

CERCETAREA PATOGENITĂȚII TULPINILOR HEMOLITICE DE *ESCHERICHIA COLI* PE CULTURI DE CELULE.

Nota III.

dr. Monica Șabău, dr. A. Abrahám, dr. L. Domokos

Utilizarea culturilor de celule în studiul unor bacterii patogene, cu toate că nu a realizat față de mediile de cultură o treaptă superioară în diagnosticul de laborator, a contribuit totuși la elucidarea unor fenomene de bază ale patologiei experimentale, dintre care cităm efectele citotoxice ale toxinelor bacteriene asupra celulelor (3, 5, 6, 8, 9, 10, 18).

Unii autori (4, 16, 17), au reușit să demonstreze pe culturi de celule că tulpinile enteropatogene de *Esch. coli* spre deosebire de cele nepatogene produc efecte degenerative asupra celulelor.

În cercetări anterioare (15) am arătat și noi existența unei relații nete între proveniența tulpinilor hemolitice de *Esch. coli* și efectul degenerativ produs asupra culturilor celulare, în sensul că tulpinile izolate de la cazuri cu sindroame diareice produc distrugerea celulelor chiar la doza minimă de 10 germeni/ml. în timp ce tulpinile izolate de la copiii sănătoși nu produc acest efect.

De asemenea, am arătat că tulpinile izolate de la boțnavi, spre deosebire de cele izolate de la cei sănătoși, penetrează în celule, multiplicându-se abundent în citoplasma celulară (14).

Corelația dintre enteropatogenitatea *Esch. coli* și posibilitatea de penetrare a acestuia în celule a fost demonstrată de către Druker (2) pe segment de intestin de iepure ligaturat, precum și de Sarapova (17) pe culturi primare de rinichi embrionar uman. Autoarea arată că, cu cât tulpina este mai patogenă, cu atât numărul germenilor din interiorul celulelor este mai mare, iar efectul degenerativ mai intens.

Mai există posibilitatea ca efectele asupra culturilor de celule să fie produse de anumite substanțe toxice elaborate de tulpinile bacteriene.

În scopul de a demonstra dacă efectul obținut de sușele patogene de *Esch. coli* pe culturi de celule este un efect citopatic sau mai intervin și alți factori

MONICA SABĂU ȘI COLAB.: CERCETAREA PAILOGENITĂȚII TULPINIILOR
HEMOLITICE DE ESCHERICHIA COLI PE CULTURI DE CELULE



Fig. nr. 1: Cultură primară de embrion de găină. Colorația Giemsa. Ob. 10 X. Oc. 10 X



Fig. nr. 3: Cultură primară de embrion uman infectată cu endotoxina unei tulpini hemolitice, izolată de la copii sănătoși. Colorația Giemsa. Ob. 10 X. Oc. 10 X



Fig. nr. 2: Cultură de embrion de găină infectată cu endotoxina unei tulpini hemolitice, izolată de la copii cu enterocolită acută. Colorația Giemsa. Ob. 10 X. Oc. 10 X



Fig. nr. 4: Cultură de embrion de găină infectată cu factorul hemolitic al unei tulpini patogene (izolată de la bolnavi). Colorația Giemsa Ob. 10 X. Oc. 10 X

MONICA SAHAU ȘI COLAR: CERCETAREA PATOGENITĂȚII TULPINILOR
HEMOLITICE DE ESCHERICHIA COLI PE CULTURI DE CELULE



Fig nr 5: Cultură primară de embrion uman. Colorația Giemsa. Ob. 10 X, Oc. 10 X



Fig. nr. 6: Cultură primară de embrion uman infectată cu factorul hemolitic al unei tulpini patogene. Colorația Giemsa. Ob. 10 X, Oc. 10 X

