

SINTEZA HEMOLIZINELOR ÎN DIFERITE CONDIȚII DE CULTIVARE LA BACILLUS CEREUS*)

**DR. MED. VET. RODICA MIRELA
CRASOVSCI — TUDOR**

Dintre bacteriile aerobe și sporulate, *Bacillus cereus* este singurul germen, în afară de *B. anthracis*, care dovedește o patogenitate potențială. Aceasta explică, desigur, atenția tot mai mare de care s-a bucurat acest germen în rindul cercetărilor, mai ales în ultimul deceniu.

Bacillus cereus este incriminat ca agent al unor toxiinfecții alimentare, atât în străinătate, cât și în țara noastră. Astfel, Hauge (1950) (cit. de 11), Christiansen, Koch și Madelung (1951) (cit. de 11), Buttiaux (1958) (11), Seidel (1959) (13), Nygren (1962) (12) și alții în străinătate și Costin (1962) (5), Jantea (1963) (8), Miloșescu (1964) (10), Birzu (3) și alții în România, descriu diferite episoade familiale sau izbucniri de toxiinfecții alimentare provocate de *B. cereus* și atrag atenția asupra potențialului patogen al acestui germen, considerat pînă nu de mult ca saprofit inofensiv.

O serie de cercetători studiază incidența *B. cereus* în diferite alimente ca lapte și produse lactate (7,14), carne tocată, mezeluri (6), efectuînd izolări și determinări cantitative.

B. cereus a fost izolat și din diverse infecții cu caracter local la om, îndeosebi în afecțiuni oftalmologice ca: keratite, conjunctivite, iridociclite, panoftalmii și abcese orbitale sau din alte diverse afecțiuni purulente umane (19). El a mai fost identificat în leziuni cutanate simulînd infecția carbunoasă (19), în lichidul pleural sau cefalo-rahidian (5).

Stopler și col. descriu în 1964 o bronhopneumonie cu evoluție septicemică letală la om provocată de *B. cereus* (19).

*) Prezentată în ședința de comunicări a Cercului Științific al Laboratorului Sanitar Veterinar jud. Tulcea din 12 aprilie 1971.

Infecții cu acest germen se semnalează și la animale. Astfel, Biancardi, în 1963 studiază 8 cazuri de mamită la vaci, identificind *B. cereus* ca agent etiologic (2).

Diverse variante ale *B. cereus* s-au dovedit patogene pentru viermii de mătase. Toumanoff și Vago (20), pe baza a numeroase cercetări experimentale, demonstrează rolul speciei *B. cereus* în etiopatogenia flașeriei viermilor de mătase. Leziunile histopatologice descrise de acești autori pledează pentru intervenția toxinei bacteriene în procesul patologic.

Universal răspândit *B. cereus* poate fi izolat cu ușurință din sol, praf, de pe plante, din apă, lapte și produse lactate, carne, mezeluri, precum și din diverse produse patologice supuse examenului bacteriologic. Dar, aproape perfectă sa asemănare morfologică și culturală cu *B. anthracis* ridică deseori problema diferențierii precise între aceste două specii, care prezintă atât de multe caractere comune, încît Smith (15), în baza a numeroase și minuțioase cercetări, propune chiar modificarea sistematicii bacteriene, astfel ca *B. anthracis* să fie numit *Bacillus cereus*, var. *anthracis*.

Numeroși cercetători au propus diferite teste de diferențiere între aceste două specii de aerobi sporiferi. Deși fiecare test prezintă valoare, se pare totuși că nici unul din ele, luat în parte, nu reușește să rezolve singur și întotdeauna această problemă și că numai coroborarea lor într-o cit mai largă participare oferă certitudinea diagnosticului.

Dintre principalele teste de diferențiere folosite în laboratoarele de specialitate, mi-am oprit atenția asupra testului patogenității pentru șoarece prin administrarea culturii pe cale respiratorie, test a cărui valoare am verificat-o în cercetările mele pentru studiul toxicității hemolizinelor la *B. cereus*.

