Zeitschrift: Acta Tropica

Herausgeber: Schweizerisches Tropeninstitut (Basel)

Band: 25 (1968)

Heft: 4

Artikel: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von "Trypanosoma cruzi" : unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklungsformen im Überträger "Rhodnius prolixus"

Autor: Brack, Christine

Kapitel: IV: Versuche mit Einzell-Kulturen in vivo und in vitro

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-311542

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: 04.08.2025

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

Was die Verteilung der anderen Zellorganellen betrifft, so haben unsere Untersuchungen gezeigt, daß schon innerhalb einer Entwicklungsform beträchtliche Variationen möglich sind, denn die Ausbildung vieler Organellen ist vom Milieu, vom Alter der Zellen und vom Metabolismus abhängig. Das Material, das für die elektronenmikroskopischen Präparate aus dem Wanzendarm gewonnen wird, ist in dieser Hinsicht sehr heterogen. Die relativ geringen Unterschiede zwischen den drei Formen gestatten daher keine endgültige Aussage.

Man muß sich auch immer bewußt bleiben, daß in der Elektronenmikroskopie mit fixierten Objekten gearbeitet wird. Ein dynamischer Prozeß wie die Umwandlung und Neuorganisation einer Trypanosomenzelle läßt sich nicht allein anhand fixierter Dünnschnittpräparate festlegen. Aus diesem Grund sollen nun noch einige Experimente angeführt werden, in denen die Entwicklung einzelner Formen in Einzell-Kulturen untersucht wurde.

IV. Versuche mit Einzell-Kulturen in vivo und in vitro

A. Arbeitsmethoden

1. Anordnung der Versuche

Bei der Diskussion des zweiten Kapitels dieser Arbeit sind wir zur Ansicht gekommen, daß die sphaeromastigoten Formen Übergangsstadien zur epimastigoten oder zur trypomastigoten Form sein könnten. Aus dem vorangegangenen Kapitel über die Ultrastruktur der Entwicklungsformen ist kein eindeutiger Beweis für oder gegen diese Hypothese hervorgegangen. Deshalb wollen wir nun noch versuchen, dem Problem von einer anderen Seite her etwas näher zu kommen.

In diesen Experimenten geht es darum, isolierte epimastigote, trypomastigote und sphaeromastigote Formen in Einzell-Kulturen im Wanzendarm und in hängenden Tropfen zu züchten und dort ihre weitere Entwicklung zu verfolgen. Erwartet wird im günstigsten Fall Wachstum, Vermehrung und eventuell Umwandlung bei der sphaeromastigoten und der epimastigoten Form. Die metacyclischen Trypanosomen aber, die sich nie teilen und sich im Wanzendarm auch nicht mehr verändern, dienten uns zu Kontrollbeobachtungen.

2. Isolierung einzelner Trypanosomenformen

Zum Isolieren einzelner Parasiten verwendeten wir die Bakterien-Isolationsmethode von Lederberg (nach DIETRICH, 1955).

Man überschichtet einen Objektträger mit Paraffinöl und setzt mit einer Kapillarpipette unter diese Ölschicht kleine Tröpfchen einer aus Wanzendärmen gewonnenen Trypanosomensuspension. Die Tröpfchen sind dadurch vor dem Austrocknen geschützt. Unter dem Mikroskop werden die Tröpfchen kontrolliert und diejenigen, die nur einen Erreger enthalten (epi-, trypo- oder sphaeromastigote Form) werden mit einer Mikropipette aufgenommen und anschließend in Wanzen oder in Nährlösung gebracht.

3. Infektion von Wanzen

Nymphenstadien von *Rhodnius prolixus* wurden auf den Rücken gelegt und mit einer Kapillarpipette die isolierte Trypanosomenform in einem Tropfen physiologischer Natriumcitratlösung in die Rektalampulle eingeführt (klistiert). Die Tiere wurden nachher einzeln in Glastuben gehalten. Zur Kontrolle haben wir den Wanzen nach 1, 2, 3, 4, 6 und 8 Wochen ein Tröpfchen Na-citrat in die Rektalampulle gespritzt, wieder herausgezogen und unter dem Mikroskop auf Parasiten untersucht. Wenn Tiere im Verlauf der Versuche starben, wurden sie seziert und ihr Darminhalt kontrolliert.

