

Clinica de boli infecțioase (cond.: prof. L. Kelemen) și Institutul de epidemiologie
(cond.: prof. L. Boér) din Tîrgu-Mureș

STUDIUL ROLULUI BACTERIILOR DIN FAMILIA ENTERO- BACTERIACEAE ÎN ETIO-PATOGENIA HEPATITEI EPIDEMICE*

L. Kelemen, L. Boér, Maria Akszenyuk, P. Horváth, B. Székely

În legătură cu morbiditatea ridicată a hepatitei epidemice înregistrată în toată lumea s-au dat pînă în prezent mai multe interpretări patogenetice.

Școala romînă de inframicrobiologie reprezentată de Șt. S. Nicolau, N. Cajal și colab. (8, 9, 20—25) admite existența unor variante noi de inframicrobi, care s-au format sub acțiunea antibioticelor, a imunității și a metioninei; aceste variante noi ar determina formele clinice ale bolii și creșterea morbidității. N. Constantinescu (10, 11) presupune că noile variante de inframicrobi ai hepatitei epidemice se creează prin inocularea parenterală a formelor vechi.



Unul dintre noi (Kelemen) a urmărit evoluția endemiei de hepatită epidemică de la începutul ultimului război mondial pînă în prezent. Atît aspectul endemiei din toate țările, cît și faptul că nivelul economic și cultural scăzut al populației din timpul războiului, deși a crescut mereu după aceea, nu a putut limita creșterea impetuoasă a morbidității în majoritatea țărilor din lume, chiar nici în acelea care nu au suferit calamitățile celui de al doilea război mondial (S.U.A., Elveția), l-au determinat să caute un factor, a cărui prezență se constată și care acționează în egală măsură în toată lumea. Acest factor a fost identificat în utilizarea pe scară largă a antibioticelor!

Mergînd mai departe în analiza mecanismului patogenetic, Kelemen presupune că punctul de atac este la nivelul florei intestinale, prin modificarea biogenezei de către antibiotice; astfel *agentul patogen* (inframicrobian) ar avea posibilitatea să pătrundă mai ușor și să imbolnăvească mai frecvent organismul.

Explicația mecanismului patogenetic prin schimbarea florei microbiene presupune ca studiul microflorei să se facă înaintea și în momentul imbolnăvirii, fapt ce nu se poate realiza în condiții naturale. În schimb, se poate realiza un studiu comparativ, între microflora materiilor fecale la bolnavii suferinzi de hepatită epidemică într-un stadiu cît mai precoce al bolii și microflora fecalelor indivizilor sănătoși, precum și ale celor tratați cu doze masive de antibiotice. Astfel de studii au fost începute de noi în anul 1962. Rezultatele le prezentăm în această lucrare.

Ipoteza noastră patogenetică a fost prezentată la a IV-a Sesiune a I.M.F. Tg.-Mureș (14) și la U.S.S.M. filiala Tg.-Mureș (15, 16).

Importanța enterobacterilor în patogenia hepatitei epidemice a fost subliniată și de M. Ciucă, la Conferința de hepatită cronică, organizată de U.S.S.M. la București, în luna octombrie 1962.

Ipoteza noastră actuală este fundamentată începînd din anul 1956, pe cercetări de natură bacteriologică, (4 și 5).

* Lucrare prezentată la ședința U.S.S.M. Filiala Tg.-Mureș din 5 aprilie 1963.

Experiențele care au sugerat rolul endotoxinelor enterobacteriene au fost inițiate în 1934 de *Toomey I. A.* (27) care a reușit să intensifice virulența virusurilor poliomielitice cu ajutorul endotoxinelor bacteriene. Presupunerea noastră că microbii intestinali sau endotoxinele lor, contribuie și la intensificarea virulenței virusurilor hepatice a fost enunțată în 1957, la Sesiunea a II-a I.M.F. (3).

Domokos și colab. (13) au publicat studii referitoare la flora microbiană a fecalelor bolnavilor suferinzi de hepatită epidemică, insistând asupra prezenței bacililor coli hemolitici, fenomen observat de *Gutzeit* (cit. *Siede*, 26).