Calea respiratorie, experimentată și recomandată de prof. Stamatin și col., este de 5 ori mai severă decît calea intravenoasă (18). În doză de 0,1 ml. cultură în bulion de 24 ore centrifugată, administrată intranazal la șoareci în prealabil anesteziați cu eter, *B. Anthracis* produce moartea animalelor după 2—7 zile, iar *B. cereus* după 1—5 ore. Din sînge și organe se pun în evidență bacili capsulați, dacă s-a administrat cultură de *B. anthracis*. În cazul *B. cereus*, germenii nu trec în circulația sanguină și nu se pot deci reizola din sîngele cardiac sau din organe. Prof. Stamatin (18) nu a observat la *B. cereus* nici o relație evidentă între sporogeneză și puterea patogenă, pierderea însușirii de sporogeneză nefiind întotdeauna însoțită de pierderea puterii patogene, fapt confirmat prin lucrarea de față, în care s-a folosit o mutantă asporogenă de *B. cereus*.

B. cereus produce o hemolizină, care este o substanță toxică elaborată de celula bacteriană, substanță capabilă să provoace liza hematiilor. Această hemolizină, denumită de Bernheimer (I) cereolizină și considerată ca unul din cei mai puternici agenți in vitro, este o pro-

teină (2, 9) ca și fosfolipaza aceluiași germen, dar deosebită totuși, căci aceasta din urmă nu este nici hemolitică și nici letală (1).

CERCETARI PROPRII

Producerea cereolizinei fiind considerată ca un caracter de patogenitate, am urmărit în lucrarea de față toxicitatea hemolizinei prin administrarea intranazală la șoareci, activitatea ei litică în diluții seriate asupra hematiilor de iepure și eventuala concordanță între patogenitate și hemoliză, hemolizina fiind obținută în diferite condiții de cultivare a *B. cereus*.

MATERIAL ȘI METODE

În toate experiențele s-a folosit mutanta Sp- a sușei 1196 A. de *B. cereus*, pusă la dispoziție de laboratorul Catedrei de Microbiologie și Imunologie a Facultății de Medicină Veterinară București. A fost aleasă această mutantă, întrucât absența sporogenezei facilitează eliminarea celulelor bacteriene.

Ca medii de cultură s-au folosit 5 variante de medii obișnuite, bulion și agar, cu concentrații diferite de peptonă și NaCl și anume :

- | | |
|----|--|
| 1. | Agar și bulion cu peptonă 10‰ și NaCl 5‰ |
| 2. | „ „ „ 2‰ „ 5‰ |
| 3. | „ „ „ 30‰ „ 5‰ |
| 4. | „ „ „ 10‰ „ 3‰ |
| 5. | „ „ „ 10‰ „ 8‰ |

Hemolizinele sintetizate de *B. cereus* s-au obținut prin următoarea tehnică de lucru : cultura în bulion de *B. cereus* de 24 ore, însămânțată în placa Petri după o termostatare de 18—20 ore, se centrifughează 25 minute la 3000 ture/min. După centrifugare, tubul prezintă pe fund un depozit alb compact, care reprezintă corpii microbieni, iar deasupra lichidul supernatant, clar, care conține hemolizina *B. cereus*.

Puterea patogenă a hemolizinei s-a determinat prin administrare intranazală la șoarece și activitatea litică față de hematiile de iepure (hemoliză).

La fiecare experiență s-au folosit câte 3 șoareci, în prealabil aneestizați cu eter și cărora li s-a administrat produsul toxic în doză de 0,1 ml. prin depunere cu picătura pe mucoasa nazală cu ajutorul unui ac fin, înlesnind astfel inspirarea rapidă de către șoarece a picăturii de lichid.

Totodată, se apreciază și activitatea litică a hemolizinei față de hematiile de iepure prin tehnica diluțiilor seriate, cu ajutorul suspensiei 0,5 % de hematii de iepure.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru determinarea potențialului patogen al hemolizinelor astfel obținute, s-au efectuat 144 de experiențe, împărțite în 5 grupe, fiecare grupă corespunzând uneia din cele 5 medii de cultură.

Au fost infectați prin această metodă în total 432 șoareci, din care au murit 269, deci 62,27 %.

Toate animalele infectate și care ulterior mureau, prezentau în viață în mod constant dispnee, primul semn care se instala după administrarea toxinei. Dispneea era însoțită de o perioadă de abatere, mai scurtă sau mai lungă, în raport direct cu durata de supraviețuire a subiectului, urmată apoi în majoritatea cazurilor de evidente semne nervoase, care apăreau întotdeauna brusc și se manifestau la cei mai mulți șoareci prin convulsii, căderi în decubit lateral și pedalări.