4. Deckglas-Einzell-Kulturen

Für diese Versuche haben wir ein flüssiges, klares Nährmedium (leicht abgeändert nach ZELEDON, 1959) verwendet, worin die Entwicklung der Trypanosomen unter dem Mikroskop verfolgt werden kann.

Nährlösung: 3,7 g Brain Heart Infusion (Difco) werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und 10 ml haemolysiertes (gefrorenes) Rinderblut zugegeben. Die Flüssigkeit wird 2—3mal aufgekocht, durch ein Papierfilter filtriert und autoklaviert (20 Min. 1,5 m^3/cm). Zur Verhütung von Verunreinigung durch Mikroorganismen wurden der Nährlösung Penicillin (300 i.E./ml) und Streptomycin (0,004 g/ml) zugesetzt.

In hängende Tropfen von 0,005 ml Nährlösung brachte man je eine isolierte Trypanosomenform. Die Kulturen wurden bei 24° C inkubiert und ein- bis zweimal täglich unter dem Mikroskop beobachtet. Kontrollkulturen zur Beurteilung des Nährmediums sind mit einer größeren Anzahl von Parasiten beimpft worden (ca. 100 bis 200 Zellen).

B. Resultate

1. Einzell-Kulturen im Wanzendarm

Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

TABELLE 1

Klistierte Trypanosomenform	Anzahl Wanzen	davon positiv
Epimastigote Form	44	0
Sphaeromastigote Form	37	1
Trypomastigote Form	23	0

In der ersten Gruppe von Versuchstieren, die mit epimastigoten Formen klistiert worden waren, konnte nie eine Vermehrung der Parasiten beobachtet werden.

Bei den mit metacyclischen trypomastigoten Formen infizierten Wanzen waren keine positiven Resultate zu erwarten. Es konnten dann auch nie Trypanosomen nachgewiesen werden.

Ein einziges positives Ergebnis war aus der dritten Gruppe zu verzeichnen. Dabei handelte es sich um eine Wanze, die mit einer sphaeromastigoten Form infiziert worden war. Nach 42 und auch nach 60 Tagen konnten in einer Probe aus dem Enddarm verschiedene Entwicklungsformen beobachtet werden: kurze und lange epimastigote sowie metacyclische trypomastigote Formen.

Daß von den 37 angesetzten Versuchen der 3. Gruppe nur einer positiv ausfiel, heißt noch nicht, daß die übrigen sphaeromastigoten Stadien nicht auch die Fähigkeit besitzen, sich zu vermehren und zu anderen Formen zu evoluieren.

Die Ursache der geringen Ausbeute muß wahrscheinlich in der Versuchsanordnung gesucht werden. Die Methode schließt verschiedene Fehlerquellen ein. Erstens bestehen viele Gelegenheiten, bei denen die isolierte Zelle beschädigt werden oder verlorengehen kann (Aufsaugen des Tröpfchens, Ausblasen der Pipette etc.). Zweitens kann es vorkommen, daß die Wanze sofort wieder die klistierten Trypanosomen mit dem Kot ausscheidet. Drittens ist die Wahrscheinlichkeit, jeweils bei der Kontrolle eines kleinen Kottröpfchens aus der Rektalampulle auf eventuell vorhandene Trypanosomen zu stoßen, sehr klein. Es ist deshalb sehr wohl möglich, daß nicht alle positiven Resultate erfaßt worden sind.

