

Catedra de microbiologie (cond.: prof. dr. I. László, doctor în medicină)
a I.M.F. Tirgu Mureș

CONTRIBUȚIUNI PRIVIND UNELE ASPECTE ALE INTERACȚIUNII DINTRE GENUL MYCOBACTERIUM ȘI CANDIDA *

dr. I. László, dr. M. Péter, Iuliana Both, dr. Monica Sabău, dr. L. Domokos
dr. Sanda Munteanu, dr. Maria Repolski, V. Filep

Faptul că în sputa bolnavilor suferind de tuberculoză sînt frecvent puse în evidență ciuperci aparținînd genului *Candida*, ridică problema dacă interacțiunea lor influențează în sens pozitiv sau negativ tabloul clinic al tuberculozei.

Datele privind frecvența ciupercilor găsite la bolnavii tuberculoși variază de la un autor la altul (2, 3, 5, 9, 13, 14). Unii nu acordă nici un rol tratamentului cu antibiotice în creșterea numărului de cazuri cu ciuperci (4, 5), alții nu găsesc nici o legătură între prezența bacilului Koch și cea a Candidelor (3, 4). Numeroși autori susțin însă că, prezența Candidelor nu este indiferentă pentru bolnavii cu tuberculoză, ele putînd contribui la agravarea bolii (1, 10, 12, 13).

Deși fenomenul de transformare a fost dovedit în cadrul aceleiași specii, dar între tipuri diferite, nu poate fi exclusă posibilitatea ca în anumite condiții naturale acizii nucleici, care apar în urma dezintegrării microorganismelor, să nu acționeze asupra caracterelor morfologice sau biologice ale altor microorganisme.

Schiller (11) a demonstrat că sînt condiții în care un anumit germene se dezvoltă pe seama celuilalt, reușind să cultive bacilul Koch în prezența levurilor, cînd mediul folosit pentru cultivare a fost format numai din suspensie de levuri. După acest autor bacilul Koch ar produce anumite „lizine“, care ar fi enzime adaptive, prin care microbul va putea să se dezvolte pe seama levurilor.

Într-o lucrare anterioară (6) am arătat că, acizii nucleici heterologi favorizează creșterea tuturor tulpinilor de micobacterii studiate ($H_{37}Rv$, *Mycobacterium phlei*, *M. tuberculosis* rezistent la hidrazidă) și modifică proprietățile biochimice ale acestora. Pornind de la premisa că în urma creșterii incidenței genului *Candida* la bolnavii tuberculoși se pot modifica nu numai caracterele morfologice și biochimice ale bacilului Koch, unul dintre obiectivele cercetării noastre a fost studierea modificării patogenității micobacteriilor la cobai.

În lucrarea de față dorim să prezentăm incidența diferitelor tulpini de ciuperci la bolnavii cu tuberculoză, precum și rezultatele cercetărilor noastre cu privire la acțiunea *Candida albicans* și a acizilor nucleici obținuți din levuri, asupra unor tulpini de micobacterii.

Material și metodă

I. S-a examinat sputa la 241 de bolnavi de tuberculoză internați în Clinica de ftiziologie din Tirgu Mureș, folosind mediul Sabouraud, iar pentru identificarea levurilor mediile: Pietre et de Souza și Gorodkova. După izolare s-a efectuat și

* Lucrare comunicată la ședința U.S.S.M., Filiala Mureș, 17 iunie 1971.

fermentarea zaharurilor, după metoda Langeron-Guerra, respectiv auxonograma, după metoda Beijerinck. Producerea clamidosporilor s-a studiat pe mediul PC (cartofi-morcovi) respectiv PCB (mediu cu bilă).

II. Acțiunea *C. albicans* asupra micobacteriilor

1. 15 tulpini de micobacterii (5 tulpini standard. 5 tulpini avirulente și 5 tulpini virulente izolate de la bolnavi de tuberculoză) au fost cultivate în mediul Youmans în prezența *C. albicans*. După o cultivare de 7, respectiv 14 zile, folosind colorația Ziehl-Neelsen, s-a urmărit dezvoltarea micobacteriilor în prezența celulelor levurice.

2. Tulpinile de micobacterii sus-menționate, cultivate în prezența *C. albicans* în saci de colodiu, au fost inoculate la 57 de cobai, fiind urmărită perioada de supraviețuire a animalelor și modificările histopatologice ale glandelor interne.

