

# Vergleich verschiedener Nährmedien zur Zucht von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur

Ch. Harmer, A. Hassl, H. Aspöck

**Einleitung** *Toxoplasma gondii* wird seit über 50 Jahren in der Zellkultur gezüchtet (3), häufig mit dem Ziel, große Mengen Trophozoiten in standardisierter Weise als Antigen für serologische Tests zu produzieren (6). Als Nährmedien für die Parasiten und die Wirtszellen wurden und werden Vollmedien verwendet, denen Serum, meist fötales Kälberserum (FCS), zugegeben werden müssen. Auch wir verwendeten früher zur Zucht von *Toxoplasma gondii* in vitro das Minimum Essential Medium (MEM) mit 2% FCS (6, 7). Im FCS konnten wir jedoch gelegentlich anti-parasitäre Aktivitäten beobachten, die vermutlich auf diaplazentar übertragene bovine Antikörper zurückzuführen waren und die die Vermehrung der Toxoplasmen erheblich behinderten (unpublizierte Beobachtung). Um einerseits dieses Problem zu umgehen und um andererseits die in vitro Kultivierung im kleinen Maßstab effektiv zu gestalten, versuchten wir zuerst ein serumfreies (4, 5) und dann zusätzlich auch noch ein CO<sub>2</sub>-unabhängiges Kulturverfahren zu entwickeln.

In dieser Studie sollte geklärt werden, ob durch Mischungen von unterschiedlichen Kulturmedien eine serumfreie und CO<sub>2</sub>-unabhängige in vitro Zucht von *Toxoplasma gondii* in humanen Larynxkarzinomzellen (HEp-2) etabliert werden kann und, wenn ja, welches das rentabelste Mischungsverhältnis ist.

**Material und Methoden** *Toxoplasma gondii* (Stamm: RH-Europa) wurde mit gleichem technischen Verfahren jedoch mit unterschiedlichen Nährmedien in HEp-2 Zellen (CCI 23, American Type Culture Collection; Rockville, USA) gezüchtet. Als Nährmedium für die Zucht der Toxoplasmen wie auch der Wirtszellen testeten wir im Vergleich:

- MEM (Flow Lab., Irvine, USA) + 2% FCS (Flow Lab.);
- das PC-1 Medium (Ventrex, Portland, USA) mit einem Zusatz von 2% Serumersatz;
- das SF-900 Medium (Gibco, Gaithersburg, USA);
- das CG-Medium (Sebak, Suben, A);
- das CO<sub>2</sub>-Independent Medium (Gibco);
- Mischungen von PC-1 Medium und CO<sub>2</sub>-Independent Medium im Verhältnis 3 : 1, 1 : 1 und 1 : 3;
- Mischungen von SF-900 Medium und CO<sub>2</sub>-Independent im Verhältnis 3 : 1, 1 : 1 und 1 : 3;
- Mischungen von CG-Medium und CO<sub>2</sub>-Independent im Verhältnis 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3;
- eine Mischung von QBSF-Medium (Sigma, St. Louis, USA) und CO<sub>2</sub>-Independent im Verhältnis 1 : 1;
- eine Mischung von SFH-Medium (Sigma) und CO<sub>2</sub>-Independent Medium im Verhältnis 1 : 1.

Jedes Nährmedium wurde mit 1% L-Glutamin (Gibco) und 1% Antibiotikum/Antimykotikum (Gibco) versetzt.

Die Toxoplasma-Trophozoiten wurden 48 Stunden nach der i. p. Verimpfung in eine SPF-Maus (weiblich, 20 g, OF 1 Swiss, Versuchstieranstalt Himberg) durch Spülen des Peritonealraumes geerntet (4, 5, 6, 7). Die geernteten Toxoplasmen wurden zehn Minuten bei 375 g zentrifugiert, in sterile Kochsalzlösung aufgenommen und so aufbewahrt.