Unii prezentau rotiri în jurul axei longitudinale, alții sărituri bruște în înălțime, salturi peste cap sau mișcări în menaj. La câțiva s-au putut observa foarte frumoase mișcări ondulatorii ale coloanei vertebrale în sens antero-posterior sau poziția de arc a corpului cu deschiderea pe spate. Foarte multe cazuri prezentau exoftalmie. La peste 90% din șoareci, către sfârșitul manifestărilor clinice, apăreau spumozități de culoare albă, sau sanguinolente, mai mult sau mai puțin abundente, în jurul fosei nazale, câteodată și la gură rareori numai la gură (foto 1).

La autopsie, în toate cazurile era prezent edemul pulmonar, însoțit cel mai adesea de congestie, uneori foarte pronunțată, care cuprindea, în întregime sau numai parțial pulmonul.

Leziunile grave produse la nivelul pulmonului dovedesc efectul nociv al toxinei, care administrată pe cale respiratorie acționează direct asupra acestui organ vital, cu efect citotoxic asupra macrofagelor. Aceste celule, ca și sistemul fagocitar în general, avînd rol dovedit în apărarea pulmonului.

*Aprecieri asupra puterii
patogene a cereolizinei.*

În 84,7% din experiențe (din 144 total) au murit cel puțin unul din cei 3 șoareci infectați și în numai 15,3% din experiențe nu a murit nici unul (tabel nr. 2).

După cum rezultă din același tabel, în 56 de experiențe (38,89% din total) au murit 3 șoareci din 3 infectați, în 35 de experiențe (24,30%) au murit 2 șoareci din 3 infectați și în 31 de experiențe (21,53%) au murit unul din 3. Se poate reține deci că procentul cel mai ridicat îl deține grupa de experiențe în care toți șoarecii au murit.

Durata medie de supraviețuire a fost de 10—20 minute, în funcție de mediul de cultură folosit, cu limite de variație între 1—240 minute (tabel nr. 1).

Comparând rezultatele experiențelor privind potențialul patogen al hemolizinei sintetizate în diferite condiții de cultivare a *B. cereus*, se constată unele diferențe, în funcție de mediul de cultură folosit.

Astfel, procentul maxim de șoareci morți (100%) îl dețin în măsură egală, cele 2 grupe de experiențe, în care s-au folosit pentru sinteza hemolizinei mediile nr. 3 și nr. 5 (tabel 1, 3).

La aceleași grupe de experiențe s-au înregistrat și cea mai scurtă durată medie de supraviețuire (11 și respectiv 10 minute), precum și cea mai scăzută limită maximă de variație a duratei de supraviețuire (21 și respectiv 24 minute).

La celelalte 3 grupe de experiențe corespunzătoare mediilor nr. 1, 2 și 4 (tabel nr. 1 și 3) nu apar diferențe prea evidente între ele. Procentul de mortalitate al șoarecilor infectați variază între 51 și 55, iar durata medie de supraviețuire între 13 și 20 minute, cu limite de variație cuprinse între 1—240 minute.

Rezultă deci, că *B. cereus* sintetizează cantități mai mari de toxină în medii cu conținut ridicat de peptonă (30%) sau NaCl (8%) decât în medii cu 2% peptonă sau 3% Na Cl.

Din tabelul 1 mai rezultă că indiferent de mediul de cultură a *B. cereus*, durata medie de supraviețuire a șoarecilor infectați este cu atât mai redusă, cu cât numărul șoarecilor morți într-o grupă e mai mare.

Deci, puterea toxigenă a hemolizinei se poate aprecia atât prin numărul șoarecilor morți, cât și prin durata lor de supraviețuire.

Aprecieri asupra reacției de hemoliză

Odată cu experiențele privind puterea patogenă a hemolizinei s-au efectuat și 144 reacții de hemoliză. S-a obținut hemoliză totală pînă la diluția de 1/8. La diluția de 1/16 liza hematiilor era parțială (75—25%) sau lipsea cu totul.