Material și metodă

S-au analizat materiile fecale obținute de la 36 de copii sănătoși de vîrstă școlară și preșcolară, studiindu-se comparativ microflora fecalelor obținute de la 44 copii cu diferite infecții aeriene (scarlatină, meningită cerebrospinală epidemică etc.) și microflora fecalelor a 91 de copii suferinzi de hepatită epidemică, în faza inițială a bolii.

În microflora intestinală a copiilor examinați s-au pus în evidență în special enterobacterii aparținînd speciilor *E. freundii* și *E. coli*: s-a determinat raportul (frecvența) acestor specii la fiecare lot de copii examinați, apoi s-a determinat activitatea biochimică și structura antigenică a tulpinilor de microbi izolate (tabelul 3 și 4). În continuare s-a determinat antibiograma unor microbi izolați (tabelul 5).

Examinările biochimice utilizate sînt trecute în tabelul nr. 1.

Serurile aglutinante și fracțiunile antigenice cercetate sînt date în tabelul nr. 2.

La determinarea sensibilității tulpinilor izolate față de antibiotice s-a utilizat metoda cu rondelul de hîrtie de filtru imbibate cu cantități standard de antibiotice (Biotest).

Rezultate

Rezultatele tuturor experiențelor noastre sînt cuprinse în tabele (vezi tabelele anexate nr. 3—5). Nomenclatura utilizată de noi este aceea adoptată în *Bergey's Manual* (2).

Interpretarea rezultatelor

Diferențele între cele trei categorii de produse biologice și patologice sînt evidente.

Microflora materiilor fecale ale copiilor sănătoși este formată în primul rînd din Enterobacteriaceae, aparținînd speciei *E. coli* (93%) (tabelul nr. 3).

Microflora copiilor tratați cu antibiotice și a copiilor suferinzi de hepatită epidemică conține în mod predominant Enterobacteriaceae aparținînd speciei *E. freundii*. (*Citobacter*) (48,2%—51,5%) (tabelul nr. 3).

Din aceste date rezultă prima concluzie a noastră: copiii suferinzi de hepatită epidemică au în antecedentele lor un factor comun cu cei tratați cu antibiotice! Apariția abundenței de *E. freundii* este probabil indiciul tratamentului anterior cu antibiotice.

Al doilea aspect ce apare la copiii tratați cu antibiotice și la cei suferinzi de hepatită epidemică într-o măsură și mai mare, este frecvența în *E. freundii* a fracțiunilor antigenice de *Salmonella*, *Shigella* (22,73%—77,12%, față de 3,23%) (tabelul nr. 4).

În studii anterioare (1, 6), am accentuat importanța acestui fenomen de variabilitate microbiană în infecțiile bacteriene; rezultatele prezentate în tabelele nr. 3—4 arată importanța lui și în hepatita epidemică.

Păreră noastră formulată și în studiile menționate este că distrugerea masivă a enterobacteriilor de către antibiotice dă naștere la apariția unor variante micro-

Tabelul nr. 1.

Abrevieri E = Escherichia A = Aerobacter P = Paracoloclostridium Pr = Proteus	E. coli	E. freundii	E. intermedia	A. aerog. Klebs. pn.	A. cloacae	P. aerogenoides	P. intermedium	P. arizonae	P. coliforme	Pr. vulgaris	Pr. morgeni	Pr. mirabilis	Pr. rettgeri	Shigella	Salmonella	S. typhosa
Motilitate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz din glucoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid din glucoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" manită	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" adonită	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" dulcită	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" lactoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" salicină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" zaharoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indul	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lich. gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Util. citrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vog. Prosc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Roșu metil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urează	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dezv. in KCN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legendă:
 + = pozitiv; - = negativ; V = variabil; ± = pozitiv ori negativ; --+ = negativ,
 +- = pozitiv, rar negativ; (+) = pozitiv tardiv; So = Specia Sonne.

Tabelul nr. 2.

