

# Studiu comparativ asupra evoluției ciclului eimerian în celulele membranei corioalantoidiene și intestinale

TIRIFON EUGENIA, ȘUTEU E.\*, DULCEANU N.\*\*, COZMA V.\*, BABA A.I.\*,  
TURCU D.\*\*\*, TEUȘDEA V.\*\*\*\*, MILITARU MANUELA\*\*\*\*\*, CĂTOI C.\*,  
MIRCEAN VIORICA\*, CERNEA CRISTINA\*, GHERMAN C.\*, ȘANDRU DANA\*,  
FIȚ N.\*, BĂDULESCU NICULINA\*\*\*\*\*

Institutul Național de Dezvoltare și Cercetare Chimico-Farmaceutice București

\* Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca

\*\* Facultatea de Medicină Veterinară Iași

\*\*\* I.C.P.B.M.V. București

\*\*\*\* S.C. Romvac S.A. București

\*\*\*\*\* Facultatea de Medicină Veterinară București

\*\*\*\*\* Institutul "Pasteur" București

## INTRODUCERE

Lucrarea subliniază rezultatele experimentelor "in vitro" privind evoluția ciclului vital eimerian în celulele membranei corioalantoidiene, comparativ cu evoluția "in vivo", în celulele intestinale. S-au înregistrat **diferențe** privind modul de parazitare al celulelor gazdă și localizarea stadiilor evolutive după eliberarea din celulă.

**Leziunile similare** au fost corelate cu stadiile evolutive parazitare: formarea vacuolei parazitare pentru stadiile de sporozoiți, trofozoiți; reacții de hiperemie, congestie, edem pentru stadiile de trofozoiți, merozoiți; leziunile hemoragice pentru fazele de eliberare a merozoiților din schizonți; leziuni de necroză pentru schizonți, gameți, oochisturi.

Histologic au fost reliefate leziuni necrotice cu localizări atât superficiale, cât și profunde, asociate cu exfoliere. S-a evidențiat hipertrofierea țesutului parazitat, ca reacție inflamatorie la acțiunea agenților parazitari.

## MATERIAL ȘI METODĂ

Embrionii de găină în vârstă de 10 zile au fost inoculați pe membrana corioalantoidiană cu suspensie de sporochisturi, în doză de 4.000 sporochisturi/ml.

Puii broiler în vârstă de 10 zile au fost infestați cu suspensie de oochisturi, în doză de 50.000 oochisturi/ml.

Pentru evidențierea evoluției ciclului vital eimerian și a modificărilor produse în **celulele membranei corioalantoidiene**, s-au parcurs etapele de examinare:

- ovoscopie - începând cu 72 ore post-inoculant (p.i.);
- macroscopie - începând cu 96 ore p.i, respectiv la 120,144,168,192,216,240 și 264 ore;
- stereomicroscopie – idem;
- histologie – la aceleași intervale de timp au fost recoltate pentru examen histologic, probe cu modificări macroscopice semnificative;
- microscopie electronică, cu efectuarea preliminară de preparate semifine la aceleași intervale de timp; prin examinarea microscopică a preparatelor semifine, s-au ales probe semnificative examinării electronomicroscopice.
- cântărirea membranelor corioalantoidiene la vârsta embrionară de 10,13,16 și 20 zile. Pe baza rezultatelor cântării membranelor, s-a apreciat **ritmul evolutiv al procesului inflamator**

**membranal** (R.E.P.I), obținut prin dezvoltarea ciclului vital eimerian.

Aspectul evoluției ciclului vital eimerian și a modificărilor produse **în celulele intestinale**, la 7 și 14 zile p.i., s-a reliefat prin:

- macroscopie intestinală, stabilirea scorului lezional intestinal, cu punctaj între 0-6;
- histologie intestinală pentru probele cu modificări macroscopice semnificative.
- cântărirea unor segmente ale tractusului digestiv (stomac glandular, stomac muscular, intestin subtire, cecumuri, cloacă):

## REZULTATE

Evoluția ciclului vital eimerian și modificările produse în **celulele membranei corioalantoidiene** s-a evidențiat prin.