Procentul cel mai ridicat de reacții cu hemoliză, între 50—75% la diluția cea mai mare a toxinei l-au înregistrat hemolizinele sintetizate

în mediile 3 și 5. Cea mai redusă putere litică o dețin hemolizinele obținute în mediile 2 și 4.

Corelația între puterea hemolitică și puterea patogenă a hemolizinei B. cereus.

S-a observat că, cu cât titrul hemolizinei este mai ridicat, cu atât numărul șoarecilor morți la o experiență cu aceeași hemolizină este mai mare, iar durata de supraviețuire a șoarecilor infectați este mai redusă.

Fără a exclude posibilitatea existenței unor variații între clonuri în ceea ce privește capacitatea lor de producere a hemolizinei, se poate afirma că există o corelație destul de strânsă, între puterea hemolitică și cea patogenă la aceeași hemolizină.

Din tabelul nr. 1 rezultă că hemolizinele sintetizate în mediile de cultură nr. 3 și 5 (cu exces de peptonă și respectiv cu exces de NaCl) au dovedit nu numai cea mai ridicată putere patogenă, dar și cel mai crescut potențial hemolitic.

Astfel, șarjele de hemolizine din mediile cu exces de peptonă și NaCl au omorât peste 80 și respectiv 93% din șoareci când aceeași toxină a produs hemoliză totală la diluția de peste 1/4, pe când hemolizinele din celelalte 3 medii, în aceleași condiții, nu au omorât decît 29—42% din șoareci.

Există deci o concordanță între activitatea in vivo și in vitro a toxinei sintetizate de *B. cereus*, patogenitatea toxinei acestuia putînd fi deci apreciată cu o exactitate satisfăcătoare numai prin teste in vitro (dozarea activității hemolitice).

CONCLUZII

1. S-a urmărit capacitatea speciei *B. cereus*, tulpina 1196 A., de a sintetiza toxina în 5 medii cu concentrații diferite de peptonă și NaCl și anume:

- | | | | |
|----|-------------|----|---------|
| 1. | Peptonă 10‰ | și | NaCl 5‰ |
| 2. | „ 2‰ | „ | 5‰ |
| 3. | „ 30‰ | „ | 5‰ |
| 4. | „ 10‰ | „ | 3‰ |
| 5. | „ 10‰ | „ | 8‰ |

Prezența toxinei în mediu a fost determinată prin inoculare la șoarece și prin dozarea hemolizinelor.

2. Toxina a fost administrată în doză de 0,1 ml. pe cale intranasală la 432 șoareci. Au murit 269 (62,27%) animale, durata medie de supraviețuire fiind de 15 minute, cu limite de variație cuprinse între 1—240 minute.

B. cereus sintetizează cantități mai mari de toxină în medii cu conținut ridicat de peptonă (30‰) sau NaCl (8‰) decît în medii cu 2‰ peptonă sau 3‰ NaCl.

Mortalitatea a fost de 100%, cu durată medie de supraviețuire 10—11 minute în cazul mediilor bogate în peptonă sau NaCl și de 51,11—55,55%, cu durată medie de supraviețuire 13—20 minute în cazul celorlalte medii.

3. Conținutul în hemolizine a fost examinat prin tehnica diluțiilor seriate, stabilindu-se ca titru maxim diluția de 1/8.

S-a constatat de asemenea că în mediile bogate în peptonă sau NaCl se găsesc cantități mai mari de hemolizină ca în mediul normal.

4. Se observă concordanța între activitatea in vivo și in vitro a toxinei sintetizate de *B. cereus*, patogenitatea toxinei acestuia putând fi deci apreciată cu o exactitate satisfăcătoare prin teste in vitro (dozarea activității hemolitice).

5. Se observă unele diferențe între clonuri privind capacitatea de producție a toxinei, aceasta fiind mai slabă la 15,28%, satisfăcătoare la 21,53% și bogată la 63,19% din clonuri.

