

Disciplina de microbiologie și inframicrobiologie stomatologică (cond.: șef de lucrări Al. Abraham, doctor în medicină), Disciplina de microbiologie și inframicrobiologie (cond.: conf. I. László) și Catedra de fiziologie (cond.: conf. Gh. Arsenescu, doctor în medicină) ale I.M.F. Tg.-Mureș

## STUDIUL FACTORILOR HEMOLITICI EXTRASI DIN TULPINI DE ESCH. COLI

### Nota II

Monica Sabău, L. Domokos, A. Kapusi, Ecaterina Lukács

Germenii aparținând grupului Esch. coli sînt microorganisme comensale, constituenți obișnuiți ai florei normale a corpului, care în anumite condiții pot dovedi o capacitate marcată de patogenitate, putînd determina infecții urinare, intestinale, peritonite, apendicite sau septicemii cu localizări secundare în diferite organe. Au rămas însă numeroase tulpini de colibacili, patogenitatea cărora nu este încă precizată. Astfel, tulpinile hemolitice sînt adesea incriminate în provocarea proceselor morbide la om (1, 2, 3, 4, 5, 8) și la animale (6, 11, 13, 14, 15, 22, 23).

S-au făcut o serie de încercări pentru a izola principiul hemolitic din aceste tulpini (9, 19, 21).

În lucrările noastre anterioare (16, 17, 18) am studiat tulpinile hemolitice izolate de la cazuri cu enterocolită și am reușit să izolăm factorul hemolitic după metoda preconizată de Smith (19) și prin precipitare cu alcool absolut. Patogenitatea acestui factor am determinat-o la șoareci albi și acțiunea lui dermonecrotică la cobai și iepuri, iar dinamica anticorpilor la animale imunizate.

În continuarea preocupărilor noastre de acest gen am experimentat și alte posibilități de izolare a factorului hemolitic din tulpini de *Esch. coli*, proprietățile și natura lui.

#### Material și metodă

Tulpinile hemolitice de *Esch. coli* au fost izolate din materii fecale ale copiilor cu enterocolite, identificate morfologic, serologic, biochimic și din punct de vedere al caracterelor de cultură.

Bulionului cu proteoză-peptona, preconizat de *Smith* (19) — pentru obținerea hemolizinei — am căutat să-i aducem unele îmbunătățiri prin adăos de hidrolizat de cazeină 10% și diverși carbohidrați (glucoză, lactoză, manită, maltoză) în concentrație de 0.2% având un pH final de 7,4.

Din tulpinile de *Esch. coli* s-au însămânțat în 10 ml din bulionul menționat  $5 \times 10^7$  organisme viabile pe ml stabilite prin nefelometrie, incubate la 37° timp de 2 ore și jumătate. Ulterior cultura a fost centrifugată 60 min la 7000 turații/min, și filtrată prin filtrul Seitz.

Titarea factorului hemolitic s-a făcut după procedeul descris (16), dar s-au utilizat pe lângă hematii de oaie și hematii de iepure și de om grupa 0. Tuburile conținând diluții succesive din factorul hemolitic și hematii de oaie, iepure și om 1% au fost incubate 2 ore la baie marină, iar ulterior au fost menținute 18 ore la +4°.

Sensibilitatea față de căldură s-a determinat, menținând centrifugatul culturilor la 56° timp de 30 minute și 10 minute la 70°, iar sensibilitatea față de formol prin adăugare de formalină în concentrație de 1%.

Pe baza sensibilității factorului hemolitic față de căldură, față de formalină, a precipitării în prezența alcoolului absolut și a acidului tricloracetic, presupunând că este de natură proteică, am efectuat și studiul refractometric și electroforetic al acestuia. Pentru studiul electroforetic am utilizat supernatantul a 2 culturi, concentrat de 10 ori în saci de colodiu, față de soluția tampon; hârtie Whatman 1 și soluție tampon medinal-veronal la pH 8,6. Din materialul studiat s-a aplicat pe fiecare bandă 0,3 ml (3 spoturi de pornire unul deasupra celuilalt), intensitatea curențului folosit fiind de 1,2 mA pe bandă. După 5 ore benzile au fost uscate, fixate 10 min. la 110° și colorate după metoda *Lozza* (10) cu fuxină acidă *Geigy*, iar evaluarea s-a făcut la evaluatorul automat ERI-10 *Zeiss-Jena*. De asemenea s-a efectuat și electroforeza în gel de amidon după metoda *Smithies* (20)

#### Discutarea rezultatelor

Rezultatele lucrărilor noastre anterioare (16, 17, 18) au scos în evidență faptul că factorul hemolitic izolat (presupusa hemolizina alfa) se găsește în cantitate mai mare în supernatantul culturilor de *Esch. coli* hemolitice în bulion *Smith* decît în filtrat, după o incubare de 2 ore și jumătate la 37°. Această perioadă a fost probabil apropiată de faza logaritmică de creștere a germeniilor.

