

Disciplina de microbiologie (cond.: conf. I. László, doctor in medicină) a I.M.F. din
Tîrgu Mureş

CERCETAREA PATOGENITĂȚII TULPINILOR HEMOLITICE DE ESCHERICHIA COLI PE CULTURI DE CELULE. NOTA II

Monica Sabău, Al. Ábrahám

Dacă în diagnosticul de laborator al afecțiunilor virale, culturile de celule reprezintă mediul ideal, aplicarea lor în diagnosticul bolilor bacteriene nu a dus la elaborarea metodelor corespunzătoare scopurilor practice imediate.

Utilizarea culturilor de celule în studiul unor bacterii patogene sau a toxinelor acestora, cu toate că nu au realizat față de utilizarea mediilor din

C RETTEGI: ASPECTE MORFOLOGICE ALE CIRCULAȚIEI DIN OSUL
COMPACT HAVERSIAN LA OASELE LUNGI



Fig. nr 1



Fig nr. 2

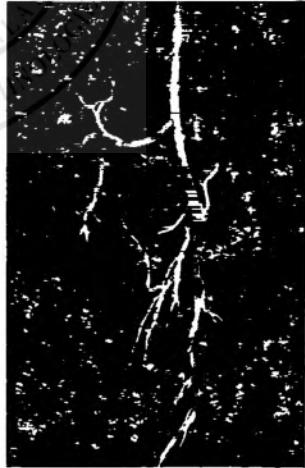


Fig. nr. 3

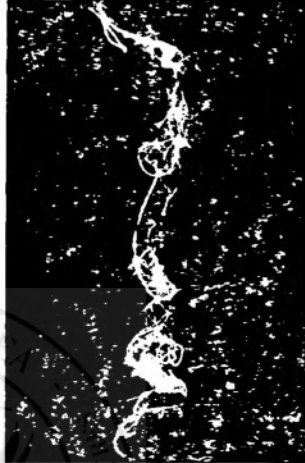


Fig nr. 4

bacteriologie o treaptă superioară în diagnosticul de laborator, au dus în amîi din urmă la elucidarea unora dintre fenomenele de bază în patologia experimentală la om și la animale. Astfel au fost întreprinse cercetări privind: efectele citopatice ale toxinelor bacteriene, domeniul în care de fapt au fost utilizate cel mai mult culturile ce celule (20, 23, 24, 25, 26, 27, 33, 41); condițiile biosintezei anticorpilor in vitro; proprietățile specifice ale celulelor imunologic competente (3, 28); patogenia bolilor de colagen și a altor boli prin autoanticorpi (2, 18, 28); cinetica dezvoltării intracelulare a bacteriilor.

A fost demonstrat de către unii autori (21, 38, 39, 40), pe diverse culturi de celule, că tulpinile enteropatogene de *Escherichia coli* (*Esch. coli*), spre deosebire de cele nepatogene produc efecte degenerative cu distrugerea celulelor.

În acest proces, în afara corelației existente între multiplicarea *Esch. coli* în mediul de menținere al culturilor de celule și efectul distructiv produs asupra acestora fapt confirmat de noi (38), mai intervine probabil fenomenul de absorbție și penetrare a bacililor în celule cu dezvoltarea lor intracitoplasmatică. Lucrarea de față caută să aducă unele contribuții la elucidarea acestui fenomen.

Material și metodă

În experiment au fost utilizate sușe de *Esch. coli* hemolitic a căror acțiune patogenă asupra culturilor de celule a fost testată anterior (38) sușe izolate de la cazuri cu enterocolite; sușe hemolitice izolate din scaunul copiilor sănătoși și *Esch. coli* Bruxelles. Culturile de celule utilizate au fost HeLa și KB, menținute prin versenizare în laboratorul nostru și distribuite în flacoane de 30 de ml.

Din sușele microbiene amintite, am infectat flacoane conținând culturile KB cu o cantitate de 10 ml din diluția ce conținea 3,5 miliarde germeni/ml, iar culturile HeLa cu aceeași cantitate din densitatea de 1 miliard germeni/ml.

După 1 oră de menținere la 37°, s-au efectuat două spălări cu soluție tampon fosfat, după care s-a adăugat în fiecare flacon 30 de ml mediu de menținere (Earle cu 0,5% lactalbumină și 2% ser de vițel).

