

## FORMELE FILTRABILE ALE BACILULUI KOCH

### László I.

Problema formelor filtrabile ale bacteriilor a constituit un teren vast de cercetare pentru microbiologi atât în trecut cât și în prezent. La început cei mai mulți au cercetat dacă din filtratul bacterian se poate redobîndi pe calea culturilor sau inoculărilor la animale microorganismul inițial. Mulți au depreciat rezultatele obținute, socotindu-le drept produsul unor deficiențe tehnice. Studiul formelor filtrabile a luat un mare avînt atunci cînd s-a constatat că în condiții nefavorabile aproape toate bacteriile produc celule gigante, umflate, care descompunîndu-se în granule mici, pot trece prin filtrele bacteriologice, iar pe medii de cultură adecvate pot regenera din nou ca bacterii.

Formele printre care se găsesc formații gigante și granulare au fost numite de către primii lor descoperitori *Klieneberger* și *Sabin* organisme „L”. Primul a considerat însă formele gigante ca fiind simbioză străine în tulpina cercetată, dar mai tîrziu *Dienes* a dovedit că heteromorfismul unei bacterii arată diferitele faze de dezvoltare ale aceleiași agent patogen.

Forma filtrabilă a bacilului tuberculozei (mai jos Mt) a prezentat interes, în primul rînd, din punct de vedere al eredității tuberculozei (*Calmette*, *Valtis*, *Negre*, *Boquet*). După unele date forma bacilară a Mt nu poate trece prin placenta normală, în schimb forma filtrabilă poate trece prin placenta în corpul fetal, cauzînd moartea noului născut, puțin timp după naștere. A doua latură care a atras atenția cercetătorilor asupra formelor filtrabile (mai jos Ff) este rolul special datorită acestor forme în provocarea și decursul imbolnăvirilor tuberculoase. *Fontes* a fost primul care a dovedit și în mod experimental existența formelor filtrabile Mt. pe calea experimentelor de filtrare prin filtre Berkefeld. El a crezut însă că granulele Much sînt acelea care trec prin filtru. Într-o altă experiență filtratul unei

culturi de Mt obținut după filtrare printr-un filtru *Chamberland L*; a fost înșămînțat pe mediu Petroff în care au crescut colonii de Mt.

Prin modificarea mediului de cultura (*Vaudremer*) a reușit să obțină forme asemănătoare celulelor de levură și forme marante granulare, care trec prin filtrul *Chamberland L*. Observații asemănătoare au făcut și *Huuduroy* și *Besunçon-Durand* și *Vaudremer* au provocat îmbolnăvirea animalelor prin inocularea filtratului de puroi tuberculos. Ei au observat ca pe locul inoculării se formează o infiltrație trecătoare după care se produce o poliadenopatie și periadenita. *Vattis* a stabilit că formele filtrabile se pot găsi cel mai ușor pe suprafața mediilor Sauton și Bezredke a 8—10-a zi de cultura. *G. Sanarelli* și *A. Alessandrini* au cercetat in vivo Ff. au pus într-un sac de colodiu o suspensie de Mt., au scufundat acest sac într-un sac mai mare astfel ca între cei doi saci să fie mediul Sauton. Sacii manipulați în mod steril au fost implantați în cavitatea abdominală a unui cobai, examinând conținutul sacului exterior după 56—70 de zile. Cu ocazia cercetării s-au găsit granule neacido-rezistente care s-au transformat în bacili tuberculoși tipici, pe medii de cultura.

Unii autori sovietici ca *A. I. Borodenoc*, *H. I. Iumutov*, *S. L. Muromșev* susțin că formele filtrante se formează atît pe cale naturală cît și pe cale artificială, în urma acțiunilor traumatice care au atins celula bacteriană. *Muromșev* susține că transformarea Ff. în forme celulare este un fenomen de regenerare și nu face parte din ciclul normal al dezvoltării celei bacteriene. *G. P. Calina*, *Crestovnicova*, *Jurbina* și *Izmailova* identifică formele filtrabile cu virusurile. Aceste ipoteze vor fi însă elucidate numai prin cercetări ulterioare.