III. Acțiunea acizilor nucleici heterologi asupra micobacteriilor

1. Tulpinile de micobacterii: H₃Rv, Mycobacterium phlei sînt din colecția de tulpini a Catedrei de microbiologie, iar cea rezistentă la HIN, din colecția Clinicii de ftiziologie, toate fiind menținute pe mediul Löwenstein sau Gottsacker.

2. Acizii nucleici heterologi (Acidum nucleicum aus Hefe p.a. Suchardt, München și Desoxyribonucleic acid ex herring sperm — L. Light. Co. Ltd. Colnbrook — England; acidul nucleic extras din *C. albicans* la Catedra de microbiologie, după metoda Dounce) în concentrație de 1 % și 2 % au fost adăugați mediilor Lockeman și mediul geloză-ouă, pe care au fost inoculate tulpinile sus-amintite.

3. Studiarea tulpinilor de micobacterii s-a efectuat după o cultivare de 7—14 și 30 de zile, pentru:

a) examinarea morfologică, după colorarea frotiurilor prin colorația Knyjoun,
b) examinarea micobacteriilor la microscopul electronic TESLA BS 242 a (incluzionarea s-a făcut în metacrilat de butil și etil — proporția fiind 6:4).

c) cercetarea modificărilor biochimice prin testele:

— reacția Dubos-Middlebrook,

— reducerea nitraților,

— reacția catalazică.

Tehnica acestor reacții a fost descrisă de László (7).

IV. Experiențe pe animale

Micobacteriile cultivate în mediul Lockeman timp de 4 săptămîni, în prezența acizilor nucleici, în doza de 0,5 cc au fost inoculate pe calea intraperitoneală (i.p.) la cobai de cca. 350—400 g. Din fiecare lot s-au inoculat cîte 4 animale, ca martori servind același număr de animale, care însă au fost infectate cu micobacterii cultivate în medii fără acizi nucleici. În total s-au inoculat 48 de cobai. După 6 săptămîni de la inoculare animalele au fost sacrificate, iar din ficat și splină s-au efectuat examene histopatologice. Secțiunile au fost colorate după metoda Ziehl-Neelsen, respectiv cu hematoxilină-eosină.

Din acest tabel reiese, că marea majoritate a ciupercilor izolate o constituie levurile. Analizînd rezultatele am putut constata o ușoară creștere a speciei *Candida albicans*, față de celelalte genuri.

II. În legătură cu acțiunea *Candidaei albicans* asupra micobacteriilor observațiile noastre sînt următoarele:

1. *C. albicans* — celulele levurice vii — intensifică ritmul de creștere al micobacteriilor studiate, într-o proporție de 53,3 %.

2. Animalele inoculate cu micobacterii + *C. albicans*, au sucombat după o perioadă relativ scurtă de la inoculare, față de animalele care au fost infectate numai cu micobacterii. Din punct de vedere histopatologic, leziunile tuberculoase cele mai grave au putut fi înregistrate la acele animale, care pe lângă micobacterii au fost inoculate și cu suspensie levurică.

I. LÁSZLÓ ŞI COLAB.: CONTRIBUŢIUNI PRIVIND UNELE ASPECTE ALE
INTERACŢIUNII DINTRE GENUL MYCOBACTERIUM ŞI CANDIDA



Fig. nr. 1: *Mycobacterium phlei*, cultivat în prezența acizilor nucleici
extrași din *C. albicans*. Apariția unor forme filamentoase acidorezistente
pe lângă microbii cu aspect normal. Colorația Knyjoun.
Ob. ol. I., Oc. 10 X

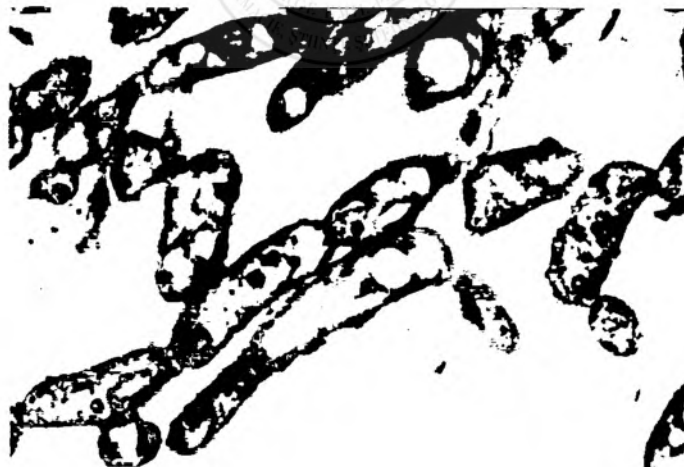


Fig. nr. 2: *Mycobacterium phlei*, cultivat pe medii cu acizi nucleici
levurici. Forme pseudomicelare și germeni cu „inmușurire” (vezi să-
geata). Mărire: 20.000 X