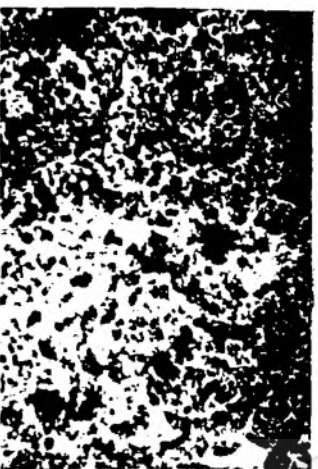


Fig nr. 7: Cultură R₁CA. Colorația Giemsa. Ob. 10 X, Oc. 10 X



Fig. nr. 8: Cultură R₁CA infectată cu factorul hemolitic al unei tulpini patogene. Colorația Giemsa. Ob. 10 X, Oc. 10 X

toxic — deci și efect citotoxic — am verificat acțiunea factorului hemolitic extras din tulpini de *Esch. coli*, pe diverse culturi de celule, comparativ cu acțiunea endo- și exotoxinei acelorasi sușe.

Material și metodă

Am utilizat în experiment sușe de *Esch. coli* hemolitic, a căror acțiune patogenă asupra culturilor de celule a fost testată anterior (15), izolate de la cazuri grave cu enterocolite acute, precum și sușe obținute de la copii sănătoși.

Cu factorul hemolitic, extras după metoda Smith modificată de noi (11) în cantitate de 0,2 ml pe tub, am infectat culturi primare de embrion de găină și embrion uman, precum și liniile celulare R₁CA, HeLa, KB. Am utilizat de asemenea și diluții ale factorului hemolitic cuprinse între 1/2 și 1/256. După 30 de minute de menținere în contact, am adăugat 1,8 ml mediu de menținere (Earle cu 0,5 % lactalbumină și 0,2% ser de vițe). Citirea s-a făcut la 6, 8, 24 respectiv 48 de ore de la infectare. După același procedeu am infectat culturi de celule cu endotoxinele bacteriene extrase după metoda Boivin-Mesrobeanu (1), precum și cu exotoxinele acelorasi tulpini (filtratele culturilor de 24 de ore).

Rezultate și discuții

Endotoxinele tulpinilor hemolitice de *Esch. coli* izolate de la bolnavi, pe care noi le-am considerat patogene chiar dacă prin mijloacele existente (seruri anticoli livrate de Institutul Cantacuzino București și seruri anticoli obținute de noi) nu am reușit să le identificăm structura antigenică, au produs deja la 6 ore un efect distrugător, caracterizat prin apariția de celule cu aspect stelat sau rotund, nucleul fiind fără structură. La 24 de ore acest efect s-a generalizat, majoritatea celulelor fiind distruse, rămânând din pinza celulară doar detritusuri (fig. nr. 1 și 2).

Efectul s-a menținut pînă la diluția de 1/256, avînd bineînțeles, o intensitate ceva mai mică.

Mesrobeanu și colab. (7, 8) au arătat că endotoxinele termolabile ale germenilor gram negativi sau cele solubile în urina bolnavilor cu infecții produse de acești germeni, prezintă o acțiune citotoxică intensă, rapidă și ireversibilă, cu desprinderea celulelor de pe pereții tubului de cultură, acțiune care se manifestă atît asupra liniilor celulare tumorale, cît și asupra celor normale.

Endotoxinele tulpinilor de *Esch. coli* hemolitic izolate de la sănătoși, precum și exotoxinele bacteriene indiferent de proveniența tulpinilor (sănătoși sau bolnavi) nu au produs efecte distructive, culturile infectate prezentînd același aspect ca și culturile martore (fig. nr. 3).

Fenomene asemănătoare cu cele produse de endotoxinele bacteriene au indus și factorii hemolitici extrași din tulpini izolate de la bolnavi. Astfel, la 24 de ore de la infectare, se observă pe culturi primare de embrion de găină o micșorare a prelungirilor citoplasmice, apariția de celule poligonale sau rotunjite, în final majoritatea celulelor desprinzîndu-se de pe pereții tubului (fig. nr. 4).

Aceleași modificări au apărut și pe culturile de embrion uman (fig. nr. 5 și 6) sau pe liniile celulare tumorale și R₁CA (fig. nr. 7 și 8).

Modificările celulare denotă că, factorul hemolitic are o acțiune citotoxică asemănătoare cu cea a endotoxinei termolabile, chiar dacă efectul citotoxic nu s-a manifestat atît de rapid, iar diluțiile pînă la care a apărut nu au fost atît de mari ca în cazul endotoxinei.