2. Einzell-Kulturen *in vitro*

Tabellen 2 und 3 geben eine Übersicht über die Resultate. Dazu wurden folgende Abkürzungen verwendet:

S	sphaeromastigote Form
Ek	kurze epimastigote Form
El	lange epimastigote Form
T	metacycl. trypomastigote Form
Tlg	Teilungsstadium
+	Form unverändert, lebend
—	Form tot

TABELLE 2

Stadium	Anzahl Kulturen	Überlebende nach n Tagen						Umwandlung od. Vermehrung in dieser Zeit
		1	2	3	4	5	6	
S	87	47	20	10	7	4	4	15*
E	72	23	3	2	0	0	0	3*

* Detailliertes Protokoll siehe Tabelle 3.

In den wenigsten Kulturen (Tröpfchen) waren während mehr als 2—3 Tagen lebende Formen festzustellen; vor allem die epimastigoten Stadien starben relativ rasch ab. In den Kontrollkulturen, die mit vielen Trypanosomen beimpft worden waren, konnten über mehrere Wochen normales Wachstum und Vermehrung der Zellen beobachtet werden[3]. Das Nährmedium scheint also nicht ungünstig zu sein. Es ist aber denkbar, daß Einzell-Kulturen von *T. cruzi* schlecht angehen, weil gewisse Stoffwechselprodukte oder Faktoren von abgestorbenen Zellen notwendig sind für ein Wachstum, und daß vor allem eine Umwandlung der Trypanosomen nur möglich ist in Gegenwart mehrerer, sich gegenseitig beeinflussender Zellen. Es ist dies eine Erscheinung, die auch bei anderen Mikroorganismen angetroffen wird (DIETRICH, 1955).

Wenn wir die positiven Resultate überblicken, können wir immerhin feststellen, daß sich vor allem die sphaeromastigoten Formen vermehrten und sich zum Teil zu epimastigoten, in einem Fall zu einer trypomastigoten Form entwickelten. In keinem einzigen Tröpfchen wurde hingegen ein Übergang von einer epimastigoten zur metacyclischen Form beobachtet. Nur in einer Kultur entstand aus einer kurzen epimastigoten eine sphaeromastigote Form (vgl. Stadium i im Schema des Entwicklungszyklus, Fig. 1).

[3] Interessanterweise ist eine Kultur noch jetzt (nach mehr als 8 Monaten) gut positiv. Die Nährlösung ist nie gewechselt worden.

TABELLE 3

Stadium	6 Std.	12 Std.	24 Std.	48 Std.	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
S	Tlg	Tlg + S	—	—	—	—	—	—	—
S	+	Ausrollf.	—	—	—	—	—	—	—
S	+	+	Ek	—	—	—	—	—	—
S	T	+	+	—	—	—	—	—	—
S	Ek	+	—	—	—	—	—	—	—
S	Tlg	+	2 S	+	—	—	—	—	—
S	2 S	+	+	—	—	—	—	—	—
S	+	Ek	1 Ek	2 Ek	1 S	+	+	+	—
			1 El	1 El	1 El	+	+	+	—
S	+	+	Tlg	+	2 S	+	+	—	—
S	+	+	+	2 S	+	+	+	1 S	—
S	+	+	Tlg	4 S	+	3 S	+	2 S	—
						1 Ek	+	1 Ek	—
S	+	+	Tlg	2 S	+	+	—	—	—
S	+	Ek	+	+	+	+	—	—	—
S	+	Tlg	Tlg	+					
		1 S	1 S	+	+	—	—	—	—
			3 Ek	2 Ek	—	—	—	—	—
S	+	Tlg	2 S	+	+	1 S	+	—	—
Ek	Tlg	2 Ek	—	—	—	—	—	—	—
Ek	+	1 Ek	2 S	1 S	—	—	—	—	—
		1 S							
Ek	El	+	+	—	—	—	—	—	—

3. Diskussion

Von allen isolierten Entwicklungsstadien haben sich nur die sphaeromastigoten und einige wenige kurze epimastigote Formen durch Zweiteilung vermehrt. Aus den sphaeromastigoten Formen entwickelten sich oft epimastigote, je einmal im Wanzendarm und in Kultur auch metacyclische trypomastigote Formen.

Sphaeromastigote Formen können vermutlich auch durch Verkürzung aus jungen, noch differenzierungsfähigen epimastigoten Stadien entstanden sein. Insofern könnte man also von einem indirekten Übergang von epimastigoten zu trypomastigoten Formen sprechen.