Titru hemolizinei, obținut prin cultivarea tulpinilor în bulionul *Smith*, a fost de 1/64, iar cel obținut prin utilizarea mediului îmbogățit cu hidrolizat de cazeină 1/128—1/256. Compararea acestor titruri ne reliefează faptul că hidrolizatul de cazeină favorizează producerea de hemolizina. Creșterea titrului hemolitic a fost înregistrată după menținerea tuburilor timp de 18 ore la +4°.

În lucrările sale *Snyder* și *Koch* (21) relatează posibilitatea de izolare a două hemolizine, una filtrabilă și una nefiltrabilă, în mediul „definit chimic” la care s-a adăugat glucoză, maltoză, sorbitol, lactoză, galactoză, manoză și manitol. Hemolizina filtrabilă s-a produs în prezența glucozei, lactozei, manitolului, dar nu s-a produs în prezența galactozei, manozei, sorbitolului. Hemolizina nefiltrabilă s-a produs în prezența tuturor carbohidraților.

Carbhidrații adionați de noi la mediul de bază, au stimulat în egală măsură producerea factorului hemolitic.

Referindu-ne la natura hematiilor utilizate în reacția de hemoliză, am constatat că cele mai sensibile au fost cele de oaie și de om la care s-a obținut un titru maxim de 1/256 față de cele de iepure cu titru mult mai scăzut 1/32—1/64.

Termolabilitatea hemolizinei alfa a fost menționată de *Ishii Fujio* (7) și de *Snyder și Koch* (21) care menționează că termolabilitatea este în funcție atât de tipul hemolizinei cât și de mediul utilizat pentru producerea ei. În acest sens ei arată că hemolizinele, atât cea filtrabilă, cât și cea nefiltrabilă, obținute prin cultivarea tulpinilor pe mediul cu inimă de bou sînt labile, pe cînd în mediul cu hidrolizat de cazeină și mediul „definit chimic” numai hemolizina nefiltrabilă este labilă.

Menținînd supernatantul culturilor hemolitice la temperatura de 56° și 70° și efectuînd ulterior reacția de hemoliză, noi am constatat inhibarea acțiunii hemolitice a factorului hemolitic. De asemenea inocularea factorului hemolitic supus acțiunii căldurii a rămas la șoarecii albi fără efect în comparație cu utilizarea lui ca atare (tabelul nr. 1 și 2).

Tabelul nr. 1.  
Efectul temperaturii asupra hemolizinei

Materialul inoculat	Nr. anim. inoculate i. p.	Decese			Supraviețuiri	Total Decese	
		6-8 h	8-24 h	24-48 h		decese	%
Centrifugat la 56° C 30'	25	—	—	2	23	2	8
Centrifugat la 70° C 10'	25	—	—	—	25	0	0

Tabelul nr. 2.  
Patogenitatea filtrului și centrifugatului la șoareci

Materialul inoculat	Nr. anim. inoculate	Decese			Supraviețuiri	Total Decese	
		6-8 h	8-24 h	24-48 h		decese	%
Centrifugat i. p.	25	2	16	6	1	24	96
Filtrat i. p.	25	—	—	1	24	1	4
Centrifugat i. v.	25	15	10	—	—	25	100
Filtrat i. v.	25	—	2	2	21	4	16

Pe baza acestor observații, coroborate cu cele menționate mai sus, presupunem natura proteică a factorului hemolitic, refractometria și electroforeza confirmîndu-ne această ipoteză.

Studiul refractometric a indicat un indice de refracție corespunzător unei concentrații de 4,8 g% proteină, față de soluția martor (bulionul Smith) care a prezentat un indice de refracție puțin superior celui al apei distilate. Factorul hemolitic extras din cele două tulpini a prezentat la examenul electroforetic patru

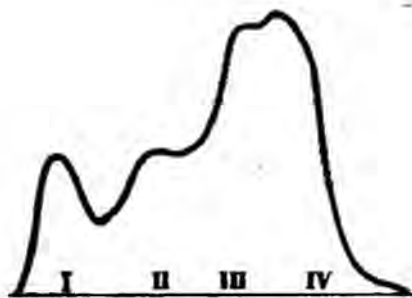


Fig. nr. 1: Electroforegrama factorului hemo-  
litic



Fig. nr. 2: Electroforeza pe gel de amidon a factorului  
hemolitic

fracțiuni: fracțiunea I cu mobilitatea cea mai mare a prezentat 18%, respectiv 19%; fracțiunea II a reprezentat 16%, respectiv 17%; fracțiunea III 36%, respectiv 37%, iar fracțiunea IV 28%, respectiv 29% (fig. 1). Electroforeza soluției martore a pus în evidență două fracțiuni distincte, prima plasându-se în zona albuminelor, iar cea de a doua în zona globulinelor, însă foarte slab colorate.

