

CONTRIBUȚII LA STUDIUL RĂSPÂNDIRII REZISTENȚEI EPISOMALE A BACTERIILOR FAȚĂ DE ANTIBIOTICE (FACTORUL R)

L. Boér*

Factorul R, sau factorul de rezistență transferabilă la bacterii (rezistență față de antibiotice de natură episomală, „infectious resistance factor” sau „drug resistance transfer factor”) din punct de vedere *biochimic* este un ADN cu greutate moleculară mai mică decât cel cromosomal din punct de vedere *genetic* fiind o replică parțială a ADN cromosomal, care îndeplinește funcția de mesager între două bacterii unite prin conjugare iar din punct de vedere *biologic* o formă de apărare a bacteriilor în lupta pentru existență.

Spre deosebire de rezistența strâns legată de molecula de ADN a cromosomului, factorul R în stare neintegrată (episom. sau plasmid) se poate

* N. Kelemen colaborator tehnic.

elimina cu ajutorul derivatelor de acridină și se transferă la alte bacterii nu numai la aceeași specie bacteriană, ci la specii, genuri și familii bacteriene diferite.

Factorul R are o mare capacitate invasivă, la bacteriile care îl recepționează re-ent (HFRT = high frequency resistance transfer) și este eminent *multiplu* în sensul că un singur antibiotic poate declanșa sinteza în bacteria respectivă a mai multor factori (determinante, caractere) R activi față de mai multe antibiotice.

În terminologia genetică recentă, factorii R se notează cu litere mari: P = rezistența episomală față de penicilină; C = cloramfenicol; S = streptomycină; T = tetraciclină; N = neomicină; E = eritromicină; Po = polimixină B.

În studiul ce urmează, vom analiza natura episomală a rezistenței față de antibiotice la unele sușe de Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae și Bacillaceae, izolate de noi în perioada anilor 1961—1967.

Material și metodă

1. Seria de sușe notate A₁—A₁₆₃ au fost izolate în anul 1961 dintr-un basin colector de apă potabilă, fiind identificate de noi ca sușe de: *Aeromonas typhoidea*, specie nedescrisă încă în literatura de specialitate.

2. Seria de *Salmonella abony*, 37 sușe izolate de la bolnavi suferinzi de infecții intraspinalcești în anul 1965.

3. Seria V₁—V₆₃ izolată în anul 1965 din apa râului M. sușe identificate ca Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae și Bacillaceae.

4. Seriiile E₁—E₁₁₁ cuprinzând 90 de sușe izolate în anul 1967 din materiile fecale ale unor bolnavi suferinzi de infecții aeriene; identificate: *Escherichia*.

5. Seriiile M₁, M₁₁, M₁₁₁ și M₁₁₁₁, cuprinzând 120 de sușe izolate din apa râului M în anul 1967, similare seriei V. din 1965.

Metodele de studiu au fost următoarele:

a) menținerea sușelor pe geloză semilichidă (0,5%) cu ermetizarea prin parafinare a dopurilor și pasaje — selectare la 2 luni;

b) controlul prin teste enzimatică și serologice la 2 luni;

c) la experiențele genetice s-au utilizat următoarele medii de cultură:

— mediu lichid (și solid) complet: extr. de carne Difco 5 g/l; peptonă Difco 10 g/l; NaCl 5 g/l; ajustare la pH 7,4; pentru mediul solid se adaugă geloză (agar) 20 g/l;

— mediu EMB (eosin-methylen-bleu): yeast-extract Difco 1 g/l; peptonă Difco 10 g/l; PO₄H₂K 2 g/l; PO₄HNa₂ 1 g/l; albastru de metilen 0,065 g/l; eosină (Gruebler. gelblich) 0,4 g/l; geloză Difco 20 g/l; sterilizare; ajustare la pH 7,4;

— mediu lactozat cu indicator: extr. de carne Difco 5 g/l; peptonă Difco 10 g/l; NaCl 5 g/l; geloză 20 g/l; sterilizare; pH 7,4, din sol. lactoză 20% sterilizată prin filtrare se adaugă 50 ml/l și albastrul de bromtimol ca indicator. din soluția sterilizată 4 ml/l din sol. 2%.

d) La experiențele de eliminare a factorilor R s-a utilizat mediul lichid „complet” cu adăos de acridină-oranj și acridină-roșu 50 γ (mcg) la ml mediu; — incubarea culturilor 24 și 48 ore. la 37°C apoi însămânțare pe mediu EMB și lactozat cu indicator; incubare 18 ore; selectare a 30—30 de colonii și determinarea sensibilității față de antibiotice prin difuziometrie simplă.

e) La experiențele de conjugare, sușele au fost însămânțate în mediul lichid „complet” (v. pct. c.) s-au incubat 18 ore la 37°C, apoi s-au amestecat în proporția: donor 1 parte, receptor 4 părți; urmează o nouă incubare de 2 ore la 37°C, diluare 1/10, apoi dispersare de 0,5 ml. amestec pe mediile EMB și lactozat simplu; (în plăci Petri de 10 cm diametru); incubare de 18 ore la 37°C, selectare de cîte 30 colonii din fiecare (donor și receptor pe 2 medii) și executarea testării sensibilității pe calea difuziometrică.

f) La testarea sensibilității sușelor s-a utilizat metoda difuziometrică după metoda noastră descrisă într-o lucrare anterioară

Rezultate

I. Din seria V izolată din apă în anul 1965 s-au testat pentru antibiograme 42 sușe, aflându-se 4 sușe cu un singur factor R (R_1); 7 sușe cu 2 factori R (R_2) și două sușe cu 3 factori R (R_3); — (21% factori multipli).