Die HEP-2 Zellen und die Parasiten wurden in 150 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Costar, Cambridge, USA) bei 37° C und bei Bedarf, in einer 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre gezüchtet (4, 6, 7). Zum Ablösen der HEP-2 Zellen vom Boden der Kulturflasche verwendeten wir 0,25% Trypsin (Gibco) (6, 7). Die frisch trypsinisierten Zellen wurden mit den Toxoplasmen im Verhältnis 1 : 1 (je 10<sup>6</sup>) versetzt. 24 Stunden nach der Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um extrazelluläre, nicht invasionsfähige Toxoplasmen abzuschöpfen. Nach weiteren 24 Stunden konnten die nun schon wieder frei gewordenen Parasiten geerntet werden. Die Toxoplasmen aus einer Kulturflasche wurden zweimal durch Zentrifugation (375 g, 5 Minuten) in steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in 2 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Toxoplasmen in einer Bürker-Türk Zählkammer ausgezählt. Jedes Nährmedium wurde fünfmal getestet und die Ergebnisse wurden gemittelt.

Die verschiedenen Nährmedien wurden immer unter standardisierten Bedingungen getestet (4, 6, 7), sodaß eine Effizienz berechnet werden konnte. Die Effizienz entstand aus einer Division des Kostenfaktors durch die Anzahl der gewonnenen Toxoplasmen. Der Kostenfaktor bezieht sich ausschließlich auf die Kosten des Kulturmediums, wobei das billigste Medium als Basis (Faktor 1) diente.

**Ergebnisse** Die Ergebnisse unserer Studie von insgesamt 16 Medien und Medienmischungen wurden in Vermehrungsraten, Kostenfaktoren und den Produkten aus Kostenfaktor durch Vermehrungsrate, der Effizienz angegeben. Sie werden in Tabelle 1 dargestellt.

Die größte Toxoplasmenvermehrung wurde bei Verwendung des PC-1 Mediums erzielt, während es mit dem CO<sub>2</sub>-Independent Medium ohne Serumzusatz zu keiner Toxoplasmenvermehrung kam. Alle serumfreien bzw. CO<sub>2</sub>-unabhängigen Medien und deren Mischungen, zeigten zwar teilweise gleich gute Vermehrungsraten, wie das Standardmedium (MEM + 2% FCS), hatten jedoch auf Grund ihres höheren Preises eine höchstens 50%ige Effizienz. Für eine serumfreie und CO<sub>2</sub>-unabhängige Zucht von *Toxoplasma gondii* zeigte eine Mediummischung, des PC-1 Mediums mit dem CO<sub>2</sub>-Independent Medium im Verhältnis 1 : 1, die beste Effizienz.

**Diskussion** Die Kultivierung von *Toxoplasma gondii* in vitro erfolgte beinahe ausschließlich in Nährmedien mit Serumzusatz (meistens FCS) (8, 9). Bei dieser Züchtungsmethode können verschiedene Faktoren, wie die Qualität des fötalen Kälberserums, die Zucht des Parasiten erheblich beeinflussen.

Daher haben wir in einem ersten Schritt versucht, eine serumfreie Zucht von *Toxoplasma gondii* zu entwickeln; ein Ziel, das auch schon vor sieben Jahren erreicht wurde (7). Jedoch mußte man die zu dieser Zeit im Handel erhältlichen serumfreien Medien (Shite und Iscove's Medium) mit speziellen Wachstumsfaktoren anreichern, um eine Vermehrung des Parasiten zu erzielen (7). Dieses Verfahren erwies sich als teuer und kompliziert, außerdem erhielt man eine wesentlich geringere Ausbeute an Toxoplasmen als mit dem Standardnährmedium.