### *Cercetări personale*

Prezenta lucrare este de fapt o comunicare preliminară, asupra studiului Ff. Avînd în vedere ca majoritatea datelor din literatură susțin ca Ff. apar mai ales sub influența acțiunilor fizico-chimice, am încercat să cercetăm dacă Ff. apar în culturi ferite de orice acțiune exterioară. Pentru elucidarea problemei am mai folosit filtratul culturilor Mt. obținute pe medii lichide. Pentru cultivarea Mt-ului am folosit urmatoarele medii de cultura: Sauton, Sula, Besredka și Kirchner. Fiecare mediu a fost înșămînțat cu o cantitate de ansa norma luată din pelicula superficială a unei culturi foarte tinere de tulpini H<sub>37</sub> Rv. L-am pastrat în termostat 12 zile la 37°. După 12 zile am făcut frotiuri din medii, colorindu-le după Ziehl-Neelsen, Gram și Giemsa. Din frotiurile făcute din mediul Kirchner și Sula după colorare Ziehl-Neelsen, s-a văzut formarea unor conglomerate spirale de Mt., așa numitul „cord”, pe frotiul din mediul Sauton s-au găsit granule acido-rezistente foarte marunte. Pe frotiurile din mediul Besredka s-au văzut forme granulare colorate inegal. În frotiul colorat după metoda-Gram înafară de forme granulare s-au văzut și forme mici Gram negative. Colorația Giemsa nu a dat rezultate diferite față de cele două metode de colorație de mai sus.

### *Experiența de filtrare*

Pentru punerea în evidență a formelor filtrabile de obicei s-a folosit metoda de filtrare prin filtru *Chamberland L*. Avînd în vedere că rezul-

tatele pozitive descrise de autori au fost cauzate de deficiențele tehnice ale filtrelor, noi am utilizat metoda filtrării prin filtru Seitz EKST. Acest filtru, în cadrul experienței de control, nu a permis trecerea *Serratia marcescens*. Timpul de filtrare la fiecare cultură a durat 10—15 minute după care filtratele le-am însămițat pe medii de cultură care au rămas sterile și după 4 săptămâni. Controlul de sterilitate a filtratului a dat rezultate negative. În frotiul făcut din filtrate nu s-a găsit nici *Mt.* și nici alt microorganism. Având în vedere că filtratele nu au dat rezultate corespunzătoare în medii de cultură, am recurs la metoda de cultură pe țesuturi.

### *Cultura pe țesuturi*

S-a folosit mediul de cultură Maitland modificat pentru culturi tisulare, în care s-au pus bucați de splină de cobai.

1. Un mililitru de filtrat din cultură pe mediu Sauton s-a însămițat pe mediu Maitland. După trei zile lichidul clar se decantează în mod steril și se fac frotiuri și inoculări la animale. În frotiul colorat după Ziehl-Neelsen se văd granule violete, forme coccoide mărunte neacido-rezistente și acidorezistente. Colorația Gram scoate în evidența bacili mici Gram negativi.

2. Filtratul culturii *Mt.* obținut pe mediile Kirchner și Sula se amestecă în cantități egale apoi se însămițează pe mediu Maitland. Mersul cercetării este ca mai sus. Menționăm că cu prilejul fiecărei însămițări am făcut controlul sterilității. În frotiul colorat după Ziehl-Neelsen s-au găsit forme mărunte acido- și neacido-rezistente, iar pe frotiul colorat cu Gram s-au văzut forme mărunte coccoide Gram negative.

3. Filtratul culturii obținut pe mediul Besredka și însămițat pe mediu Maitland a dat următorul rezultat: în frotiul colorat cu Ziehl-Neelsen se văd granule violete și acido-rezistente însă colorația făcută după Gram prezintă forme Gram atât negative și pozitive cât și forme de colorare inegală.