**Examinarea ovoscopică** embrionară a relevat existența pe membrana corioalantoidiană a focarelor hemoragice bine conturate, cu localizare specifică și efect distructiv asupra structurii vaselor sanguine, provocând extravazare sanguină. Focarele hemoragice au produs compresiuni mecanice asupra zonelor membranale învecinate, care au devenit ischemice. Leziunile hemoragice s-au instalat prin eliberarea merozoizilor din schizonti.

**Examinarea macroscopică** membranală a reliefat aspectul lezional sub formă de puncte albe extinse pe toată suprafața și noduli albi pe traseul vaselor sanguine.

**Examinarea stereomicroscopică** a evidențiat existența nodulilor pe traseul vaselor sanguine, cu denivelarea acestora în zonele de separare - bifurcație, trifurcație.

Rezultatele examinărilor **secțiunilor histologice** membranale au redat aspecte lezionale corelate cu stadiile evolutive parazitare. Inițial, s-au evidențiat sporozoiți în faza de transformare în trofozoizi, cu tumefiere sporozoidală și început de formare a vacuolei parazitare- ca reacție de răspuns a organismului la acțiunea parazitului. Au prezentat localizare superficială în structura membranei, ca aglomerări trofozoidale, aspect redat în Figura 1. La 5 zile p.i. au fost relevate leziuni necrotice superficiale, cu distrugerea celulelor membranale și prezența structurilor reziduale celulare și parazitare, în Figura 2. La 11 zile p.i., după desfășurarea procesului evolutiv, stadiile parazitare – oochisturile s-au eliberat din celulă (ce a fost vacuolizată și conținea reziduri parazitare și celulare). Leziunile necrotice, degenerative au conferit membranei aspect exfoliant, redat în Figura 3. În funcție de gradul infestării membranale s-a observat predilecția localizării profunde a formelor parazitare, în apropierea zonelor din membrană irigate de vase sanguine și la nivelul celulelor vasculare. La 11 zile p.i. s-a relevat același **tropism de localizare în zona vaselor sanguine**, cu distrugerea structurii acestora și tendința de aglomerare a stadiilor parazitare sub formă de **plajă de trofozoizi și schizonti**, aspect redat în Figura 4.

Rezultatele **examinării electronomicroscopice** au relevat existența în structura merozoizilor a granulelor polizaharidice de amilopectină, delimitate de membrană dublă (în cadrul procesului de ectomeroγονie).

Rezultatele **cântării membranelor corioalantoidiene** și aprecierea ritmului evolutiv al procesului inflamator membranal - **R.E.P.I. membranal** au fost trecute în Tabel 1.

**Tabel 1**

Ritm evolutiv al procesului inflamator apreciat prin media greutateii membranale

Lot exp.	embr. 10 zile	embr. 13 zile	embr. 16 zile	embr. 20 zile	Medie greutate	R.E.P.I / lot
	înainte inoc.	48 h p.i./mg	120 h p.i./mg	216 h p.i./mg	mca/per exp.	per.exp./mg
IA - n.t.-8	362.6	836	3280	4713	2297.9	436
IB - n.t.-8	387.5	506	1850	3643	1596.62	320

per.exp. = perioada experimentală; IA = lot infestat; IB = lot neinfestat; n.t. = nr. total de membrane cântărite/lot; R.E.P.I. = Ritm evolutiv al procesului inflamator membranal.

Valoarea maximă a mediei greutatei membranale a fost la lotul infestat, de 2.297 mg. Valoarea minimă a mediei greutatei membranale a fost la lotul neinfestat, de 1.596 mg..

Rezultatele **examenului histologic** privind aspectul evoluției ciclului vital eimerian și modificările produse în **celulele intestinale**.

În duoden au fost redată zone **congestiv-hemoragice**, cu infiltrat eozinofilic intens în corion și forme eimeriene invazionale, înconjurate de **vacuole parazitare** - sporozoiți,

trofozoiți în celulele epiteliale din Figura 5. În cecum au fost reliefate **hemoragii punctiforme**, cu extindere pe toată suprafața corionului, corespunzând eliberării merozoizilor din prima generație. În epiteliul cecal au fost evidențiați schizonți și infiltrat cu mononucleare și eozinofile în submucoasă, în Figura 6. Tot în cecum au fost reliefate glande cu oochisturi, **glande chistizate**, cu epiteliul **necrozat** și/sau aplatizat, plină cu material necrotic, eozinofile și oochisturi. În corion s-a relevat infiltrație limfocitară, aspect redat în Figura 7.