Dies änderte sich mit dem Einsatz des serumfreien PC-1 Mediums. Damit konnte sogar eine bessere Ausbeute an Parasiten erzielt werden als mit dem Standardnährmedium (5). Neben diesem etablierten serumfreien Medium wurden in dieser Studie noch zwei weitere serumfreie

Tabelle 1:

Vergleich von verschiedenen Nährmedien bei einer 48stündigen in vitro Kultivierung von *Toxoplasma gondii* in HEp-2 Zellen.

Medium	Ver- mehrun- gs- rate (1)	Kosten- faktor (2)	Effizienz (3)
MEM + 2% FCS	39,70	1,00	25
PC-1	40,25	3,01	75
SF-900	23,90	1,48	62
CG	19,30	1,58	82
CO <sub>2</sub> -Independent	2,01	1,10	547
SF-900 + CO <sub>2</sub> -Ind. 3 : 1	20,90	1,38	66
SF-900 + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 1	19,80	1,29	65
SF-900 + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 3	14,60	1,19	81
CG + CO <sub>2</sub> -Ind. 3 : 1	16,80	1,46	87
CG + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 1	15,30	1,32	86
CG + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 3	8,60	1,22	142
PC-1 + CO <sub>2</sub> -Ind. 3 : 1	38,90	2,51	65
PC-1 + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 1	36,50	2,05	56
PC-1 + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 3	18,40	1,50	82
SFH + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 1	21,40	1,49	70
QBSF + CO <sub>2</sub> -Ind. 1 : 1	16,50	1,60	97

(1) = Vervielfachung des Parasiten  
48 Stunden p. i.

(2) = Preis des Mediums / Preis des  
billigsten Mediums

(3) = Kostenfaktor pro 1000facher  
Multiplikation des Parasiten

schung des PC-1 Mediums mit dem CO<sub>2</sub>-Independent konnten wir bei den Mischungsverhältnissen 3 : 1 und 1 : 1 annähernd gleiche Vermehrungsraten der Toxoplasmen erzielen wie mit dem Standardmedium. Außerdem erreichten wir durch diese Medienmischung auch unser Ziel, neben einer serumfreien Züchtungsmethode auch eine CO<sub>2</sub>-unabhängige Zucht des Parasiten etabliert zu haben.

Die Effizienzstudie zeigt, daß zwar das MEM-Medium mit fötalem Kälberserum am billigsten ist, daß jedoch unter der Bedingung einer serumfreien und CO<sub>2</sub>-unabhängigen Zucht die geringsten Kosten pro geerntetem Parasiten bei einer 1 : 1 Mischung des PC-1 Mediums mit dem CO<sub>2</sub>-Independent Medium anfällt.

Nicht in diese Studie einbezogen haben wir die Möglichkeit, die Medien durch Pufferung mit NaHCO<sub>3</sub> begasungsunabhängig zu machen (1, 6). Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die Pufferung durch Speisesoda zu einer Instabilität des pH-Wertes führt (1). Dadurch verschiebt sich der pH-Wert des Nährmediums in den alkalischen Bereich, und es besteht die Gefahr, daß das Nährmedium für die Kultivierung von *Toxoplasma gondii* in vitro ungeeignet wird (1, 2).

Nach der Etablierung der serumfreien und CO<sub>2</sub>-freien Zucht von *Toxoplasma gondii* sollen zukünftig jedoch weitere im Handel befindliche Nährmedien auf ihre Verwendbarkeit in unserem Modell getestet werden, um die Kultivierungskosten der in vitro gezüchteten Toxoplasmen weiter reduzieren zu können.

### Zusammenfassung

Es wurden eine serumfreie und CO<sub>2</sub>-unabhängige Methode der in vitro Kultivierung von *Toxoplasma gondii* in HEp-2 Zellen entwickelt, die auf der Verwendung einer Nährmedienmischung von PC-1 Medium und CO<sub>2</sub>-Independent Medium basiert. Dieses Verfahren führt zu hohen Ausbeuten an reinen Toxoplasmen bei vermindertem Arbeits- und Investitionsaufwand.