BIBLIOGRAFIE

1. BERNHEIMER A. W. and GRASHOFF P. — Cereolisin: Production, Purification and Partial Characterization; *J. gen. Microbiol.* (1967), 46, p. 143—150.
2. BIANCARDI G. — Mastite acute bovina de *Bacillus cereus*. Segnalazione e studio di 8 casi; *Arch. veter. Italiana*, 1963, 14, p. 31—46.
3. BÎRZU ALEXANDRINA, GUȘIȚA CONSTANȚA, GĂLĂȚEANU M., ONCIU C., DÎNGĂ VI. — Toxiinfection alimentaire par *B. cereus*; *Etudes de laboratoire*.
4. BUTTIAUX R. — Les toxiinfections alimentaires provoquées par les „Staphylococci”, „Streptococci” et „Bacillus”; *Sem. Hop. Paris*, 1958, vol. 34, p. 911.
5. COSTIN I.D. — Toxiinfecții alimentare asociate cu *B. cereus* observate în Banat; comunicare, *Soc. Patol. infec. Timișoara*, 28 febr. 1962.
6. IONESCU G., IENIȘTEA C. și IONESCU C. — Frecvența *B. cereus* în carne tocată și mezeluri; *Microbi., Parazitol., Epidemiol.*, 1965, 10, p. 327.
7. IONESCU G., IENIȘTEA C., IONESCU C., IGNĂTESCU N., MAN T. și MANU V. — Frecvența *B. cereus* în laptele crud și laptele pasteurizat; *Microbiol., Parazitol., Epidemiol.*, 1966, 11, p. 423.
8. JANTEA F. — *Bacillus cereus* în declanșarea unor toxiinfecții alimentare; Probleme de Igiena alimentației, București, 1963, p. 81.
9. JOHNSON CH. E. and BONVENTRE P. — Lethal toxin of *Bacillus cereus*. I. Relationships and Nature of Toxin, Hemolysin and Phospholipase; *J. Bact.* 1967, vol. 94, nr. 2, p. 306—316, U.S.A.
10. MILOȘESCU P., MIHALIS Z., JANTEA F. — Două episoade de toxiinfecții alimentare cu *B. cereus*; *Viața Med.*, 1964, vol. 11, p. 1067.
11. NESTORESCU N., POPOVICI MARCELA — Toxiinfecțiile alimentare; *Buc., Ed. med.*, 1959, p. 184—187.
12. NYGREN B. — Phospholipase C. — Producing Bacteria and Food Poisoning; *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.*, 1962, p. 160.
13. SEIDEL G. — Über die bakteriellen Lebensmitelnesgiftungen; *Nahrung*, 1959, nr. 3, p. 305.
14. SIMONART P., POFFÉ R., WECK M. — *Bacillus cereus* et sa recherche dans le lait; XVI Int. Dairy Congress, 1962, vol. C., Section VII; p. 403—409.
15. SMITH N.R., GORDON R.E. and CLARK F.E. — Aerospore forming bacteria; *Agr. Monograph*. 16 U.S. Department of Agr., Washington, 1946 și 1962.
16. STAMATIN N. — Importanța speciei *B. cereus* pentru medicină și patologie comparată; *Rev. medico-chirurg. a „Soc. de med. și nat. din Iași”*, 1961 nr. 1, pag. 107—111.

17. STAMATIN N. — Le test phagique dans le diagnostic de souche chez *Bacillus anthracis* et *B. cereus*; *Revue Med. Vet.* 1968, vol. 119, nr. 12, p. 1119—1132.
18. STAMATIN N. et ANGELESCO S. — Pouvoir pathogène et toxicité de *Bacillus cereus*; *Annales de L'institut Pasteur*, 1969, 2, p. 210—217, Masson et C-ie Editeurs, Paris.
19. STOPLER T., COMNESCU V. VOICULESCU M. — Bronhopneumonie cu evoluție letală provocată de un microorganism din genul *Bacillus* (*B. cereus*); *Microbiol., Parazitol., Epidemiol.*, 1964, vol. 9, nr. 5, p. 457—460.
20. TOUMANOFF C. et VAGO C. — La nature de l'affection des vers à soie due à *Bacillus cereus* var. *Alesti*, Toum. et les modalités d'action de ce bacille; *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, p. 421—423.
21. TOUMANOFF C. et VAGO C. — L'agent pathogène de la flacherie des vers à soie endémique dans la région des Cévennes: *Bacillus cereus* var. *Alesti* var. nov.; *C. R. Acad. Sci.*, 1951, 233, p. 1504.
22. UNDERWOOD H.M., JAYNE WILLIAMS D. Y. — A comparison of two methods of assessing the *B. cereus* content of milk and its relation to „Bitty” cream formation; XVI Int. Dairy Congress, 1962, vol. C. Section VII: 1, p. 315—320.