Operația de spălare s-a repetat după 2,4 și 8 ore de menținere a culturilor la 37°, repunându-se de fiecare dată mediul de menținere nou, aceasta pentru a înlătura germenii extracelulari neadsorbiți pe celule.

La intervalele de timp amintite, s-a extras din flacoane pinza celulară cu colodiu (1), s-a etalat pe lame și s-a colorat după metoda Giemsa.

Rezultate și discuții

Urmărindu-se pătrunderea și multiplicarea germenilor în celule, s-a constatat că tulpinile patogene de *Esch. coli*, tulpini a căror patogenitate a fost constatată de noi și prin alte teste (36, 37), au pătruns în celule, multiplicându-se în citoplasma lor.

Deja după două ore de la infectare, pentru aceste tulpini s-a observat aderența germenilor de celule, numărul acestora crescînd în citoplasmă la 4, respectiv 8 ore de la infecție.

În același timp s-a înregistrat și efect distructiv asupra celulelor, discret la 4 ore și mai accentuat la 8 ore, efect care a fost menționat și descris anterior (38).

O dată cu apariția efectului distructiv marcat (24 de ore de la infectare) remarcăm pe lângă existența germenilor în interiorul celulelor și dispoziția lor extracelulară, germenii fiind eliberați probabil în mediul exterior în urma distrucției celulare.

Pentru tulpinile banale, respectiv Esch. coli Bruxelles, s-au înregistrat un număr redus de germeni în citoplasma celulelor, majoritatea fiind extracelulari, iar după spălări repetate numărul lor s-a redus simțitor.

Stratul de celule, în cazul infectării cu aceste tulpini, a rămas nemo-dificat.

Înmulțirea intracitoplasmatică a germeilor depinde probabil de virulență, în sensul că germenii care posedă virulență mărită se dezvoltă în citoplasmă, în timp ce în cazul florei banale, numărul germeilor din citoplasma culturilor de celule este redus sau absent.

Neter (29) subliniază faptul că, Esch. coli patogen are acțiune directă asupra epitelului intestinal în caz de enterite, mecanismul fiind asemănător celui descris de *Freter* (15) în patologia holerei.

Folosind tehnica imunofluorescenței pe segmente de intestine de iepure ligaturate și inoculate cu Esch. coli enteropatogen, *Druker* (14) a reușit să demonstreze că acești germeni aderă și penetrează celulele epitelului intestinal producând leziuni caracteristice și acumulare de lichid în segmentele ligaturate. Autorul pune în legătură capacitatea de aderență și penetrare a germeilor cu factorul de patogenitate. Corelația dintre patogenitatea pe segmentul ligaturat, aderență și penetrare sugerează că enteropatogenitatea Esch. coli probabil rezidă în abilitatea germeilor de a adera și mai ales a penetra celulele epitelului intestinal, proprietate care lipsește la tulpinile nepatogene de Esch. coli (14).

La Brec (5) a demonstrat astfel de diferențe de penetrabilitate între tulpini patogene și nepatogene de *Sh. flexneri* la cobai și maimuțe, subliniind că penetrarea este un factor esențial în determinarea patogenității.

Penetrare cu multiplicarea intracitoplasmatică a germeilor în celulele culturilor de celule, a fost semnalată la mulți germeni patogeni ca: *Mycobacterium tuberculosis* (5, 7, 8, 12, 13, 32, 42, 43, 44, 45, 47, 48); *Mycobacterium leprae* și *lepraemurium* (10, 11, 35); *Brucella* (19, 46); *Bacillus anthracis* (17); *Pasteurella tularensis* (22); *Neisseria gonorrhoeae* (16); *Streptococcus pyogenes* (34); *Shigella* (9, 16, 30, 31); *Salmonella typhi* (4) etc., autorii subliniind că dezvoltarea intracitoplasmatică este strins legată de caracterele de patogenitate, fapt pe care am reușit să-l demonstrăm și pentru Esch. coli hemolitic.

Creșterea progresivă a germeilor în celule paralel cu distanțarea timpului de la momentul infectării, dovedește că germenii patogeni (Esch. coli) au proprietatea de a se înmulți în citoplasmă. Germenii aparținând florei banale nu pătrund decât în cantități minime în celule și numărul lor rămâne relativ constant, deci nu se multiplică și nici nu produc efect distructiv asupra celulelor.

Pentru aceste tulpini, am observat că germenii găsiți în celule nu mai păstrează forma normală inițială, ci devin cocobacilari și populează în special celulele îmbătrinite.