**Figura 1**

Histologie la 3 zile p.i. Trofozoiți cu localizări membranale superficiale, înconjurați de vacuole parazitare

**Figura 2**

Aspectul inițial de necroză cu structuri reziduale celulare și parazitare

**Figura 3**

Aspect lezional cu exfolierea membranei după eliberarea oochisturilor

**Figura 4**

Plajă de trofozoiți și schizonți cu localizare în apropierea vaselor de sânge, la 11 zile p.i. (ob. X100)

**Figura 5**

Zone congestiv-hemoragice în duoden; în celulele epiteliale- sporozoiți, trofozoiți înconjurați de vacuole parazitare (TM X1000)

Rezultatele **cântării tractusului digestiv**. Valoarea maximă pentru tractusul digestiv cântărit a prezentat-o lotul infestat, de 248,8g/pui. Valoarea minimă a tractusului digestiv a prezentat-o lotul neinfestat, de 151,4g/pui.

## DISCUȚII

Celulele membranale pentru care eimeriile prezintă grad mare de specificitate, sunt de natura epitelială, ca și cele intestinale (Doran, 1970). Prin rezultatele obținute au fost comparate leziunile intestinale și membranale produse de evoluția ciclului vital eimerian. Astfel, a fost

stabilită existența aspectelor similare și diferite în cele două moduri de parazitare.

**1. Ovoscopic**, faza de eliberare a merozoizilor din schizonți a produs leziuni hemoragice, inițial sub formă de puncte hemoragice, care s-au unit ulterior în focare hemoragice.

**2. Stereomicroscopic și macroscopic** s-a relevat tropismul localizării eimeriilor în structura vaselor sanguine. Acestea au prezentat îngroșări, denivelări, cu noduli proeminenți pe traiectul lor.

### Figura 6

Cecum - aspect lezional hemoragic cu extindere pe toată suprafața corionului; schizonți în epiteliu și infiltrat cu mononucleare și eozinofile în submucoasă (TM X200)

### Figura 7

Cecum - glandă chistizată, cu epiteliul necrozat și/sau aplatizat, cu material necrotic, eozinofile și oochisturi; infiltrație limfocitară în corion (TM X400)

**3. Electronomicroscopic**, reliefaș granulelor polizaharidice de amilopectină în merozoizi în cadrul procesului de ectomerogonie, confirmă datele din literatură referitoare la asigurarea motilității sporozoiților și merozoizilor de către amilopectină, ce reprezintă sursa de energie necesară penetrării celulei parazitare (Ruff, 1998).

## 4. Histologic

**4.1. Aspecte similare în procesul evolutiv al speciilor de *Eimeria* in vitro și in vivo**

**4.1.a. Sporozoiții și trofozoizii** prin invadarea celulelor, ca și reacțiile celulare de răspuns la agresivitatea parazitare, produc modificări de **congestie**, edem, cu formarea **vacuolei parazitare**. Conform literaturii, vacuola parazitare reprezintă reacția de apărare a celulelor intestinale, la acțiunea parazitului, iar membrana vacuolară este produsă de către citoplasma celulei parazitare (Scholtyseck, 1969)

**4.1.b. Merozoizii** prin eliberarea lor din schizonți I sau II (care parazitează celula intestinală sau membranală), produc leziuni **hemoragice**. Fazele

de schizonți I și II, precum și eliberarea merozoizilor reprezintă stadiile cu patogenitate maximă, prin acțiunea mecanică exercitată (Scholtyseck, 1969).

**4.1.c.** Evoluția formelor **schizogonice, gametogonice și oochistale** în celulele parazitare a produs leziuni **necrotice**. Aceste leziuni au fost superficiale sau profunde, în funcție de gradul de infestare și perioada de timp postinfestantă.