Unsere Versuche zeigten weiter, daß sich einzelne Trypanosomen nicht gut züchten lassen. Solange keine besseren Methoden bekannt sind, um die isolierten Parasiten länger am Leben zu erhalten, kann auch ihre volle Entwicklungsfähigkeit noch nicht erfaßt werden.

Es muß daher einer anderen Arbeit vorbehalten bleiben, Versuche mit Einzell-Kulturen in größerem Maßstab, vielleicht mit

einer besseren Nährlösung, durchzuführen. Dabei sollten andere Faktoren, die den Formenwechsel der Trypanosomen ebenfalls beeinflussen können, mit einbezogen werden. Temperatur, pH, sowie gewisse chemische Stoffe können einen entscheidenden Einfluß auf die Morphogenese der Trypanosomen ausüben (vgl. z. B. PIZZI & CHRISTEN, 1950; DEANE & KIRCHNER, 1963; STEINERT, 1965).

V. Literaturverzeichnis

AIKAWA, M. (1966). The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites: *Plasmodium fallax, P. lophurae,* and *P. cathemerium.* — Amer. J. trop. Med. Hyg. *15,* 449-471

ANDERSON, W. A. & ELLIS, R. A. (1965). Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi:* Flagellum, microtubules, and the kinetoplast. — J. Protozool. *12,* 483-499

BAKER, J. R. (1963). Speculations on the evolution of the family *Trypanosomatidae* Doflein, 1901. — Exp. Parasit. *13,* 219-233

BAKER, J. R. (1965). The evolution of parasitic protozoa. In: Evolution of parasites. Ed. A. Taylor. — Oxford: Blackwell Scientific Publications

BIRD, R. G., MOLLOY, J. O. & ORMEROD, W. E. (1966). Granules and tubules in the cytoplasm of the sleeping sickness trypanosomes, an electron microscope study. — Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. *60,* 753-760

BRUMPT, E. (1912). Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus, Cimex lectularius, Cimex boueti* et *Ornithodorus moubata.* Cycle évolutif de ce parasite. — Bull. Soc. Path. exot. *5,* 360-367

BRUMPT, E. (1914). Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages *(Rhodnius, Triatoma)* pour la conservation des trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. — Bull. Soc. Path. exot. *7,* 702-705

BRUMPT, E. (1936). Précis de Parasitologie, 5e éd. — Paris: Masson et Cie, vol. 1, p. 316-322

DU BUY, H. G., MATTERN, C. F. T. & RILEY, F. L. (1965). Isolation and characterisation of DNA from kinetoplasts of *Leishmania enrietti.* — Science *147,* 754-756

DU BUY, H. G., MATTERN, C. F. T. & RILEY, F. L. (1966). Comparison of DNA's obtained from brain nuclei and mitochondria of mice and from the nuclei and kinetoplasts of *Leishmania enrietti.* — Biochim. biophys. Acta *123,* 298-305

CAMERON, T. W. M. (1965). Parasites and parasitism. — London: Methuen & Co. Ltd., p. 23 ff.

CHAGAS, C. (1909). Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. — Mem. Inst. Osw. Cruz *1,* 159-218

CHAGAS, C. (1911). Ein neu entdeckter Krankheitsprozeß des Menschen (Bericht über die ätiologischen und klinischen Beobachtungen). — Mem. Inst. Osw. Cruz *3,* 219-275

CHAGAS, C. (1927). Quelques aspects évolutifs de *Trypanosoma cruzi* dans l'insecte transmetteur. — C. R. Soc. Biol. *97,* 829-832

DEANE, M. P. & KIRCHNER, E. (1963). Life cycle of *Trypanosoma conorhini.* Influence of temperature and other factors on growth and morphogenesis. — J. Protozool. *10,* 391-399

DIAS, E. (1934). Estudos sôbre o *Schizotrypanum cruzi.* — Mem. Inst. Osw. Cruz *28,* 1-110