După părerea autorilor, cultivarea tulpinilor hemolitice de Esch. coli pe culturi de celule cu studierea concomitentă a cineticii dezvoltării lor intracitoplasmatică, bineînțeles corelate și cu alte teste permite o apreciere mai justă a patogenității lor.

Sosit la redacție: 27 ianuarie 1969.

Bibliografie

1. ABRAHAM AL., POP D. POPA DOINA, SABĂU MONICA: Rev. Med (1967), 3—4, 275; 2. ADERCA I., GENCEVICI G.: Microbiologia (1965), 10, 5—6, 405; 3. BALDWIN R., HUMPHREY J.: Autoimmunity, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1965; 4. BONDARENKO V. M.: Zh. Microbiol. (1967), 7, 65; 5. LA BREC



Fig. nr. 1: Cultură de celule HeLa infectată cu Esch. coli hemolitic patogen (nr. 1306). După 2 ore de la infectare se observă aderența bacililor de celule, pe alocurea ei se găsește și intracelulari. Colorația: Giemsa. Mărirea: Imersie.



Fig. nr. 2: Aceiași cultură infectată cu Esch. coli izolat de la sănătoși (nr. 383). După 2 ore de la infectarea culturilor apar aceeași modificări ca în figura nr. 1.



Fig. nr. 3: Aceiași cultură la 4 ore după infectarea cu Esch. coli hemolitic patogen (nr. 515). Bacilii se localizează intracitoplasmatic în cantități apreciabile. Aceiași colorație și mărime.

Fig. nr. 4: Localizarea în special extracitoplasmatică a Esch. coli nepatogen (nr. 383) la 4 ore după infectare. Aceiași colorație și mărime.



Fig. nr. 5: La 8 ore după infectarea culturilor cu *Esch. coli* hemolitic considerat de noi patogen (nr. 1305), celulele se distanțează unele de altele, prezintă fenomene de degenerare, citoplasma conține numeroși bacili, unii au ieșit deja din celulele lezate. Aceiași colorație și mărire.



Fig. nr. 6: La 8 ore după infectarea acelorasi culturi cu *Esch. coli* nepatogeni, celulele nu prezintă efecte degenerative, citoplasma lor conține un număr redus de bacili, care și-au schimbat aspectul bacilar devenind cocobacilari sau cocoizi. Aceiași colorație și mărire.

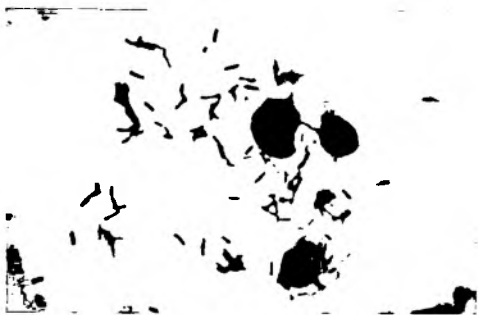


Fig. nr. 7: Celulele HeLa după 24 ore de la infectare cu *Esch. coli* hemolitic patogen (nr. 1305) prezintă fenomene de degenerare marcate, bacili se găsesc în cantități mari în citoplasma celulelor, dar se găsesc și extracelulari, eliminați din celulele distruse. Colorația: Giemsa. Mărire: Imersie.