Acțiunea toxică a factorului hemolitic a fost de asemenea determinată pe animale (12) și pe ou embrionat de găină (13).

Ca și în cazul virusurilor, la infectarea culturilor cu factorul hemolitic, am observat că nu toate celulele prezintă o receptivitate egală. Ceea ce diferențiază însă efectul produs de acești factori toxici de efectul citopatic

viral, este faptul că, în primul caz celulele nereceptive rămân viabile și după 4 zile încep să manifeste o oarecare tendință de metabolism, în timp ce la virusuri efectul citopatic se desfășoară în lanț, ducând în ultimă instanță la distrugerea tuturor celulelor din pinza celulară.

Trebuie să subliniem faptul că și factorul hemolitic extras din unele tulpini izolate de la sănătoși a produs efect citopatic, care însă a apărut mai tardiv (48 ore), a fost de o intensitate mai mică, nu a apărut la diluții ale factorului hemolitic și s-a manifestat numai pe culturi primare de embrion de găină, ceea ce denotă că probabil aceste culturi sînt mai sensibile decît celelalte linii celulare utilizate de noi. La aceleași concluzii ajung și Mesrobeanu și colab. (9) privind endotoxinele termostabile ale germenilor gram negativi.

În concluzie autorii consideră factorul hemolitic ca un component toxic al celulei bacteriene, care ar putea contribui la mărirea patogenității tulpinilor ce dețin proprietăți hemolitice.

Sosit la redacție: 12 mai, 1970.

Bibliografie

1. BOIVIN A., MESROBEANU I., MESROBEANU L.: C. R. Soc. Biol. (1933), 113, 490; 2. DRUKER M., YEVIN R., SACKS T.: Israel J. Med. Sci. (1967), 3, 3, 445;
3. LEVADITI C., MÜTTERMILCH S.: C. R. Biol., Paris, (1913), 74, 379, 614, 1305; 4. LINDBERG B., YOUNG V.: Ann. N. Y. Acad. Sci. (1956), 66, 1, 100; 5. MESROBEANU I., GEORGESCO M., IEREMIA T., PAPAȘIAN E., DRĂGHICI D., MESROBEANU L.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. (1960), 19, 345; 6. MESROBEANU L., GEORGESCO M., IEREMIA T., MITRICA N., DRĂGHICI D., MATEESCO M.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. (1960), 19, 2, 161; 7. MESROBEANU L., MESROBEANU I., GEORGESCO M., DRĂGHICI D., ALĂMIȚĂ E., IEREMIA T.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. (1962), 21, 1, 19; 8. MESROBEANU I., MESROBEANU L., ALĂMIȚĂ E., DRĂGHICI D., GROGORESCO E., GEORGESCO M.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23, 3, 581; 9. MESROBEANU I., MESROBEANU L.: Microbiologia (1965), 5—6, 470; 10. POZSGI N., ANDREESCU V., DONA D.: Arch. roum. Path. exp. Microbiol. (1961), 20, 3, 431; 11. SABĂU M., DOMOKOS L., KAPUSI A., LUKÁCS E.: Rev. Med. (1967), 12, 1, 57; 12. SABĂU M., DOMOKOS L., ABRAHĂM AL., NAGY L.: Microbiologia (1966), 11, 1, 41; 13. SABĂU M., ABRAHĂM AL., TINKL S., DOMOKOS L.: Rev. Med. (1968), 14, 2, 170; 14. SABĂU M., ABRAHĂM AL.: Rev. Med. (1969), 15, 2, 180; 15. SABĂU M., ABRAHĂM AL.: Rev. Med. Ch. Iași (1969), 3, 667; 16. SAFRANOV A., FILIPOVAIA S.: Zh. Microbiol. (1966), 1, 81; 17. SARAPOVA T., GAVRILIUK B.: Zh. Microbiol. (1963), 8, 94; 18. SCHAEFFER W., GABLIKS J., CALITIS R.: J. Bact. (1966), 1, 21