Résumé

L'auteur cherche la capacité de l'espèce du *Bacillus céréus* type 1196 A. de synthétiser la toxine en ambiance à concentration différente de peptone et NaCl.

La présence de la toxine dans cette ambiance a été déterminée par inoculations par voie nasale aux souris et par la dosage de les hémolisines par la technique des dilutions sériées.

Dans les milieux contenant peptone et NaCl en grande quantité en différence de les milieux ayant de peptone et de NaCl en faibles quantités, *Bacillus céréus* synthétise de toxine en grandes quantités, la mortalité des souris est plus grande et la durée de leur survivance est réduite.

Sans tenir compte des conditions de développement du *Bacillus céréus*, existe une concordance entre le pouvoir hémolytique et le pouvoir pathogène des ses hémolisine.

Le pouvoir pathogène de la céréolisine peut être évaluée satisfaisant par des testes in vitro (le dosage de la capacité hémolytique).

Sinteza rezultatelor experiențelor privind reacția de hemoliză și puterea patogenă pentru șoarece a hemolizinelor sintetizate în diferite condiții de cultivare a *B. cereus*.

TABEL Nr. 1

Medii de cultură	Nr. de experiențe efectuate	Total șoareci			Nr. șoareci morți corespunzător diluției de toxină până la care s-a produs hemoliza totală.				Durata de supraviețuire (în minute)	
		Infecțati	Morți	%	1/1	1/2	1/4	1/8	Medie	Limita de variație
Agar și bulion cu 10‰ peptonă și 5‰ NaCl.	84	252	131	51,98	8	23	58	42	19	1—240
Agar și bulion cu 2‰ peptonă și 5‰ NaCl.	15	45	25	55,55	—	6	19	—	20	2—125
Agar cu bulion cu 30‰ peptonă și 5‰ NaCl.	15	45	45	100,00	3	6	30	6	11	2—21
Agar și bulion cu 10‰ peptonă și 5‰ NaCl.	15	45	23	51,11	1	9	10	3	13	2—40
Agar și bulion cu 10‰ peptonă și 8‰ Na Cl.	15	45	45	100,00	—	3	36	6	10	3—24
TOTAL	144	432	269	62,27	12	47	153	57	15	1—240

**Rezultatul experiențelor privind puterea patogenică a hemolizinei B. cereu,
indiferent de mediul de cultură folosit**

Nr. de șoareci morți din totalul celor in- fectați la o expe- riență	Numărul de ex- periențe efectu- ate	‰ din totalul ex- periențelor	Total șoareci		
			Infectați	Morți	‰
<u>3 din 3</u>	56	38,89	168	168	100,00
<u>2 din 3</u>	35	24,30	105	70	66,6
<u>1 din 3</u>	21	14,53	93	31	33,3
<u>0 din 3</u>	22	15,28	63	—	—
T O T A L .	144	100,00	432	269	62,27

Durata de supraviețuire a șoarecilor infectați după mediul de cultură în care a fost sintetizată hemolizina B.cereus și după grupa de experiențe

Grupa de experiențe	Nr. șoareci morți din totalul celor infectați la o experiență	Durata de supraviețuire a șoarecilor infectați după mediul de cultură în care a fost sintetizată hemolizina :				
		Bulion cu : 1‰ peptonă și 5 ‰ NaCl	Bulion cu : 2‰ peptonă și 5 ‰ NaCl	Bulion cu : 30‰ peptonă și 5 ‰ NaCl	Bulion cu : 10‰ peptonă și 3‰ NaCl	Bulion cu : 10‰ peptonă și 8‰ NaCl
		Durata medie	Durata medie	Durata medie	Durata medie	Durata medie
		Limita de variație	Limita de variație	Limita de variație	Limita de variație	Limita de variație
1.	3 din 3	11 1—54	10 2—18	11 2—21	7 4—10	10 3—24
2.	2 din 3	24 2—240	22 5—63	— —	10 4—19	— —
3.	1 din 3	25 6—80	58 24—125	— —	22 4—40	—