-L-arginin a.	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1
α-L-aspartyl-L-alanin a.	0	1	2	2	1	2	1	1	1	2
α-L-aspartyl-L-arginin a.	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
α-L-glutamyl-α-L-glutamic a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-L-glutamyl-L-histidin a.	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Glyzyl-L-alanin a.	2	1	1	2	0	0	2	0	1	2
Glyzyl-L-arginin a.	1	1	0	2	0	0	0	0	0	1
Glyzyl-L-tryptophan a.	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
L-histidyl-L-leuzyl-L-histidin a.	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
L-histidyl-L-serin a.	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
L-leuzyl-L-alanin a.	2	1	1	2	0	0	0	0	1	2
L-leuzyl-L-leuzyl-L-valyl-L-tyronyl-L-serin a.	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
L-lysyl-L-alanin a.	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
L-lysyl-L-lysin a.	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
L-phenylalanyl-L-arginin a.	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
L-phenylalanyl-L-prolin a.	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
L-phenylalanyl-L-prolyl-L-alanin a.	2	1	1	2	0	1	0	1	0	0
L-prolyl-L-arginin a.	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
L-seryl-L-methionin a.	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
L-valyl-L-tyrosyl-L-serin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-benzyl-L-alanin-4-methoxy a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-CBZ-arginyl-4-methoxy a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-azetyl-glyzyl-L-lysin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-histidyl-L-phenylalanin a.	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
L-lysyl-L-serin-4-methoxy a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leuzin a.	2	1	1	2	1	0	0	0	1	1
Valin a.	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Zystin a.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trypsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chymotrypsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	in vivo					in vitro				
	RH	T	ALT	BK	MM	RH	T	ALT	BK	H
ESTERASEN										
Esterase C4	2	2	2	2	2	1	0	1	2	2
Esterase C5	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1
Esterase C6	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1
Esterase C8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Esterase C9	2	2	2	2	1	1	0	1	1	2
Esterase C10	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2
Esterase C12	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2
Esterase C14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esterase C16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esterase C18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
API-ZYM										
Alkalische Phosphatase	2	1	2	2	0	2	1	2	2	2
Saure Phosphatase	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2
Phosphoamidase	2	1	0	0	0	1	1	1	0	2
γ -Glutamyltransferase	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
GLUKOSIDASEN										
β -Galaktosidase	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
β -Glukuronidase	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
β -Glukosidase	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0
α -Galaktosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Glukosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Mannosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Fukosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Azetyl- β -glukoaminidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Tabelle 2:

Ergebnisse des API-ZYM Tests mit den in vivo und in vitro gezüchteten Toxoplasmastämmen. Als Kontrolle wurden Mausemakrophagen (MM) und Hep2-Zellen (H) ausgetestet.

0 = negativ
1 = positiv
2 = hochpositiv
a. = arylamidase

Zusammenfassung

Die Enzymprofile von jeweils vier in vivo (Mausperitonealraum) und in vitro (Hep2-Zellen) gezüchteten Toxoplasmastämmen (RH-Wien, T, ALT, BK-Wien) wurden miteinander und mit jener ihrer Wirtszellen verglichen. Die Enzymprofile wurden mit Hilfe des API-ZYM Testsystems erhoben. Insgesamt wurden qualitativ und semiquantitativ 84 Enzyme der Klassen Amino-peptidasen, Esterasen und Glykosidasen getestet, wobei 46% der untersuchten Enzyme eine Übereinstimmung der einzelnen Toxoplasmastämme zwischen in vivo- und in vitro-Zucht zeigten. Es wurden sowohl Stamm-spezifische als auch für das Kulturverfahren spezifische Enzyme gefunden.

Schlüsselwörter *Toxoplasma gondii*, in vivo, in vitro, Enzymprofil, API-ZYM.

Summary

A comparative analysis of enzymatic profiles of differently cultivated Toxoplasmen

The enzymatic profiles of four in vivo (peritoneal cavities of mice) and in vitro (Hep2-cells) cultivated Toxoplasma strains (RH-Vienna, T, ALT, BK-Vienna) were compared to each other and with the profiles of their host tissues. The enzymatic profiling was carried out with the API-ZYM research kit. Altogether 84 enzymes of the classes aminopeptidases, esterases and glycosidases were qualitatively and semiquantitatively tested. 46% of the analyzed enzymes showed a correspondence between in vivo and in vitro cultivation of each Toxoplasma strain. Both enzymes specific for strains and enzymes specific for the cultivation technique were detected.

Key words *Toxoplasma gondii*, in vivo, in vitro, enzymatic profile, API-ZYM.

Literatur

1. BARNERT, G., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1989):
Isoenzym-Analysen zur Differenzierung von *Toxoplasma gondii* Isolaten.
Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie 11, 19-24.
2. BARNERT, G., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1988):
Isoenzyme studies on *Toxoplasma gondii* isolates using Isoelectric Focusing.
Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Series A 268, 476-481.
3. BINKHORST, C. D.:
Toxoplasmosis, a clinical, serological and histo-pathological study with special reference to the eye manifestations.
Thesis, Leiden (1948), 82 pp.
4. DARDE, M. L., BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M. (1992):
Isoenzyme Analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications.
Journal of Parasitology 78, 786-794.
5. DARDE, M. L., BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M. (1990):
Comparison of isoenzyme profile of *Toxoplasma gondii* tachyzoites produced under different culture conditions.
Parasitology Research 76, 367-371.
6. HASSL, A., MANAFI, M., SOMMER, R., KUNDI, M., ASPÖCK, H. (1993):
Characterisation and check of identity of different strains of *Toxoplasma gondii* by enzymatic profiling.
Zentralblatt für Mikrobiologie (in press).
7. MANAFI, M., HASSL, A., SOMMER, R., ASPÖCK, H. (1992):
Enzymatic profile of *Toxoplasma gondii*.
Letters in Applied Microbiology 16, 66-68.
8. SABIN, A. B. (1941):
Toxoplasmic encephalitis in children.
J. Am. Med. Assoc. 116 (1941) 801-807.
9. SUZUKI, Y., CONLEY, F. K., REMINGTON, J. S. (1989):
Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strains of *Toxoplasma gondii*.
Journal of Infectious Diseases 159, 790-794.
10. WALDELAND, H., PFEFFERKORN, E. R., FRENKEL, J. K. (1983):
Temperaturesensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: Pathogenicity and persistence in mice.
Journal of Parasitology 69, 171-175.
11. WERNER, H., EGGER, I.:
Vergleichende Untersuchungen an zystenbildenden *Toxoplasma*-Stämmen. I. Mitteilungen: Über das Verhalten sog. schwach oder sog. avirulenter *Toxoplasma*-Stämme nach intraperitonealer und oraler Inokulation.
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A, 206 (1967), 259-266.

Korrespondenzadresse: Cand. biol. Christian Harmer
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria