
Katedra i I Klinika Pediatryczna. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Teresa Gerkowicz

Teresa GERKOWICZ

Postacie L pałeczek *E. coli* i *Proteus* w doświadczalnym odmiedniczkowym zapaleniu nerek u szczurów

Штаммы L палочек *E. coli* и *Proteus* в экспериментальном пиелонефрите
у крыс

L-forms of *E. coli* and *Proteus* in Experimental Pyelonephritis in Rats

Bezobjawowy lub nietypowy w swym obrazie klinicznym i bakteriologicznym przebieg przewlekłego odmiedniczkowego zapalenia nerek (o.z.n.) sugeruje możliwą rolę nietypowych postaci bakteryjnych w etiopatogenezie tego schorzenia. W ramach badań nad rolą postaci L pałeczek *E. coli* i *Proteus* w rozwoju przewlekłego o.z.n. u dzieci, przeprowadzono również odpowiednie badania doświadczalne u szczurów.

MATERIAŁ I METODYKA

Odmiedniczkowe zapalenie nerek wywoływano doświadczalnie u szczurów białych, samców, wagi około 200 g. które zakażano wprowadzając domiedniczkowo zawiesiny form L pałeczek *E. coli* i *Proteus*. Utrwalone postacie L *Proteus* szczepu wzorcowego Dienesa przenoszono do hodowli na bulionie węglowym wg Lorkiewicza (1958) do wyjałowionego uprzednio moczu szczurów, do którego dodawano 0,3 M sacharozę. Nieustalone postacie L *E. coli* i *Proteus*, otrzymywane ze szczepów tych pałeczek, uzyskiwano z moczu chorych na o.z.n. wysiewanych na podłoża dla postaci L, uzupełniane metyciliną (dla konwersji form L *Proteus* i cycloseryną dla konwersji form L *E. coli*). Podłoża dla wzrostu form L przygotowywano wg Lederberga (1958). Zebrane mechanicznie z powierzchni agaru kolonie L zawieszano w uprzednio wyjałowionym moczu szczurów (wyjaławiano przez filtr Seitza), do którego dodawano 0,3 M sacharozę oraz odpowiednio metycilinę lub cycloserynę. Przed zakażeniem szczurów badano w mikroskopie kontrastowo-fazowym zawiesiny postaci L w moczu, a dla kontroli ich zdolności wzrostu i rozmnażania wysiewano je na odpowiednie podłoża.

Zawiesiny postaci L *E. coli* i *Proteus* po kilku godzinach inkubacji w temp. 37°C wstrzykiwano bezpośrednio do miedniczki nerkowej u 15 szczurów, podzielonych odpowiednio do rodzaju podawanych form L na trzy grupy, po pięć zwierząt każda.

Szczury zakażano w narkozie eterowej. Przy zachowaniu warunków jałowości pola operacyjnego podwiązywano moczowód lewy poniżej jego ujścia miedniczkowego, a następnie wstrzykiwano bezpośrednio do nakłutej cienką igłą miedniczki 0,1 ml zawiesiny form L. Trwale podwiązanie moczowodu utrzymano u 10 szczurów, u pięciu usunięto ligaturę po kilku godzinach. Z każdej grupy dekapitowano jedno zwierzę w czasie: 3 dni po zakażeniu i kolejno po upływie dwu, czterech, pięciu i sześciu tygodni. Usuwano obie nerki, przeznaczając jedną połowę każdej do badania bakteriologicznego, drugą do badania histologicznego.

Badania bakteriologiczne nerek obejmowały: a) bezpośredni posiew materiału pobranego eż z powierzchni przecięcia nerek na płytki ze zwykłym agarem odżywcym i agarem miękkim o składzie przewidzianym dla wzrostu postaci L; b) inokulację zmiążdżonej tkanki nerkowej w bulionie odżywcym i bulionie węglowym. Płytki i bulion inkubowano w cieplarni. Płytki oglądano w mikroskopie kontrastowo-fazowym w pierwszych 12 godz. kilkakrotnie, potem przez kolejne 10 dni jeden raz na dobę. Bulion zwykły i węglowy po 24—48 godz. inkubacji przesiewano na płytki z agarem miękkim, badając na nim wzrost postaci L codziennie do 10 dni.

Wszystkie badania mikroskopowe postaci L oraz zdjęcia preparatów odciskowych, niebarwionych wykonywano w mikroskopie kontrastowo-fazowym (mikroskop P.Z.O. przystawka do kontrastfazy — Zeiss).

BADANIA WŁASNE

Zakażenie wprowadzone bezpośrednio do jednej nerki spowodowało u wszystkich zwierząt powstanie i rozwój zmian zapalnych w obu nerkach. Szczury znosiły dobrze uraz spowodowany zabiegiem, a rozwijający się w wyniku zakażenia proces zapalny w obrębie nerek nie wpłynął na ich stan, wygląd i łaknienie. W okresie 6-tygodniowej obserwacji po zakażeniu nie padło żadne ze zwierząt.

Po trzech dniach od zakażenia zwierząt nieustalonymi postaciami L. *E. coli* i *Proteus* uzyskano dodatnie posiewy z tkanki obu nerek, pomimo że ograniczone do okolicy miedniczki naciekowe zmiany zapalne stwierdzono tylko w nerce pierwotnie zakażonej, tj. w nerce lewej. W tym czasie nie wykazano makroskopowych i mikroskopowych zmian zapalnych w nerce prawej. W 14 dniu po zakażeniu: w nerce lewej obserwowano dalsze narastanie zmian zapalnych, które były już wyraźnie zaznaczone również w nerce prawej. Kolejne badania histopatologiczne przedstawiły już równoległy rozwój i przebieg procesu zapalnego w obu nerkach badanych zwierząt. Bakteriologicznie uzyskiwano z obu nerek podobne wyniki posiewów zarówno na podłożach zwykłych, jak i podłożach dla form L.

Badanie mikroskopowe preparatów z nerek szczura zakażonego ustalonymi formami L *Proteus* w trzecim dniu po zakażeniu wykazywało prawidłowe utkanie nerki prawej oraz brak nacieków zapalnych w nerce lewej, w której obserwowano jedynie wyraźne poszerzenie światła cewek

zbiorczych z wtórnym zastojem moczu, spowodowanym przez utrzymane podwiązanie moczowodu.

Badanie w 14 dniu uwidoczniło wyraźne zmiany naciekowe, zapalne, umiejscowione w warstwie rdzeniowej i korowej obu nerek. Ten odczyn zapalny był szczególnie silnie wyrażony na pograniczu warstwy rdzeniowej i korowej nerek. Komórki nabłonka kanalików były obrzęknięte i wykazywały żywą proliferację ze zwiększeniem ilości jąder (ryc. 1). Podobną proliferację stwierdzono również w torebce Bowmana niektórych kłębków. W 3 tygodnie po zakażeniu zmiany zapalne utrzymywały się nadal w obu nerkach. W nerce prawej wykryto umiejscowione podtorebkowe mikroropnie, odpowiadające naciekom zapalnym z komórek jedno i wielojądrzastych (ryc. 2). 6 tygodni po zakażeniu: utrzymujące się nadal zmiany zapalne nie wykazywały tendencji do cofania się. Tym niemniej nacieki zapalne w warstwie korowej wydają się być mniej liczne, stwierdza się je głównie w części rdzeniowej na wysokości cewek zbiorczych. Kanaliki wykazują wyraźne poszerzenie światła, które wypełniają złuszczone komórki nabłonka (ryc. 3). W niektórych preparatach jest już wyraźnie widoczny przerost tkanki łącznej międzykanalikowej przy utrzymujących się nadal licznych naciekach zapalnych. Omawiane preparaty mikroskopowe z nerek wszystkich szczurów, niezależnie od tego, czy były one zakażone postaciami nieustalonymi *L. E. coli* i *Proteus*, czy postaciami ustalonymi *L. Proteus*, wykazywały podobne zmiany. Obraz histologiczny odpowiadał zmianom zapalnym, opisywanym jako typowe w o.z.n., wywołanym przez prawidłowe postacie bakteryjne, co należy podkreślić zwłaszcza w odniesieniu do zakażeń spowodowanych przez ustalone formy *L. Proteus*.

Prowadzone równoległe z histologicznymi, badania bakteriologiczne wykazywały dodatnie posiewy i rozwój zarazków w bulionach zwykłych i węglowych inkubowanych z tkanką nerkową. Natomiast w posiewach bezpośrednich, z materiału pobranego zę z powierzchni przekroju nerek tylko trzykrotnie uzyskano wynik dodatni. Pozostałe wykonywane w ten sposób posiewy pozostawały jałowe.

Posiewy uzyskiwane w okresie pierwszych czterech tygodni z nerek bezpośrednio zakażonych formami nieustalonymi *L* wykazywały charakterystyczny wzrost kolonii *L* typu B (na agarze miękkim). Na zwykłym agarze odżywczym obserwowano wzrost kolonii bakteryjnych, wykazujących, podobnie jak poszczególne komórki bakteryjne, bardzo żywy pleomorfizm. Posiewy z nerki prawej (wtórnie zakażonej drogą hematogenną) wykazywały na podłożach zwykłych obecność pałeczek *E. coli* i *Proteus* oraz typowy wzrost kolonii bakteryjnych. Również w tych koloniach stwierdzono duży pleomorfizm pałeczek.

Na podłożach dla form *L* omawiane szczepy tworzyły postacie *L*

i wykazywały wzrost kolonii L typu B, przy czym w pierwszych tygodniach na tych podłożach obserwowano również pojawianie się kolonii bakteryjnych nietypowych.

Ostatnie posiewy z nerek szczura zakażonego nieustalonymi postaciami L *Proteus*, wykonane po 6 tygodniach trwania stanu zapalnego, wykazywały rozwój hodowli analogiczny do obserwowanych i opisywanych poprzednio. Natomiast u szczura zakażonego nieustalonymi postaciami L *E. coli* posiewy z bulionu odżywczego na podłoża bakteryjne pozostawały w tym czasie (tj. po 6 tyg. zakażenia) ujemne. Posiewy z bulionu węglowego inkubowanego z badaną tkanką nerkową na podłoża dla form L wykazywały nadal wzrost kolonii L typu B, ilość tych kolonii była jednak wyraźnie mniejsza od ich liczby we wcześniejszych hodowlach. W punktacie z lewej, podwiązanej miedniczki nerkowej, oglądanym bezpośrednio w mikroskopie kontrastowo-fazowym obserwowano występowanie nielicznych postaci nitkowatych, form rozgałęzionych oraz pojedyncze twory kuliste, odpowiadające swym wyglądem ciałom obrzymim. Posiew tego punktu na podłoża dla postaci L pozwolił stwierdzić rozwój nielicznych kolonii typu B, a na podłożu uzupełnionym cykloseryną, obok kolonii typu B kilka kolonii typu A.

Należy podkreślić, że bardzo obfity wzrost kolonijny obserwowano jedynie w pierwszych tygodniach, natomiast w posiewach z tkanki nerkowej wykonywanych po upływie 5 i 6 tygodni trwania procesu chorobowego liczba rozwijających się kolonii była znacznie mniejsza. Posiewy z tkanki nerkowej szczurów zakażonych ustalonymi postaciami L *Proteus* wykazywały obecność tych form ich rozwój i wzrost kolonii L typu A (na podłożach dla postaci L). Na agarze odżywczym zwykłym obserwowano wzrost kolonii A tylko po przesianiu hodowli z bulionu węglowego. Przesianie materiału z bulionu odżywczego na podłoża zwykle agarowe nie pozwalało uzyskać wzrostu kolonii — podłoża pozostały jałowe. Bulion zwykły inkubowany z tkanką nerkową i wysiany na podłoża dla postaci L z metyciliną wykazywały obecność zdolnych do wzrostu postaci L, które na tych podłożach zapoczątkowywały rozwój kolonii typu A (ryc. 4).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Przedstawione badania, jakkolwiek przeprowadzone na małej grupie zwierząt wykazują, że nieustalone postacie L *E. coli* i *Proteus* oraz postacie ustalone L *Proteus* mogą warunkować u szczurów powstanie typowych w obrazie histopatologicznym zmian chorobowych, odpowiadających o.z.n. Zmiany morfotyczne stwierdzane w nerkach szczurów miały charakter zmian zapalnych uogólnionych, rozsianych w całym utkanie

nerki. Proces chorobowy wywołany przez omawiane formy L inkulowane do miedniczki jednej nerki nie ograniczał się tylko do tejże nerki, zakażonej bezpośrednio drogą wstępującą. U wszystkich badanych zwierząt analogiczne zmiany zapalne zostały wywołane w drugiej nerce, zakażenie to powstało więc prawdopodobnie drogą hematogenną. Badania wykonane w przebiegu tego zakażenia nie dostarczają dostatecznie przekonywających danych, czy u szczurów, u których wprowadzono domiedniczkowo nieustalone formy L, stwierdzane zmiany zapalne były wywoływane przez te formy L, czy przez typowe postacie bakteryjne, powstałe po rewersji *in vivo* form L. Dokładna analiza badań bakteriologicznych, pojawienie się na podłożach dla form L, obok kolonii typu B, nietypowych kolonii bakteryjnych sugeruje, że proces zapalny w nerkach wtórnie zakażonych był wywołany przez normalne postacie bakteryjne pałeczek *E. coli* i *Proteus*, przy czym w okresie pierwszych 4 tygodni trwania zapalenia rozwój tych bakterii przebiegał w prawidłowym cyklu rozwojowym. Obserwując powstanie i przebieg zmian zapalnych, obejmujących u wszystkich badanych szczurów, zakażonych ustalonymi formami L *Proteus*, obie nerki stwierdzono, że przebieg procesu zapalnego w swym obrazie mikroskopowym, jak też nasileniu zmian przedstawia charakterystyczne kryteria morfotyczne, uznawane za typowe w o.z.n. u ludzi i zwierząt doświadczalnych. Omawiane zmiany w pierwszych czterech tygodniach od wprowadzenia zakażenia odpowiadały histologicznie ostrej fazie zapalenia. Dość liczne, umiejscowione podtorebkowo, mikroropnie oraz charakterystyczny układ nacieków zapalnych, złożonych z komórek jedno i wielojądrzastych, stwierdzane u jednego ze zwierząt w nerce prawej wskazywały na hematogenną drogę zakażenia tej nerki. W warunkach przeprowadzonych badań doświadczalnych bezspornym jest wywołanie o.z.n. bezpośrednio i wyłącznie przez ustalone formy L *Proteus*. Podkreśla to celowość uwzględniania w rozważaniach nad etiopatogenezą przewlekłych o.z.n., również roli form bakteryjnych L zarówno ustalonych jak nieustalonych.

Wydaje się, że uznanie form L za postacie bakteryjne pozbawione cech i właściwości patogennych (Dienes 1963, Tulasne 1955, 1954) zaważyło w pewnym sensie hamując na zainteresowaniu klinicystów tymi postaciami i ich znaczeniem w patologii. Stosunkowo nieliczne prace wskazują jednak, że postacie L bakterii wywołują u zwierząt doświadczalnych niektóre schorzenia, np. zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u królików (Koptelowa, Pokrowski 1964). Niektóre także przewlekłe stany chorobowe u ludzi, w przebiegu których obserwuje się remisje i nawroty objawów klinicznych, wydają się być zwią-

zane z konwersją patogennych bakterii w ich formy L, przy czym ta konwersja *in vivo* może być indukowana przez czynniki endogenne i pozaustrojowe (antybiotyki).

Przetrwałe w tkankach formy L mogą ulegać rewersji do postaci prawidłowych komórek bakteryjnych, co odpowiadałoby klinicznym zaostreniom choroby, której łagodny i przewlekły względnie bezobjawowy charakter należałoby uważać za odpowiadające słabiej antygenowo czynnym formom L (Kagan, Erszew 1964, Klodnitskaja 1962, Liebermeister 1960, Lipnicki 1958, Michael, Braun 1959, Moustardier, Briscu, Perrey 1953, Nativelle 1957, Savenkova 1962, Szczegolew, Starszniowa 1964, Vigoureux, Hannoun 1956, 1957).

Nietypowy, często utajony przebieg przewlekłego o.z.n. trudności powstające w interpretacji badań bakteriologicznych moczu i ocenie ich wyników w powiązaniu z objawami klinicznymi sugerują, że ten przewlekły stan zapalny może być wyrazem zakażenia nie tylko przez prawidłowe postacie bakterii, lecz również przez ich formy L (Braude, Siemenski, Jacobs 1961, Gerkowicz 1965, Guze 1960, Vourekka 1951).

Przedstawione badania własne, wskazując na możliwość powstania o.z.n. u szczurów przez zakażenie zwierząt ustalonymi formami L *Proteus*, podkreślają podobną możliwość w patogenezie o.z.n. u ludzi. Z badań własnych (Gerkowicz 1965), jak też innych autorów (Hughes 1956, Liebermeister 1960, Smith 1964) wiadomo, że formy L bakterii znajdują korzystne warunki dla swego przetrwania, wzrostu i rozwoju w tkance nerkowej, zwłaszcza w obrębie warstwy rdzeniowej, której środowisko fizyko-chemiczne warunkuje dynamiczną zmienność rozwoju populacji bakteryjnej i postaci L.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Preparat z nerki szczura 2 tyg. po zakażeniu formami ustalonymi L. *Proteus*. Proliferacja jąder i obrzęk nabłonków kanalików. Naciek zapalny. Hemat.-eoz. $\times 600$.

Ryc. 2. Preparat z nerki szczura 3 tyg. po zakażeniu formami ustalonymi L. *Proteus*. Ropień. Hemat.-eoz. $\times 200$.

Ryc. 3. Preparat z nerki szczura 6 tyg. po zakażeniu formami ustalonymi L. *Proteus*. Zmiany degeneracyjne nabłonka kanalików. Hemat.-eoz. $\times 600$.

Ryc. 4. Kolonia L typ A. Tkanka nerkowa szczura. Agar + metycilina. Kontr.-faz. $\times 150$.

ПИСЬМЕННИЦТВО

1. Braude A., Siemenski J., Jacobs J.: Transact. Assoc. Am. Phys. **74**, 234—245, 1961.
2. Dienes L.: J. Bacteriol., **66**, 274—279, 1963.
3. Gerkowicz T.: Badania nad udziałem postaci L bakterii w patogenezie odmiedniczkowego zapalenia nerek u dzieci. Lublin 1965 (praca habilitacyjna).
4. Guze L.: Biology of Pyelonephritis, E. Kass, Boston 1960, 10—20.
5. Hughes W.: Bacterial Anatomy, University Press, Cambridge 1956, 343—356.
6. Kagan G., Erszew F.: Żurn. Mikrob. Epidemiem. Immunobiol., **41**, 101—105, 1964.
7. Kłodnitskaja N.: Żurn. Mikrob. Epidemiem. Immunobiol., **33**, 31—35, 1962.
8. Koptielowa E., Pokrowski W.: Żurn. Mikrob. Epidemiem. Immunobiol., **41**, 90—94, 1964.
9. Lederberg J., Clair J.: J. Bacteriol., **75**, 143—160, 1958.
10. Liebermeister K.: Annales New York Acad. Sc., **79**, 326—343, 1960.
11. Lipnicki B.: Post. Hig. Med. Dośw., 113—160, 1958.
12. Lorkiewicz Z.: Acta Microbiol. Pol., **7**, 11—16, 1958.
13. Michael J., Braun W.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **100**, 422—425, 1959.
14. Moustardier G., Briscu J., Perrey M.: Ann. Inst. Pasteur, **85**, 520—530, 1953.
15. Nativelle R.: Presse Med., **65**, 2163—2164, 1957.
16. Savenkova V.: Żurn. Mikrob. Epidemiem. Immunobiol., **33**, 91—94, 1962.
17. Smith P.: Bact. Rev., **28**, 97—128, 1964.
18. Szczegolew A., Starszniowa W.: Żurn. Mikrob. Epidemiem. Immunobiol., **41**, 15—19, 1964.
19. Tulasne R.: Biol. Med., **44**, 394—425, 1955.
20. Tulasne R., Lavillaureix J.: Compt. Rend., **148**, 2080—2082, 1954.
21. Vigoureux J., Hannoun G.: Ann. Inst. Pasteur, **91**, 912—927, 1956.
22. Vigoureux J., Hannoun G.: Ann. Inst. Pasteur, **92**, 112—122, 1957.
23. Voureka A.: Lancet, **1**, 28—31, 1951.

Otrzymano 30 IX 1968.

РЕЗЮМЕ

Крысы заражались восходящим путем через непосредственное введение штаммов *L.* палочек *E. coli* и *Proteus* в почечные лоханки после предварительного подвязывания соответствующего мочеточника.

