Zeitschrift: Acta Tropica

Herausgeber: Schweizerisches Tropeninstitut (Basel)

Band: 19 (1962)

Heft: 4

Artikel: Miscellaneum : Tiefkühl-Konservierung von "Trypanosoma cruzi" in einem der natürlichen Überträger ("Triatoma infestans")

Autor: Flück, V.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-311034

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 20.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Miscellaneum.

Tiefkühl-Konservierung von *Trypanosoma cruzi* in einem der natürlichen Überträger (*Triatoma infestans*).*

Von V. FLÜCK.
Schweizerisches Tropeninstitut, Basel.

Einleitung und Problemstellung.

Die Konservierung von Mikroorganismen in gefrorenem Zustand hat der Labortechnik manche interessante Möglichkeit eröffnet. Blutparasiten, wie beispielsweise Trypanosomen oder Spirochäten, müssen üblicherweise in Labortieren gehalten oder auf künstlichen Nährböden gezüchtet werden, was einen beachtlichen Aufwand an Arbeit und Tierverschleiß erfordert. Das oftmalige Überimpfen eines Parasiten, das erforderlich ist bei seiner Stammhaltung auf Labortieren, kann zu einer Veränderung seiner Virulenz oder ganz allgemein zu einer Veränderung seiner biologischen Eigenschaften führen. Oftmals ist auch der Transport von Mikroorganismen im gefrorenem Zustand recht vorteilhaft oder überhaupt erst möglich, gegenüber dem Transport in Labor- bzw. Wirtstieren.

Zur Konservierung von Trypanosomen bei tiefen Temperaturen wurden von WEINMANN & MCALLISTER (1947), von POLGE & SOLTYS (1957) und von MÜHLPFORDT (1960) erfolgreiche Methoden entwickelt. Die von uns im Prinzip nachgearbeiteten Methoden von MÜHLPFORDT bewährten sich am besten.

Im Verlaufe unserer Arbeiten am Schweizerischen Tropeninstitut erschien es wünschenswert zu untersuchen, ob *Trypanosoma cruzi* auch in *Triatoma infestans* mittels tiefer Temperaturen konserviert werden kann, nachdem wir mit der bereits erwähnten Methode festgestellt hatten, daß *T. cruzi* im Mäuseblut ohne Beeinträchtigung seiner Virulenz bei tiefen Temperaturen sich über Monate hinweg halten läßt.

Im Hinblick auf die Erhaltung der Virulenz von *T. cruzi* in seinem natürlichen Überträger *(Triatoma infestans)* war es hier von besonderem Interesse, die Stammhaltung durch Anwendung tiefer Temperaturen zu vereinfachen.

Material und Methode.

Der von uns verwendete Stamm von *T. cruzi* trägt die Bezeichnung «Caracas II» und wurde im Mai 1957 von Dr. PIFANO, Caracas, auf Mäuse überimpft und von Frau Dr. HERBIG an unser Institut gebracht. Die Stammhaltung erfolgte cyclisch auf Reduviiden *(Triatoma infestans* bzw. *Rhodnius prolixus)* und Kleinsäugern (Mäuse bzw. Meerschweinchen). Die Wanzen werden jeweils infiziert, indem man sie auf mit *T. cruzi* infizierten Mäusen oder Meerschweinchen, deren Blut gut positiv ist, saugen läßt. Die Infektion eines Kleinsäugers erfolgt durch i.p. Applikation von 0,1—0,3 ml aus einer Aufschwemmung von 3—4 im Mörser mit 3% Natrium-Citrat zerstoßenen gut infizierten Reduviiden, oder es wird mit einer Injektionsspritze der infizierte Kot mehrerer Reduviiden gesammelt, mit Natrium-Citrat verdünnt und davon ebenfalls 0,1—0,2 ml i.p. in Kleinsäuger appliziert.

Der Kot der zum Tiefgefrieren vorgesehenen Wanzen wurde bei der 2. Fütterung auf Trypanosomen untersucht und bei genügender Anzahl von infektiösen, metacyclischen Formen wurden je 2—3 Wanzen lebend in Kunststoff- bzw. Glastuben gebracht. Erstere sind 60 mm lang, haben 18 mm lichte Weite und weisen einen am Röhrchen angehängten Deckel auf, der durch Aufdrücken

* Herrn Prof. Dr. RUDOLF GEIGY gewidmet mit herzlichen Glückwünschen zum 60. Geburtstag.

dicht schließt. Diese Tuben haben den Vorteil unzerbrechlich zu sein, außerdem lassen sie sich während der Lagerung in der Kühltruhe zur Kontrolle oder Materialentnahme öffnen und wieder verschließen. Es mußten gut schließende Tuben verwendet werden; wenn trotzdem einmal Kühlmedium d. h. Alkohol eindrang, so wurde bei der Entnahme aus der Kühltruhe der Röhrcheninhalt (Blut oder Wanzen) vor dem Auftauen mit eiskaltem destillierten Wasser ausgewaschen; das Angehen der Infektion erlitt dadurch keine Einbuße.

Die von uns verwendeten Glastuben haben 8 mm lichte Weite und werden nach dem Einfüllen der Wanzen zugeschmolzen.

Als Behälter für das Tiefkühlgemisch verwendeten wir Lagerconservatoren (Dewar-Gefäß) der Firma «Carba», Basel. Zu 4—5 Liter 95% Alkohol wurden ca. 3—4 kg Trockeneis zugegeben, wodurch im Kühlbehälter ein Medium von — 79° C erreicht wurde.

Die Zugabe von jeweils 2 ml physiologischer Kochsalz-Glyzerin-Lösung (70% physiologische Kochsalzlösung + 30% Glyzerin) pro Kunststoff- oder Glastube erfolgte im Sinne von POLGE, SMITH & PARKES (1948), die feststellten, daß Glyzerin bei Spermatozoen eine Schutzwirkung ausübt gegenüber tiefen Temperaturen. Dasselbe beobachteten verschiedene Forscher später auch bei der Anwendung tiefer Temperaturen gegenüber andern Mikroorganismen (SMITH, 1954).

Das Auftauen des Tubeninhaltes erfolgte durch Eintauchen in ein Wasserbad von + 40° C. Nach dem Auftauen der Wanzen wurden Beine, Flügel und Thorax weggeschnitten und die Abdomen von 2—3 Wanzen unter Zugabe von 0,5—1 ml Natrium-Citrat im Mörser zerstoßen. Von dieser Aufschwemmung wurden pro Maus 0,2—0,3 ml i.p. appliziert.

Versuchsvarianten.

Es wurden folgende Verfahren zur Tiefgefrierung von infizierten *Triatoma infestans* ausprobiert:

TABELLE

Ergebnisse der Infektion auf weißen Mäusen mit Aufschwemmungen aus tiefgefrorenen Wanzen, enthaltend infektiöse metacyclische Formen von *T. cruzi*. Kontrolle auf Trypanosomen durch Blutentnahme am Mausschwanz.

	Zusatz	Kühlung	Anzahl Tage bei −79°C	
			55	185
Glastuben	physiol. NaCl-Glyzerin	sofort — 79° C	positiv	negativ
		stufenweise	*	positiv
Glastuben	ohne	sofort — 79° C	*	negativ
		stufenweise	*	negativ
Kunststofftuben	physiol. NaCl-Glyzerin	sofort — 79° C	positiv	negativ
		stufenweise	positiv	*
Kunststofftuben	ohne	sofort — 79° C	positiv	*
		stufenweise	positiv	positiv
Kontrolle	ohne	keine	positiv	positiv

* = nicht geprüft.

1. Wanzen in Glastuben.
2. Wanzen in Kunststofftuben ohne Zusatz.
3. Wanzen in Glastuben mit physiologischem Kochsalz-Glyzerin-Zusatz.
4. Wanzen in Kunststofftuben mit physiologischem Kochsalz-Glyzerin-Zusatz.

a) Verfahren 1—4 wurden nach Verschluß der Tuben sofort in ein Alkohol-Trockeneis-Gemisch von — 79° C gebracht.

b) Die Tuben wurden stufenweise tiefgekühlt; während 10 Min. von Raumtemperatur auf 0° C, dann während 10 Min. von 0° C bis — 15° C und weitere 10 Min. von — 15° C bis — 79° C.

Versuchsdurchführung und Ergebnisse.

Es sind nicht infizierte ♂ und ♀ Wanzen zum Saugen auf Mäuse gebracht worden, die 20 Tage zuvor mit *T. cruzi* infiziert worden waren. 4 Wochen später bei der zweiten Fütterung wurde der Wanzenkot auf metacyclische Formen untersucht und als ausreichend positiv befunden. Die Wanzen wurden hierauf tiefgekühlt. Es wurde dabei stets darauf geachtet, daß in jeder Versuchsvariante nur Wanzen vom gleichen Infektionstag verwendet wurden, in denen sich der Erreger während 4 Wochen hatte entwickeln können, um möglichst gleichartige Bedingungen zu schaffen.

Diskussion der Ergebnisse.

Mit stufenweise tiefgefrorenen, metacyclischen Formen von *T. cruzi* konnten nach halbjähriger Lagerung bei — 79° C Mäuse infiziert werden. Bereits 20 Tage nach der Infektion wurden Trypanosomen im peripheren Blut der Mäuse festgestellt.

Nach 55tägiger Lagerung bei — 79° C zeigte sich noch kein Unterschied im Infektionserfolg der verschiedenen von uns angewandten Gefrierverfahren. Das schonungsvollere, stufenweise Tiefgefrieren bedingte, wie die halbjährigen Versuche zeigen, eine geringere Absterberate. Das Hinzufügen von physiologischer Kochsalz-Glyzerin-Lösung ist bei der Verwendung von Kunststofftuben nicht erforderlich, sondern nur bei Glastuben. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Kunststoff ein schlechterer Wärmeleiter ist als Glas und dadurch, ähnlich dem Glyzerin, einen Schutz ausübt auf das einzufrierende Material bzw. auf dessen Auftauen.

Wir haben mit Absicht nur einen direkten Nachweis der Trypanosomen im peripheren Blut versucht. Es wäre denkbar, daß andere Methoden, z. B. mehrmaliges Saugenlassen von Wanzen auf den in unsern Prüfungen negativen Mäusen (Xenodiagnose), einen Nachweis der Infektion innerhalb der 20tägigen Inkubationszeit erbracht hätte. Es war unser Ziel, für die Labortechnik eine einfache und sichere Methode zu schaffen zur Stammhaltung von *T. cruzi* in einem ihrer natürlichen Überträger bei nachfolgender guter Übertragbarkeit auf Labortiere.

Literaturverzeichnis.

MÜHLPFORDT, H. (1960). Der Einfluß tiefer Temperaturen auf Protozoen. — Z. Tropenmed. Parasit. *11,* 481.

POLGE, C., SMITH, A. V. & PARKES, A. S. (1949). Revival of spermazoa after vitrification and dehydration at low temperatures. — Nature *164,* 666.

POLGE, C. & SOLTYS, M. A. (1957). Preservation of Trypanosomes in the frozen state. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *51,* 519.

SMITH, A. V. (1954). Biological application of freezing and drying. — New York: Academic Press Inc.

WEINMANN, D. & MCALLISTER, J. (1947). Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence: observations on the storage of helminths and leptospiras. — Amer. J. Hyg. *45,* 102.