*In vitro* – leziunile necrotice au fost evidențiate în trei faze degenerative, în funcție de stadiile dezvoltării ciclului vital, de modul și gradul de infestare membranală.

**Aspectul inițial de necroză** la nivel celular, în diferite stadii degenerative de tip granulo-vacuolar, cu localizare la nivelul straturilor celulare superficiale, corespunzător primelor faze evolutive parazitare. S-a relevat inițial, parazitarea, necrozarea și vacuolizarea celulelor, iar după eliberarea paraziților din ele, s-au menținut în citoplasmă, structuri reziduale celulare și parazitare.

**Leziuni de necroză asociate cu exfoliere, dilacerare.** După evoluție, stadiile parazitare s-au eliberat din celulă. În structura membranei s-a produs dislocare, dilacerare, conferindu-i acesteia aspect exfoliant.

**Leziuni necrotice profunde, în structura vaselor sanguine, datorită tropismului localizării parazitare în zona membranală intens vascularizată.** În funcție de gradul infestării membranală și stadiul evolutiv, formele parazitare s-au localizat profund, în structura vaselor sanguine (la stadii evolutive avansate au corespuns localizări profunde). Procesul de necroză și scleroză din vasele sanguine a condus la îngroșarea și denivelarea acestora, cu existența de noduli pe traiectul lor. Aspectul necrozant a fost similar literaturii, privind cele două tipuri de leziuni membranală: mari, pe traiectul vaselor sanguine și mici, în structura membranei (Long, 1972).

*In vivo* – leziunile necrotice s-au evidențiat în două variante de localizare.

Localizare superficială, la nivelul celulelor epiteliale cecale, cu necroze în prezența schizonților.

Localizare profundă, în cecum, lângă vasele sanguine din mușchii circulari, unde prin evoluția oochisturilor s-au produs necroze în epiteliul vilozităților, cu îngroșarea acestora, datorită hipertrofiei și hiperplaziei celulelor parazitare. Schizonții afectează corionul, membrana bazală a epitelului intestinal și glandular, epitelii vasculare. Tropismul localizării în structura vaselor sanguine a fost reliefat electronomicroscopic pe membrana corioalantoidiană. În cecum, evoluția oochistală produce necroză la nivel glandular, cu chistizarea acestora. Conform literaturii, la nivel intestinal există posibilitatea de regenerare tisulară, prin înlocuirea țesutului specific intestinal, cu țesut de tip conjunctiv, prin **procesul de cicatrizare** (Dulceanu, Terinte, 1994; Long, 1974).

**4.1.d. Fenomenul de exfoliere membranală** este similar celui intestinal, la nivel de mucoasă și epitelium. Conform literaturii, acesta se asociază cu formarea de structuri fibrinoase (alcătuite din reziduuri celulare), constituite prin menținerea contactului straturilor exfoliate cu substratul de bază, printr-o rețea de fibrină (Long, Rose, 1976).

**4.1.e. Aspectul lezional nodular și de inflamare (îngroșare) a țesutului parazitat - schizonții, merozoizii și oochisturile** produc reacții de **hipertrofie, hiperplazie** la nivel celular (intestinal sau membranal).

*In vitro* – datorită hipertrofiei și hiperplaziei celulelor parazitare din structura pereților vaselor sanguine și a membranei, s-a produs inflamarea vasculară și membranală, cu instalarea în final a leziunilor de necroză și scleroză, aspect redat atât stereomicroscopic, pe vase de sânge izolate, cât și prin valorile R.E.P.I.

*In vivo* – s-a produs chistizarea glandelor cecale, în asociere cu inflamarea (îngroșarea) mucoasei intestinale, aspecte relevate și prin valorile diferite ale greutateii tractusului digestiv. Rezultatele corespund literaturii, privind îngroșarea mucoasei intestinale, chistizarea glandelor, ca și localizarea profundă a stadiilor gametogonice și oochistale, cu hipertrofia, hiperplazia, necroza vaselor sanguine și îngroșarea peretelui cecal. Procesele necrotice și inflamatorii (cu extindere pe aproximativ 80% din suprafața zonei cecale distale) produc mărirea în volum a cecurilor (Dulceanu, 1980).