Одностороннее введение палочек в почечные лоханки вызвало образование и развитие воспалительных изменений в обеих почках. Гистопатологические картины, обнаруженные в почках исследованных крыс, были похожими у всех животных, независимо от того, каким штаммом (неопределенными штаммами *L.* палочек *E. coli* или определенными или неопределенными штаммами *L.* палочек *Proteus*) было вызвано заражение. Воспалительные изменения не отличались от наблюдаемых при экспериментальном воспалении почек, вызванном правильными штаммами патогенных бактерий.

SUMMARY

Rats were infected in the ascending way by direct introduction of *E. coli* and *Proteus* L-forms into the renal pelvis following ligation of the corresponding ureter. Unilateral introduction of the bacilli into the pelvis caused the development of inflammatory changes in both kidneys. Histological pictures found in all the kidneys of the rats examined were similar irrespective of inflammation caused either by labile *E. coli* L-forms or stabile and labile *Proteus* L-forms. These inflammatory changes did not differ from those described in experimental pyelonephritis caused by normal forms of pathogenic bacteria.

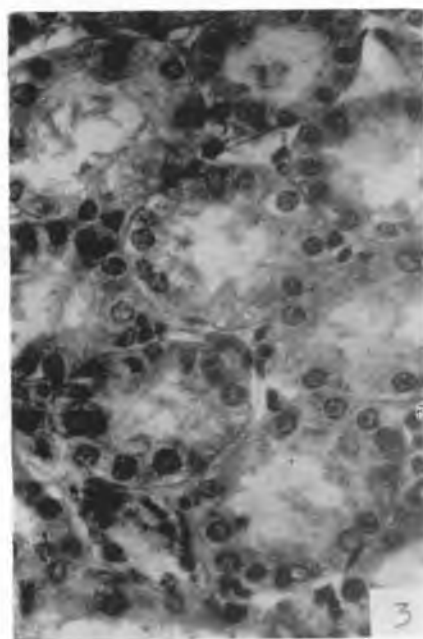
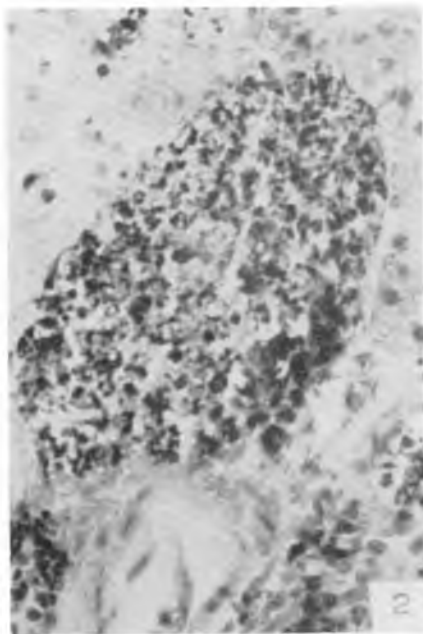
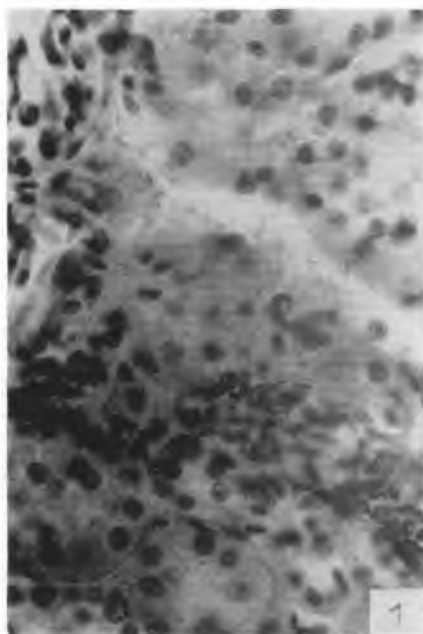
EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Kidney preparation of a rat 2 weeks after infection with stabile *Proteus* L-forms. Proliferation of nuclei and oedema of the *epithelium tubules*. Inflammatory infiltration.

Fig. 2. Kidney preparation of a rat 3 weeks after infection with stabile *Proteus* L-forms. Abscess.

Fig. 3. Kidney preparation of a rat 6 weeks after infection with stabile *Proteus* L-forms. Degenerative changes of the *epithelium tubules*.

Fig. 4. Colony L, type A. Renal tissue of a rat. Agar + methicillin.



Teresa Gerkowicz