### *Inoculări la animale. Experiența A.*

1. Filtratul Sauton însămițat pe mediul Maitland:

a) Din lichidul culturii tisulare s-a inoculat subcutanat 2 ml într-un cobai. Animalul inoculat trăiește după 11 luni.

b) Lichidul culturii tisulare +0,5 ml. sol. Twen 40 1:100 dil. (având în vedere că am observat în experiențele anterioare că substanța Twen 40 polyoxyaethylen sorbit monopalmitat ridică virulența *Mt.*, am încercat să folosim aceasta substanță și la studiul formelor *Ff.*) inoculat la un cobai, animalul moare după 10 luni de la data inoculării, iar în frotiurile făcute din splină și ficatul animalului se pot vedea bacili acido-rezistenți cu colorație granulară. Singele din cord este steril.

2. Filtratul Kirchner+Sula în cultura tisulară Maitland.

a) S-au inoculat subcutanat 2 ml. din lichidul clar al culturii tisulare. După 8 luni animalul prezintă cașecsie. Gîndindu-ne la leziuni tuberculoase sacrificăm animalul, însă atât examenul microscopic cât și cel microscopic au fost negative.

b) Lichid din cultura tisulară+0,5 ml. Tween 40 dil. 1:100 în cantitate totală 2 ml se inoculează într-un cobai. Animalul moare după 8 luni,

tabloul macroscopic fiind interesant îl prezentăm pe scurt : animal cașec-tizat la care se observă creșterea limfonodurilor inghinali în ambele părți de marimea unei nuci mai mici (menționăm că inocularea s-a făcut în plica inghinală). Ganglionii sînt moi iar pe suprafața de secțiune se văd conglomerate albicioase. Musculatura atrofică. Ficatul de culoare închisa cu desen accentuat. Splina mică, nu prezintă leziuni macroscopice. Pe peritoneu, care îmbracă capsulele renale, se văd tuberculi foarte mici de marimea unei gamălii de ac. Suprarenalele hipertrofiate. Plămîinii de culoare normală. La examenul bacteriologic al splinei, peritoneului și suprarenalelor s-au găsit bacili acido-rezistenți. În ganglioni s-au găsit bacili și coci acidorezistenți. Din organele animalelor s-au făcut emulsiile, acestea fiind inoculate la o serie de animale de experiență, însă aceste animale nu au prezentat nici o leziune specifică pînă în prezent.

3. Filtratul Besredka inoculat pe mediu Maitland.

a) Lichid de cultură tisulară 2 ml. inoculat subcutanat.

b) Lichid din cultură tisulară +0,5 ml. Tween 40 dil. 1:100 în cantitate totală 2 ml. inoculat subcutanat. Ambele animale traiesc după 11 luni de la inoculare. Din puținele analize de mai sus se poate deduce ca Ff. ale Mt. au nevoie de un timp mai îndelungat, pînă cînd pot atinge forma corespunzătoare tipică pentru Mt. Se pare ca substanța Tween 40 cu efect dispersant ridică efectul patogen al formelor filtrabile Mt. asupra cobaiului.

#### *Experiența B.*

Filtratul prin filtrul Seitz EKST al emulsiei făcute din ficatul cirotic al unui cobai inoculat cu bacilul Koch s-a inoculat intraperitoneal la 3 cobai în cantitate de doi ml. Un animal moare la șase luni după inoculare. La autopsie găsim ficatul și splina hipertrofiate în cavitatea abdominală ascită, pulmonii fiind umflați. Examenul bacteriologic a pus în evidență granule acido-rezistente din splină. Tabloul patologic seamănă cu cel provocat de formele filtrabile ale Mt-lui.

#### *Experiența C.*

S-a pus suspensie de Mt. în saci sterili de colodiu, iar aceștia au fost implantați în cavitatea abdominală a cobaiului. După 4—5 zile în mod steril am scos sacii din cavitatea abdominală a animalului și am analizat bacteriologic conținutul lor. Forme acido-alcool-rezistente nu s-au văzut aproape de loc, în schimb s-au văzut forme mici coccoide neacido-rezistente a căror cercetare este în curs.

#### *Experiența D.*

Cu Micobacterii saprofite. În această experiență am cercetat formele filtrabile ale M. phlei și ale unei tulpini pe care am izolat-o noi. În cadrul cercetărilor am obținut rezultate pozitive prin metoda culturilor tisulare.