Interpretarea abrevierilor; fracțiunile antigenice notate prin acestea (Serurile aglutinante mono- și polivalente sînt preparate în „Institutul Dr. I. Cantacuzino“)

Abreviere	Fracțiuni antigenice
pO, polyv. O.	Ser polivalent, O, cu fracțiunile antigenice 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 27
Vi	Ser anti-Vi
AO	Ser antiparatific AO (1, 2, 12)
AH	„ „ AH (a)
BO	„ „ BO (4, 5, 12)
BH	„ „ BH (b)
CO	„ „ CO (6, 7, 8)
CH	„ „ CH (c)
9, 12	„ antitific și antienteritidis O
d	„ antitific H
i	„ antityphimurium H
g, m	„ antienteritidis H
1—2—5	„ anti H de fază nespecifică (1, 2, 5)
Sh	„ antishigella Shiga (Grigoriev—Shiga)
Fl	„ „ polivalent Flexner
SoS	„ „ Sonne S
SoR	„ „ Sonne R
Schm	„ „ Schmitz—Stutzer
Sa	„ „ Sachs
O ₁₁₁	„ anticoli O ₁₁₁ B ₄
O ₅₅	„ „ O ₅₅ B ₃
O ₂₆	„ „ O ₂₆ B ₆
O ₈₆	„ „ O ₈₆ B ₇
O ₁₁₉	„ „ O ₁₁₉ B ₁₄
O ₁₂₅	„ „ O ₁₂₅ B ₁₅
O ₁₂₆	„ „ O ₁₂₆ B ₁₆

Tabelul nr. 3

Enterobacteriaceae izolate din materii fecale 1962—1963

Specia bacteriană (determinare biochimică)	A., Tulpini (sușe) izolate la bolnavii de hepatită epidemică (91 de bolnavi, 437 de tulpini)		B., Tulpini (sușe) izolate la copiii tratați cu antibiotice (44 de copii, 220 de tulpini)		C., Tulpini (sușe) izolate la copiii sănătoși (36 de copii, 155 de tulpini)	
	Frecvența speciei bacteriene	Frecvența fracțiunilor antigenice	Frecvența speciei bacteriene	Frecvența fracțiunilor antigenice	Frecvența speciei bacteriene	Frecvența fracțiunilor antigenice
E. coli	26,8%	35,1%	36,6%	8,6%	93,0%	1,4%
E. freundii	51,5%	31,6%	48,2%	14,0%	1,2%	0 %
E. intermedie	15,3%	22,4%	7,8%	0 %	5,8%	0 %
A. aerogenes	1,6%	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Atipic	4,8%	14,3%	7,6%	56,0%	0 %	0 %
Total	100 %	29,8%	100 %	14 %	100 %	1,2%

Tabelul nr. 4.
Frațiuni antigenice la izolare

Fracțiunea	A. Copii cu hepatită epidemică Numărul fracțiunilor	B. Copii tratați cu antibiotice Numărul fracțiunilor	C. Copii sănătoși Numărul fracțiunilor
1. pO*	31	6	2
2. Vi	28	4	—
3. 9,12	29	2	2
4. d	8	—	—
5. 1—2—5	19	6	—
6. AO	9	1	—
7. AH	13	—	—
8. BO	11	1	—
9. BH	19	2	1
10. CO	10	—	—
11. CH	34	2	—
12. i	14	3	—
13. g, m	9	—	—
14. p. Fl.	17	16	—
15. SoS	4	—	—
16. SoR	5	2	—
17. Schm.	10	1	—
18. Sa	30	—	—
19. Sh	7	—	—
20. O ₁₁₁	2	—	—
21. O ₅₅	6	4	—
22. O ₂₆	5	—	—
23. O ₈₆	1	—	—
24. O ₁₁₉	2	—	—
25. O ₁₂₅	8	—	—
26. O ₁₂₆	6	—	—
Total:	377	50	5
Raportat la totalul tulpinilor izolate	77,12%	22,73%	3,23%

* Frațiuni care nu figurează sub nr. 3, 6, 8 și 10.

Tabelul nr. 5.