## 4.2. Aspecte diferite în procesul evolutiv al speciilor de *Eimeria in vitro* și *in vivo*

### 4.2.1. Modul de parazitare al celulelor gazdă

*In vitro* – rezultatele au reliefat că atât datorită structurii membranale unistratificate, cât și absenței fluxului intestinal și a macrofagelor (transportoare de stadii parazitare), modul de parazitare a relevat continuitate în celulele adiacente. Astfel, s-a realizat modul de parazitare “din celulă în celulă apropiată”, similar celui în focare - “patchy type”, din culturi celulare. În experiment, mobilitatea merozoidală a fost asigurată de amilopectina din structura lor, conform literaturii (Ruff, 1998).

*In vivo* – există sistemul de “parazitare la distanță”, de către stadii evolutive apropiate, datorită transportului pasiv al acestora de către fluxul intestinal, macrofage sau limfocite (Pattillo, 1959; Lawn și Rose, 1982).

S-a relevat modul de parazitare intestinală, în profunzime, până la musculoasă, cu transportarea sporozoiților și merozoiților de către macrofage, iar evoluția oochistală a produs chistizarea glandelor cecale, asemănător datelor din literatură (Dulceanu, 1986).

### 4.2.2. Localizarea stadiilor evolutive după finalizarea parazitării celulei gazdă

*In vitro* – după evoluția fiecărui stadiu parazitar, celula a fost distrusă, vacuolizată, cu formarea în citoplasmă, de structuri reziduale celulare și parazitare. După eliberarea din celulă, s-au produs “aglomerări ale stadiilor parazitare” în spații extramembranale, în lichidul alantoidian, sau în lumenul vaselor sanguine, sub formă de plajă de merozoiți, sau de trofozoți și schizonți. În culturi celulare se formează **cuiburi de gametocite**, fenomen inexistent în intestin (Long, Wisner și Rose, 1972).

*In vivo* nu s-a evidențiat acest fenomen, datorită atât transportului pasiv al paraziților, de fluxul sanguin, sau limfocite și macrofage, cât și parazitării în profunzime a structurii intestinale, în condiții relativ favorabile dezvoltării parazitului.

## CONCLUZII

1. Prin **examinările ovoscopice** pe ouă embrionate infectate, cu relevarea diversității leziunilor membranale (puncte și focare hemoragice, zone ischemice), s-a evidențiat realizarea ciclului vital eimerian în celulele membranale și ale vaselor sanguine.

2. **Stereomicroscopic** s-a reliefat tropismul localizării parazitare în structura pereților vaselor sanguine și leziuni inflamatorii cu sclerozarea țesutului parazitat.

3. **Macroscopic** s-a relevat apariția punctelor hemoragice, care corespund momentului eliberării merozoiților din schizonți.

4. **Electronmicroscopic** s-a evidențiat în procesul ectomerogoniei, existența granulelor polizaharidice de amilopectină în merozoiți. Acestea au asigurat motilitatea redusă a merozoiților *in vitro*, cu apariția fenomenului aglomerării elementelor parazitare.

5. **Histologic.** *In vitro* și *in vivo* s-au evidențiat leziuni similare, ce au corespuns aceluiași stadiu evolutiv eimeriene.

### Similitudini (analogii) de tip lezional

Formarea vacuolei parazitare a fost valabilă pentru stadiile de sporozoiți și trofozoți.

Reacțiile de hiperemie (congestie), edem, au fost produse de trofozoți, merozoiți.

Leziunile hemoragice au fost produse de către merozoiții eliberați din schizonți I sau II.

Leziunile necrotice au fost produse de formele schizogonice, gametogonice și oochistale, cu localizare superficială, profundă, asociate cu exfoliere.

Inflamarea țesutului parazitat, ca reacție locală a organismului (hipertrofie, hiperplazie) la acțiunea agenților parazitari a fost evidențiată în membrană și intestin, în special în cecumuri. Consecința evoluției procesului inflamator a reprezentat-o creșterea în greutate a țesutului parazitat – intestinal și membranar (exprimată prin valoarea superioară pentru ritmul evolutiv al procesului inflamator membranar și pentru tractusul digestiv).