Electroforeza în gel de amidon ne-a furnizat date similare (fig. 2). Pe lângă cele patru fracțiuni s-a pus în evidență însă o fracțiune în plus cu migrare spre catod. Pe baza vitezei de migrare în câmpul electric aplicat, comparativ cu studiul electroforeogramei proteinelor serice obișnuite, fracțiunea I a factorului hemolitic, studiat de noi, prezintă o mobilitate identică cu a albuminelor, iar fracțiunile II, III, IV au mobilități care se înregistrează în cadrul globulinelor serice. Prezența fracțiunilor cu proprietăți electrice asemănătoare globulinelor este dovedită și de apariția pe gel de amidon, a unei noi fracțiuni (fracțiunea V cu migrare spre catod).

Referindu-se la studiul electroforetic al neurotoxinei „S” și „R” a germeilor gram negativi, *L. Mesrobeanu* și colab. (12) au pus în evidență la aceasta trei fracțiuni, fiind în studiu izolarea acestora cu ajutorul electroforezei preparative și pe coloană de Sephadex.

Rezultatele obținute de noi ne permit să conchidem următoarele:

— adăugarea la mediul de bază Smith a hidrolizatului de cazeină și a diversilor carbohidrați favorizează producerea în cantitate mai mare a hemolizinei;

— cele mai sensibile hematii față de factorul hemolitic sînt hematii de oaie și om grupa 0. Cele de iepure sînt mai puțin sensibile;

— factorul hemolitic este termolabil, activitatea lui hemolitică fiind de asemenea inhibată de acțiunea formalinei;

— pe baza cercetărilor electroforetice presupunem că factorul hemolitic este de natură proteică.

Sosit la redacție: 28 noiembrie 1966.

#### Bibliografie

1. BERCOVICI C., COHAN A., DIMITRIU N., CIRDEI I., BALTIEV A., CORBER S., BEȘLEAGĂ V.: *Microbiologia* (1958), 3, 227; 2. BERGNER E., STERN A., VANCEA D.: *Microbiol., Parazitol., Epidemiol.* (1965), 1, 10, 41; 3. CASELITZ F. H., KITTELH H.: *Ex. Medica* (1960), 3, 8, 855; 4. DUDGEON, PULBERTAPHT cit. TOPLEY WILSON: *Principles of Bacteriology and Immunology*, London (1955); 5. GUNDEL M.: *Die Ansteckenden Krankheiten* (1942); 6. GREGORY D. W.: *Bull. I.P.* (1963), 61, 10, 2978; 7. ISHII F.: *Japan J. Microb.* (1960), 4, 2, 203; 8. KAUFFMANN: *Acta path. microbiol. scand.* (1948), 25, 4, 502; 9. LOVELL R., REES T. A.: *Nature* (1960), 188, 4752, 755; 10. LOZSA A.: *Kísérletes orvostudomány* (1961), 13, 98; 11. MANSSON I.: *Acta Vet. Scand.* (1962), 3, 1, 65; 12. MESROBEANU L., MESROBEANU I., MITRICĂ N., CROITORESCU I., MARX A.: *Arch. roum. Path. exp.* (1963), 22, 3, 775; 13. MIURA S., SATO G., ITO M., MIYAMAE H., SAKAZAKI R.: *Japan J. Vet. Res.* (1961), 9, 3, 145; 14. RICHARDS W.P.C., FRASER C. M.: *Bull. L. P.* (1960), 59, 11, 3501; 15. ROBERTS H. E., WALLELY T. F.: *Bull. I. P.* (1960), 7, 2140; 16. SABĂU M., DOMOKOS L., ÁBRAHÁM A., NAGY L.: *Microbiol. Parazitol., Epidemiol.* (1960), 10, 1, 41; 17. SABĂU M., DOMOKOS L., ÁBRAHÁM A., KAPUSI A. Congr.: *National de microbiologie*, București (1965); 18. SABĂU M., DOMOKOS L., ÁBRAHÁM A., KAPUSI A.: *Sesiunea V-a I.M.F. Tg.-Mureș* (1965); 19. SMITH H. W.: *J. Path. Bact.* (1963), 85, 1, 197; 20. SMITHIES O.: *Biochem. J.* (1955), 61, 629; 21. SNYDER I. S., KOCH A. N.: *Journal of Bact.* (1966), 91, 2, 763; 22. ZIMMERBACHEL W.: *Ex. Medica IV* (1964), (10), 1116; 23. WILLINGER H.: *Ex. medica* (1965), 18, 4, 517.