Antibiograma tulpinilor de E. freundii cu fracțiuni antigenice de Salmonella-Shigella-E. coli patogen puse în evidență în fecalele copiilor suferinzi de hepatită epidemică

Tulpina	Antibioticul									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
b	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
c	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
d	S	SR	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
e	S	SR	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
f	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
g	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
h	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
i	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R
j	S	S	S	S	S	SS	R	SR	SS	R

Legendă a—j = marcarea tulpinilor

S = sensibil

R = rezistent

SR = slab rezistent

SS = foarte sensibil

1 = tetraciclină

2 = terramicină

3 = aureomicină

4 = clorocid

5 = streptomicină

6 = penicilină

7 = eritromicină

8 = polimixină

9 = neomicină

10 = sulfonamidă

bune noi, rezultate în urma transducției, transformării și recombinării (conjugării) procese descrise în lucrări de genetică microbială contemporană.

Datele din tabelul nr. 5. arată că formele de *E. freundii* izolate la bolnavii suferinzi de hepatită epidemică prezintă același spectru de sensibilitate față de antibiotice. În consecință, antibiograma nu este metoda care să permită diferențierea individuală a tulpinilor de Enterobacteriaceae lactozo- pozitive. Trebuie semnalat însă un aspect important care susține ipoteza noastră și anume: *sensibilitatea mare a tulpinilor izolate la bolnavii de hepatită epidemică — față de penicilină, fenomen rar la genul Escherichia*. Se poate presupune că schimbarea structurii antigenice și apariția fracțiunilor de Salmonella-Shigella-Coli patogen, sînt fenomene ce se produc paralel cu intensificarea sensibilității tulpinii față de anumite antibiotice, în cazul nostru față de penicilină și neomicină. Astfel se explică ipoteza noastră potrivit căreia aceste variante noi se distrug în masă și eliberează endotoxina, factorul de blocare a rezistenței nespecifice față de infecție.

Rezultatele obținute ne îndreptătesc să afirmăm că flora de Enterobacteriaceae, cu structuri antigenice de Salmonella-Shigella întilnită în fecalele bolnavilor de hepatită epidemică cu o frecvență atît de semnificativă, joacă un rol mult mai important, decît se crede, fiind expresia unui fenomen de biologie bacteriană al cărui studiu trebuie continuat.

Deși pare hazardat, totuși nu putem gîndi la o eventuală hibridizare virus-bacteriană, care ar da naștere acestor variante.

Studiile ecologice, întreprinse de unul dintre noi* (Horváth) și-au propus să contribuie la clarificarea originii fracțiunilor antigenice în sinul speciei de *E. freundii*.



În concluzie, presupunînd că în hepatita epidemică punctul principal de atac al inframicrobului este comun, atît la inocularea intestinală (alimentară), cît și la cea parenterală, rezultatele noastre pledează pentru un mecanism al procesului patogenetic, prin distrugerea masivă a florei intestinale bacteriene modificate sub acțiunea antibioticelor și a virusurilor.

Din bacteriile (Enterobacteriaceae) distruse, eliberîndu-se cantități mari de endotoxine solubile, acestea trecînd în circulație ar bloca factorii nespecifici ai imunității: sistemul proferdinic, alexina și inhibitorii anti-inframicrobieni, produși în special de sistemul reticulo-endotelial.

Scăderea dinamică a funcțiunii sistemului reticulo-endotelial joacă un rol hotărîtor în patogenia hepatitei epidemice, mecanism care a fost stabilit de noi în cercetări anterioare. (12, 17, 19, 7).

Dat fiind că mecanismul presupus se declanșează anterior procesului morbid sau în faza lui cu totul inițială (incubație și faza preicterică), în practica zilnică el nu poate fi pus în evidență în organismele umane prin metodele existente astăzi. Cercetările noastre continuă prin experiențe pe animale și „in vitro”.

Sosit la redacție: 22 iulie 1963.