**Diferențele** celor două variante de parazitare au constat în:

Modul de parazitare al celulelor gazdă *in vitro* a prezentat continuitate în celulele adiacente, fiind **“din celulă în celulă apropiată”**. *In vivo* s-a relevat modul de **parazitare în profunzime**, până la musculoasă și chistizarea glandelor cecale.

Localizarea stadiilor evolutive după parazitarea celulei gazdă *In vitro*, datorită motilității merozooidale reduse s-au produs **“aglomerări ale stadiilor evolutive parazitare”** în spații extramembranale, în lichidul alantoidian, sau în lumenul vaselor sanguine, sub formă de plajă de merozoizi sau de trofozoizi și schizonti. *In vivo* nu s-a relevat acest fenomen, atât datorită transportului pasiv al paraziților, de către fluxul sanguin, sau limfocite și macrofage, cât și posibilității parazitării intestinale în profunzime.

## SUMMARY

**Comparative study upon the development of *Eimeria's* cycle in the chorioallantoic membrane and intestinal cells**

The paper emphasizes the experimental results performed *“in vitro”* concerning the development of *Eimeria's* vital cycle in comparison with the same cycle *“in vivo”*, in intestinal cells. There have been registered some **differences** regarding the parasitic way of the host cells and the placement of the evolutive stages after their releasing. There were registered **similar lesions** that had been correlated with certain development states of *Eimeria sp.*: the proceeding of the parasitic vacuole, for the sporozoites and trophozoites phases; the hyperemia and congestion reactions, for the trophozoitic and merozoitic states; the hemorrhagic lesions, for the releasing of merozoitic state from the schizont; the necrotic lesions made by the oocyst and gamont states.

By histological methods there were emphasized necrotic lesions in deep and shallow areas, in association with the exfoliation process. The hypertrophying reaction of the parasitic tissue was highlighted as a inflammatory reaction towards the parasitic aggressiveness.

## BIBLIOGRAFIE

- DORAN D.J., 1970. Effect of age and freezing on development of *Eimeria adenoides* and *E. tenella* sporozoites in cell culture. Journal of Parasitology, vol. 56, nr.1-3, p.27.
- DULCEANU N., 1980. Coccidioze și alte sporozooze la animale. Edit. Ceres, București, p.9-80.
- DULCEANU N., 1986. Parazitozele animalelor de fermă. Edit. Ceres, București, p.34-60.
- DULCEANU N., CRISTINA TERINTE, 1994. Parazitologie veterinară, vol.I, Edit. Moldova, Iași, p.56-74.
- LAWN A.M. and ROSE M.E., 1982. Mucosal transport of *E. tenella* in the cecum of the chicken. J. Parasitol. 68 (6), 1117-1123.
- LONG P.L. and ROSE M.E., 1972. Immunity to coccidiosis, effect of serum antibodies on cell invasion by sporozoites of *Eimeria in vitro*. Parasitology, 65, p. 131-136.
- LONG P.L., 1972. *Eimeria tenella*: reproduction, pathogenicity and immunogenicity of a strain maintained in chick embryos by serial pasage. J., Comp. Pathol., 82, 429.
- LONG P.L., 1974c., Further studies of *Eimeria tenella in vitro* in macrophage from chicken peritoneal exudates. Z. On the pathogenicity and immunogenicity on the embryo adapted strain of *E. tenella*. Avian Pathol. 3, p. 225-268.
- LONG P.L., ROSE M.E., 1976. Growth Parazitenk., 48.
- PATTILLO W.H., 1959. Invasion of the caecal mucosa of the chicken by sporozoites of *Eimeria tenella*. Journal of Parasitology, 45, 253.
- RUFF M.D., FREDERICKSEN T.L., DANFORTH H.D., 1998. *In ovo* vaccination against *Eimeria tenella*. Poultry Sci., 67-147.
- SCHOLTYSECK E., 1969. Electron microscope studies of the effect upon the host cell of various developmental stages of *Eimeria tenella* in the natural chicken host and in tissue cultures. Acta Veterinaria (Brno), 38, p. 153-156.