Fig. nr. 3: Mycobacterium phlei, cultivat pe mediul Lockeman. În cultură este dominantă prezența unor bacili cu vacuolizări intense în citoplasmă. Mărire: 20.000 X

Fig. nr. 4: Citoplasma celulelor hepatice de cobai inoculat cu M. phlei, arată o balonizare a celulelor, cu necroze celulare izolate. Ob. 20 X, Oc. 10 X



Fig. nr. 5: În ficatul cobailor inoculați cu M. phlei, care a fost cultivată în prezența acizilor nucleici de Candida, se găsesc infiltrații cu celule polimorfonucleare și necroze celulare izolate. Ob. 20 X, Oc 10 X

Rezultate

I. Incidența diferitelor tulpini de ciuperci la bolnavi cu tuberculoză.

Nr. crt.	Denumirea tulpinilor izolate	Numărul tulpinilor izolate din 241 de cazuri	
		Nr. absolut	%
1.	Genul candida	150	62,2
2.	Candida albicans	111	46
3.	Genul Geotrichum	20	8,3
4.	Genul Trichosporon	7	2,9
5.	Saccharomyces	9	3,7
6.	Genul Penicillium	45	18,7
7.	Genul Aspergillus	11	4,6
8.	Genul Mucor	12	4,9
9.	Genul Actinomyces	6	2,5
10.	Tulpini neidentificate	17	7
11.	Cazuri negative	54	22,3

III. *Rezultatele acțiunii acizilor nucleici asupra micobacteriilor*, dintre care unele au fost publicate în lucrările noastre anterioare (6, 8), ne permite formularea unor concluzii, ca:

a) Acizii nucleici heterologi, în concentrație de 1 %, favorizează creșterea tulpinilor HIN-R și M. phlei. Se constată totodată și prezența „cord-factorului“, care la tulpina martoră este absent. Dezvoltarea tulpinei H₃R_v este însă ușor inhibată atât de acizii nucleici comerciali, cât și de cel extras de noi din C. albicans.

Pe mediul geloză-ouă, în care au fost încorporați acizii nucleici, se constată o multiplicare rapidă a tulpinilor, în special în prezența acizilor nucleici obținuți din C. albicans. Pe lângă apariția „cord-factorului“, la M. phlei apar niște formațiuni filamentoase, acidoalcoolorezistente, asemănătoare miceliilor.

b) Examinarea tulpinilor de micobacterii, cu ajutorul microscopului electronic, arată că acizii nucleici de Candida și acizii nucleici comerciali modifică morfologia micobacteriilor, în sensul că pe lângă bacilii tipici, pot fi observate și bastonașe lungi, sau apar „pseudomicelii“. Pe alocuri pot fi găsite formațiuni care seamănă cu cele descrise cu ocazia fenomenului de înmugurire.

La tulpinile martore, cele descrise anterior, sint complet absente.

c) Dintre probele biochimice, reacția Dubos-Middlebrook a devenit pozitivă la tulpina HIN-R, față de tulpina martor — și mai slab la M. phlei.

IV. *Experiențe pe animale.*

Micobacteriile cultivate în prezența acizilor nucleici își modifică numai parțial caracterele de patogenitate față de cobai. Astfel, M. phlei cultivată cu acizii nucleici de Candida cauzează infiltrații celulare polimorfonucleare în țesutul hepatic și necroze celulare izolate. În splină apare îngroșarea trabeculelor splenice și micronoduli. Foarte rar se văd intracelular bacili acido-rezistenți. Tulpina originală de M. phlei nu declanșează leziuni apreciabile în organele cobailor.

Față de tulpina HIN-R martor, numai micobacteriile cultivate în prezența acizilor nucleici de Candida arată o patogenitate mai ridicată pentru cobai. În ficatul animalelor inoculate cu aceste tulpini apar infiltrații celulare, necroze, însă fără aspectul specific al nodulilor tuberculoși.