Bibliografie

1. AKSZENYUK MARIA: Rev. Med., (1963), 3, 277; 2. BERGEY S.: Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, (1957); 3. BOER L., HORVÁTH G.: A II-a Ses. Științifică I.M.F. Tg.-Mureș (1957), 42; 4. BOER L., PETER M., HORVÁTH G., DOMOKOS L., KISS E., SCHULLER L., KONRÁD GY.: A III-a Ses. Șt. I.M.F. Tg.-Mureș (1960), și Confer. de Hepatită Epidemică, Sinaia (1930); 5. BOER L., EIZIKOVICS C., MAGDÓ J.: Rev. Med. (1960), 2, 172; 6. BOER L., DOMOKOS L., AKSZENYUK M., SZÉKELY B., HORVÁTH G., KELEMEN M.: Rev. Med. (1962), 1, 48; 7. BOER L.: Boala Botkin (1962), (Manuscris); 8. CAJAL N.: Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. R.P.R. (1958); 9. CANTACUZÈNE J.: Presse Med., (1918), 541; 10. CONSTANTINESCU N., BIRZU N., ZA-

VATE O., LEIBOVICI B., GHEORGHIU M., GRUMAZESCU M., OVĂNESCU AL., MANTA I., MIHAIL AL.: Stud. Cercet. Șt. Med., (1956), 7, 2, 135; 11. CONSTANȚINESCU N., ZAVATE O., BIRZU N., GRUMAZESCU M., LEIBOVICI B., RADULESCU A.: Stud. Cercet. Șt. Med., (1957), 8, 2, 361; 12. CSÖGÖR I., KELEMEN L.: Contribuții la evaluarea probei intradermice cu roșu de Congo în hepatita epidemică. A IV-a Ses. Șt. a I.M.F. Tirgu-Mureș, 21—22. dec. 1962; 13. DOMOKOS L., PÉTER M., LÁSZLÓ J., PAÁL GY., BARABÁS M.: Rev. Med. (1962), 3, 343; 14. KELEMEN L., BOÉR L.: Studiul factorilor care cauzează creșterea morbidității în hepatita epidemică. A IV-a Ses. Șt. a I.M.F. Tirgu-Mureș, (1962), 21—22. dec.; 15. KELEMEN L., BOÉR L.: Noua teorie privind ridicarea morbidității în hepatita epidemică, Filiala U.S.S.M. (1963), 8 ianuarie; 16. KELEMEN L., BOÉR L., AKSZENYUK M., SZÉKELY N., HORVÁTH G.: Studiul rolului bacteriilor intestinale în etiopatogenia hepatitei epidemice. U.S.S.M. (1963); 17. KELEMEN L., CSÖGÖR I.: Analele Șt. Univ. „Al. Cuza“ din Iași (1960), II, VI, 4 Supliment 115; 18. KELEMEN L., CSÖGÖR I.: Rev. Med. (1961), 183; 19. KELEMEN L., CSÖGÖR I., STREMPER M., KÜRTHY E.: A IV-a Sesiune științifică a I.M.F. Tg.-Mureș, (1962), 21—22. dec.; 20. NICOLAU ȘT., RUGE H., DUMITRESCU POPOVICI I., PORTOCALĂ R., MOȚOC A., BÎLBÎIE VL.: Rev. sanit. milit. (Buc.), 1944, 6 martie; 21. NICOLAU ȘT., RUGE H., DUMITRESCU POPOVICI I., MOȚOC A., BÎLBÎIE VL.: Arch. Virusforsch. (1944), 3, 260; 22. NICOLAU ȘT. S., CAJAL N.: Studii cercet. inframicrobiol. (1955), VI, 3, 325; 23. NICOLAU ȘT. S., CAJAL N.: Probleme de inframicrobiologie, Ed. Med. București (1956); 24. NICOLAU ȘT. S.: Hepatitele infecțioase inframicrobiene, Ed. Acad. R.P.R. (1957); 25. NICOLAU ȘT. S.: Elemente de Inframicrobiologie Specială, Ed. Med. București, (1962); 26. SIEDE W.: Virushepatitis und ihre Folgezustände, Ed. J. A. Barth, Leipzig (1958); 27. TOOMEY I. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1934), 31, 1013.