### Schlüsselwörter

*Toxoplasma gondii*, Kultivierung in vitro, serumfrei, CO<sub>2</sub>-Unabhängigkeit.

Medien, das CG- und das SF-900 Medium getestet. Allerdings konnten bei der Anwendung dieser beiden Medien nur geringe Vermehrungsraten des Parasiten erzielt werden (Tab. 1). Bei allen diesen Nährmedien erfolgte die Zucht von *Toxoplasma gondii* in einer 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Mit Hilfe des CO<sub>2</sub>-Independent Medium erhofften wir neben einer serumfreien Zucht auch eine CO<sub>2</sub>-unabhängige Zucht etablieren zu können. Wir mußten jedoch feststellen, daß bei Verwendung des CO<sub>2</sub>-Independent Mediums ohne den vorgeschriebenen Serumzusatz es weder zu einer Vermehrung der Toxoplasmen noch zu einer der Wirtszellen kam. Wir versuchten daher, die serumfreien Medien mit dem CO<sub>2</sub>-Independent Medium zu mischen, um so die Vorteile der Medien zu kombinieren.

Aus Tabelle 1 kann man entnehmen, daß bei der Mischung des CG Mediums bzw. SF-900 Mediums mit dem CO<sub>2</sub>-Independent Medium die Replikationsraten der Toxoplasmen wesentlich geringer sind, als mit dem Standardmedium. Auch durch die Mischungen des SFH-Mediums und des QBSF-Mediums mit dem CO<sub>2</sub>-Independent Medium erreichten wir keine ausreichende Vermehrung des Parasiten (Tab. 1). Beim Einsatz einer Mi-

**Summary** *A comparison of different media for the cultivation of Toxoplasma gondii in tissue culture*

A technique for a serumfree and CO<sub>2</sub> independent cultivation of *Toxoplasma gondii* in HEP-2 cells was developed basing on the use of a mixture of PC-1 medium and CO<sub>2</sub>-Independent medium. It apparently represents a considerable improvement of the cultivation of *Toxoplasma gondii* in vitro because of decreasing investment and expenditure.

**Key words** *Toxoplasma gondii*, in vitro-cultivation, serumfree, CO<sub>2</sub>-Independent.

**Literatur**

1. BATTISTA, J. P., WEISS, A. S. (1991):  
Development and application of a carbon dioxide independent medium.  
Focus 13/3, 110-114.
2. DVORAK, A. J., HOWE, C. L. (1977):  
Toxoplasma gondii-vertebrate cell interactions. I. The influence of bicarbonate Ion, CO<sub>2</sub>, pH and host cell culture age on the invasion of vertebrate cells in vitro.  
J. Protozool. 24 (3), 416-419.
3. GUIMARAES, F. N., MEYER, R. H. (1955):  
Electron microscopic observations of Toxoplasma grown in tissue culture.  
Parasitology 45, 449.
4. HARMER, Ch., SOMMER, R., HASSL, A., MANAFI, M., ASPÖCK, H. (1993):  
Vergleichende Untersuchungen über Enzymmuster unterschiedlich kultivierter Toxoplasmen.  
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 15, 113-118.
5. HASSL, A., ASPÖCK, H. (1992):  
In vitro propagation of Toxoplasma gondii in PC-1 serum-free medium.  
Folia Parasitologica 39, 285-286.
6. 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.
7. HERMENTIN, K., AUER, H., ASPÖCK, H. (1987):  
In vitro cultivation of Toxoplasma gondii under defined serum free conditions.  
J. Parasitology 73 (6), 1276-1277.
8. HONN, K. V., SINGLEY, J. A., CHAVIN, W. (1975):  
Fetal bovin serum: A multivariate standard.  
Proc. Sos. Exptl. Biol. Med. 149, 344-347.
9. OLMSTED, C. A. (1967):  
A physio-chemical study of fetal calf sera used as tissue culture nutrient correlated with biological tests for toxicity.  
Exp. Cell Res. 48, 283-299.

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