Creșterea patogenității tulpinei H₃₇Rv. față de animalele de experiență a fost evidentă în cazul în care inocularea cobailor s-a efectuat cu tulpini în prealabil cultivate pe medii cu acizi nucleici heterologi. Intensitatea leziunilor tuberculoase la aceste animale — față de cele găsite în lotul care a fost tratat numai cu tulpina originală — a fost gravă.

Discutarea rezultatelor și concluzii

Incidența crescută a genului *Candida* în sputa bolnavilor tuberculoși (62,2 %) pare a fi în legătură cu tratamentul prelungit cu antibiotice. Deși între gravitatea tabloului clinic și flora micotică nu s-a putut stabili o concordanță consecventă, în urma interacțiunii dintre genul *Mycobacterium* și genul *Candida* apar o serie de schimbări, privind aspectele morfologice, biochimice și biologice ale bacililor tuberculoși. Deși numărul trecerilor efectuate pe medii cu conținut de acizi nucleici nu a fost mare (în cazul M. phlei au fost efectuate 28 de treceri, iar în cazul H₃₇Rv și a tulpinei HIN-R, 19 treceri), rezultatele cercetărilor noastre pledează pentru rolul transformant al acizilor nucleici heterologi asupra unor tulpini de micobacterii.

Având în vedere că celulele levurice vii, ca și acizii nucleici obținuți din levuri, pot modifica caracterele micobacteriilor, necesitatea studierii interacțiunii dintre cele două genuri este întemeiată. Este cert, că în condițiile in vivo proporțiile cantitative dintre factorii care intră în interacțiune sînt cu totul diferite de cele reproduse pe calea experimentală, totuși substanțele care se eliberează în urma dezintegrării levurilor (polizaharizii și acizii nucleici) influențează condițiile de viață ale micobacteriilor. Menționăm că, cercetările lui Mankiewicz (1962) confirmă acțiunea favorizantă a polizaharizilor levurici asupra multiplicării micobacteriilor.

În concluzie părerea noastră este că acizii nucleici heterologi pot modifica nu numai ritmul de multiplicare al micobacteriilor, dar și caracterele lor morfologice, biochimice și de patogenitate, ceea ce ne atrage atenția ca în caz de boală să acordăm o importanță corespunzătoare nu numai factorului etiologic specific, dar și florei de „asociație“, cum ar fi reprezentanții genului *Candida*.

Sosit la redacție: 2 iulie 1971.

Bibliografie

1. CARGANI G., BRATTONI B.: Giorn. mal. infett. parass. (1957), 9, 7, 331;
2. CHIRTOC GH., LAZAR O., MARTIN A.: Viața med. (1958), 6, 549; 3. CORBELLİ G., ALLERGI L., CASAGLIA G., PULUZZI A.: Giorn. mal. infett. parass. (1958), 9, 753; 4. CONDART J. și colab.: Sem. Hôp. Paris (1957), 33, 49; 5. GONZALES-MENDOZA A.: Amer. Rev. Tuberc. (1958), 77, 3, 543; 6. LÁSZLÓ I., BOTH JULIANA, PÉTER M., REPOLSKI M.: Conf. de micologie, 5—7 nov. 1970, București, 41; 7. LÁSZLÓ I.: Date recente asupra diagnosticului de laborator al infecțiilor cauzate de micobacterii. Lucrare prezentată la ședința U.S.S.M., Filiala Mureș, 5 dec. 1959; 8. REPOLSKI MARIA: Acțiunea acizilor nucleici extrași din *C. albicans* asupra proprietăților biologice ale bacilului Koch, a XVI-a Ses. Cercurilor științifice studențești, I.M.F. Tîrgu Mureș, 15 mai 1971; 9. RIZESCU IOZEFINA: Ftiziologia (1960), 5, 457; 10. SADAKOVA E. A.: Terapeuticeskii Archiv (1961), 10, 71; 11. SCHILLER. cit. Egorov N. S.: Microbiologia (1952), 21, 1, 116; 12. SMOLIANSKAIA A. Z.: Journ. Microbiol. Epidem. Immunolog. (1962), 5, 45; 13. TERAYAMA KAZUO: Ref. Journ. Biol. LI (1960), 7, 94; 14. ZELICOVICI Z., KERCEA V., VOICULESCU R., PEREDERI S., MĂGUREANU E.: Viața med. (1959), 2, 133.