#### *Rezumat*

În această comunicare preliminară am dat o scurtă privire în legătura cu studiul formelor filtrabile de Mt. dezvoltate în medii de cultură lichide. S-a stabilit că metoda culturii tisulare este bună pentru cerceta-

rea acestor forme. Inoculările la animale făcute cu lichidul culturilor tisulare confirmă uneori patogenitatea formelor filtrabile, mai ales atunci când adăugăm o substanță dispergantă Tween 40. Este probabil că apariția formelor filtrabile ale Mt-ului este în raport cu unele tulburări funcționale ale factorilor exo- și endogeni. Clarificarea acțiunii patologice a Ff. precum și frecvența lor în îmbolnăvirile tuberculoase necesită studii amănunțite în viitor.

*Sosită la redacție lu 15 iunie 1957.*

#### *Bibliografie :*

1 *Klieneberger și Sabin*: cit Doerr. 2 *R. Doerr, C. Hallauer*: Handbuch der Virusforschung II 1950. 3 *Dienes*, citează Sinkovics. 4 *Sinkovics*: A viruskutatás a'apjai. Budapest, 1954 Akadémiai K. 5. *Calmette*: L'infection bacillaire et la tuberculose. 4. -ième, édit. Masson et Cie. 1936. 6. *Valtis*: C. R. Soc. de Biol XCVI. 6. 376. 1926. 7. *Fontès*: cit Calmette. 8 *Vaudremer*: C. R. Soc. de Biol. 87.80. 1923. 9. *Hauduroy et Besançon*: Rev. de la tub 5. 215. 1924. 10. *Durand et Vaudremer*: C. R. Soc. de Biol. 90 916. 1924 11. *G. Sanarelli et A. Alessandrini*: Ann. Inst. Past. 50. 167. 1933. 12 *A. J. Borodeno*: Veterinarija No. 8/1952 33 old. 13 *H. J. Jumatov*: Mikrobiologija No. 55/1955 580. o 14 *S. E. Muromjev*: Jurnal Obšcei Biologii Nr. 3/1951 15. *G. P. Kalina*: cit. Muromjev 16. *Smorodincev*: Priroda Nr. 12/1953. 17. *V. Reynes*: Les éléments filtrables du virus tuberculeux. 1933. Paris. 18. *C. Panek*: Sur la cyclogénie et les propriétés de la forme filtrable du germe tuberculeux. La Presse Méd. 1939.

### ФИЛЬТРУЮЩИЕСЯ ФОРМЫ КОХОВСКОЙ ПАЛОЧКИ

Я. Ласло

Проведя четыре серии опытов, автор исследовал фильтрующиеся формы коховской палочки. Был подвергнут анализу штамм H<sub>37</sub>Rv. Помимо упомянутого штамма были исследованы также две сапрофитные микобактерии. Культуры выращенные на жидких средах были пропущены через фильтр Зейца ЕКСТ, а фильтрат засеивался на тканевые культуры. Фильтрат, культивированный на среде Майтленда и привитый животным, вызвал в двух случаях смертельный исход. Применяя фильтраты от других туберкулезных животных, удалось вызвать экспериментальный туберкулез. Сложный эфир Твин 40 усиливает патогенность фильтрующихся форм по отношению к морским свинкам.

### LES FORMES FILTRABLES DU BACILLE DE KOCH

I. László

En quatre séries d'expériences, l'auteur a examiné les formes filtrables du bacille de Koch. La souche examinée était la souche H<sub>37</sub>Rv. En dehors de cette souche on a encore examiné deux mycobactéries saprophytes. Les cultures, qui ont poussé sur des milieux liquides, ont été filtrées par le filtre Sertz EKST, le filtrat a été cultivé sur des cultures de tissus. Le filtrat cultivé sur milieu Maitland et inoculé aux animaux, a provoqué dans deux cas la mort des animaux. La bacille de Koch a été isolé dans les organes de ces animaux. Avec le filtrat provenant d'autres animaux, on a provoqué la tuberculose expérimentale. L'ester Tween 40 augmente le pouvoir pathogénique des formes filtrables, envers le cobaye.