E., SCHNEIDER H., MAGNANI T., FORMAL S.: *J. Bact.* (1964), 88, 1503; 6. BROSBE E., SUGIHARA P., SMITH R.: *J. Bact.* (1961), 81, 6, 979; 7. BROSBE E., SUGIHARA P., SMITH R.: *J. Bact.* (1962), 82, 6, 1282; 8. BROSBE E., SUGIHARA P., SMITH E.: *Texas Reports on Biology and Medicine*, (1967), 25, 1, 48; 9. CEFALU M., PUGLISI C.: *Riv. Ist. Sieroterap. Ital.* (1967), 42, 1, 34; 10. CHANG Y. T., NEIKIRK R.: *Intern. J. of Leprosy*, (1965), 33, 3, 586; 11. CHANG Y. T., VAITUZIS Z.: *J. Bact.* (1967), 93, 3, 1119; 12. DONA G., DONA D.: *Microbiologia* (1962), 1, 47; 13. DONA G.: *Microbiologia* (1962), 1, 87; 14. DRUCKER M., YEIVIN R., SACKS T.: *Israel. J. Med. Sci.* (1967), 3, 3, 445; 15. FRETER R., SMITH H., SWEENEY F.: *J. Infect. Dis.* (1961), 109, 35; 16. GERBER D. F., WATKINS H. W.: *J. Bact.* (1961), 82, 6, 815; 17. GINSBURG N., FEDOTOVA YU.: *Zh. Microbiol.* (1963), 11, 3; 18. GLYNN L., HOLBOROW E.: *Autoimmunity and Disease*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1965; 19. HOLLAND J., PICKETT M.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* (1956), 93, 476; 20. LEVADITI C., MUTTERMILCH S.: *C. R. Biol. Paris.* (1913), 74, 379, 614, 1305; 1379; 21. LINDBERG B. R., YOUNG V. M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1956), 66, 1, 100; 22. MERRIOTT J., SHOEMAKER A., DOWNS C.: *J. Infect. Disease* (1961), 108, 136; 23. MESROBEANU I., GEORGESCO M., IEREMIA T., PAPAZIAN E., DRĂGHICI D., MESROBEANU L.: *Arh. roum. Path. exp. Microb.* (1960), 19, 345; 24. MESROBEANU L., GEORGESCO M., IEREMIA T., MITRICĂ N., DRĂGHICI D., MATEESCO M.: *Arch. roum. Path. exp. Microb.* (1960), 19, 2, 161; 25. MESROBEANU L., MESROBEANU I., GEORGESCO M., DRĂGHICI D., ALĂMIȚĂ E., IEREMIA T.: *Arch. roum. Path. exp. Microb.* (1962), 21, 1, 19; 26. MESROBEANU I., MESROBEANU L., ALĂMIȚĂ E., DRĂGHICI D., GRIGORESCO E., GEORGESCO M.: *Arch. roum. Path. exp. Microb.* (1964), 23, 3, 581; 27. MESROBEANU I., MESROBEANU L.: *Microbiologia* (1965), 5—6, 470; 28. MESROBEANU I., BERCEANU ȘT.: *Imunologie și imunopatologie*, Ed. Med. București, 1968; 29. NETER E.: *Pediat. J. Path.* (1960), 7, 1015; 30. OGAWA H., YOSHIKURA H., NAKAMURA A., NAKAYA R.: *Jap. J. of Med. Sci. Biol.* (1967), 4, 329; 31. OGAWA H., NAKAMURA A., NAKAYA R., MISE K., HONJO S., TAKASAKA M., FUJIWARA T., IMAIZUMI K.: *Japan. J. of Med. Sci. Biol.* (1967), 20, 4, 315; 32. OLĂNESCU GH., DEMETRESCU S., GAVRILESCU B.: *Congresul Național de Bacteriologie*, București, 1965, 53; 33. POZSGI N., ANDREESCU V., DONA D.: *Arch. roum. Path. exp. Microb.* (1961), 20, 3, 431; 34. QUINN R. W., LOWRY N.: *J. Bact.* (1967), 93, 6, 1825; 35. REES R., GARBUTT E.: *Exp. Path.* (1962), 3, 221; 36. SABĂU M., DOMOKOS L., ÁBRAHÁM AL., NAGY L.: *Microbiologia* (1966), 1, 41; 37. SABĂU M., ÁBRAHÁM AL., TINKL S., DOMOKOS L.: *Rev. Med.* (1968), 2, 170; 38. SABĂU M., ÁBRAHÁM L.: sub tipar; 39. SAFRANOV A. F., FILIPOVAIA: *Zh. Microbiol.* (1966), 1, 81; 40. SARAPOVA T., GAVRILJUK B.: *Zh. Microbiol.* (1963), 8, 94; 41. SCHAEFFER W. I., GABLIKS J., CALITIS R.: *J. Bact.* (1966), 1, 21; 42. SHEPARD C.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* (1955), 90, 392; 43. SHEPARD C.: *J. Exptl. Med.* (1957), 105, 39; 44. SHEPARD C.: *J. Bact.* (1957), 73, 722; 45. SHEPARD C.: *J. Bact.* (1959), 77, 701; 46. STINEBRING W., KESSEL A.: *Proc. Soc. Biol. Med.* (1959), 101, 412; 47. TIMOȘCĂ S., BERNESCU E.: *Rev. Med. Chir.* (1967), 2, 295; 48. WATANABE M., TANAKA Y., HOSHINO M., SETO K., YOKOYAMA S.: *Med. and Biol.* (1958), 48, 4, 146.