II. Din seria A. (*Aeromonas* 1961) s-au testat 60 de subculturi în 1967, aflându-se: R_3 — 2 sușe; R_4 — 30 sușe; R_5 — 24 sușe și R_6 — 4 sușe (100% factori multipli).

III. Din seria S. (*Salmonella* abony) s-au testat 37 sușe, aflându-se: R_5 —6 sușe; R_6 —23 sușe; și R_7 —8 sușe (100% factori multipli).

Comparând aceste date, reiese că factorii R multipli au fost deja prezenți în proporție de 100% la bolnavi (anii 1961—1965, seriile A și S) și numai în 21% în apa râului testată în anul 1965.

IV. Seria M_I — M_{IV} (1967) prezintă două aspecte: (izolări din același riu, ca seria V):

1. crește mult proporția factorilor R multipli față de anul 1965 (75%—88% față de 21%) și

2. răspîndirea acestor factori se observă atît în microflora „a monte“ de oraș, cît și „avale“ după revărsarea apelor reziduale.

Aceste constatări dovedesc răspîndirea mare a factorilor R multipli în toate categoriile de populație riverană, în numai 2 ani de zile!

V. *Experiențele de eliminare a factorilor R cu acridină* au dat următoarele rezultate: (vezi tabelul nr. 1 și 2).

Eliminarea factorilor R prin acridin-oranj 50 mcg/ml mediu; cultivare: 24—48 ore.

Cu acridin-oranj s-au eliminat 4 factori R din *Aeromonas*, 7 factori din *Escherichia* și 5 factori din *Salmonella*.

Eliminarea factorilor R prin acridin-roșu, 50 mcg/ml mediu; cultivare: 24—48 ore.

Cu acridin-roșu s-au eliminat 4 factori R din *Aeromonas*, 2 factori R din *Escherichia* și 3 factori R din *Salmonella*.

VI. La experiențele de conjugare am utilizat următoarele sușe bacteriene:

Factorii R transferați prin conjugare de la A_{140} la E_{1-22} au fost: S, E, T în bloc, și S, T ca segregant (factori R_3 și R_2).

Discutarea rezultatelor și concluzii

În lucrări anterioare am expus rezultatele noastre referitoare la natura episomilor, insistînd pe larg asupra episomului (factor) R.

Cercetările din prezenta lucrare justifică constatările autorilor din țară și străini, care au dovedit răspîndirea largă în natură a factorului R, în noțiunea „natură“ fiind cuprins și omul și animalele.

Persistența factorilor R în genurile *Salmonella* și *Pseudomonas* (specia *Aeromonas*) timp de doi, respectiv 6 ani ridică problema integrării acestui factor în cromosom, chiar în cazul menținerii sușelor bacteriene la temperatura camerei timp de 2—6 ani, justificînd ipoteza noastră expusă în lucrarea amintită.

Experiențele „in vitro“ executate pînă în prezent arată, că transferul rezistenței din ADN genetic cromosomal prin ADN extras din celula bacteriană donatoare (*transformare*) necesită cantități mari de ADN; aceleași posibilități reduse există și în cazul transferării fragmentelor de cromosom prin bacteriofagi (*transducție*); în plus, cele două mecanisme amintite au ca rezultat și o modificare profundă a bacteriilor receptoare, care devin mai puțin viabile decît celulele parenterale din care au luat naștere și se pierd în procesul de selecțiune ce urmează în generațiile următoare.

Tabelul nr. 1.

Nr. crt.	Denumirea suşei	Factori R înainte de tratament	Factori R rămaşi după tratament	Factori R eliminaţi
1.	lac ⁻ A ₁₄₀ (Aeromonas typhoidea)	P.S.C.E.T.Po	P.E	S.C.T.Po
2.	lac ⁺ E ₁₁₋₈ (Escherichia)	P.S.C.E.N.T.Po	—	P.S.C.E.N.T.Po
3.	lac ⁻ S ₉₆₈ (Salm. abony)	P.S.C.E.N.T.Po	P.S.E.T.	C.N.Po
4.	lac ⁻ S ₇₈₀ (Salm. abony)	P.S.C.E.N.T.Po	C.E.T.Po	P.S.N

Tabelul nr. 2.

Nr. crt.	Denumirea suşei	Factori R înainte de tratament	Factori R rămaşi după tratament	Factori R eliminaţi
1.	lac ⁻ A ₁₄₀ (Aeromonas typhoidea)	P.S.C.E.T.Po	P.E	S.C.T.Po
2.	lac ⁺ E ₁₁₋₈ (Escherichia)	P.S.C.E.N.T.Po	P.S.C.E.T	N.Po
3.	lac ⁻ S ₉₆₈ (Salm. abony)	P.S.C.E.N.T.Po	P.S.C.E.T.Po	N
4.	lac ⁻ S ₇₈₀ (Salm. abony)	P.S.C.E.N.T.Po	C.E.T.Po	P.S.N

Tabelul nr. 3.

Nr. crt.	Suşa „donor”	Factori R conţinuţi în suşă
1.	lac ⁻ A ₁₄₀ (Aeromonas)	P.S.C.E.T.Po (R ₆)
2.	Lac ⁺ E ₁₁₋₈ (Escherichia)	P.S.C.E.N.T.Po (R ₇)

Tabelul nr. 4.

Nr. crt.	Suşa „receptor”	Factori R conţinuţi în suşă
3.	lac ⁻ V ₁₁ (Bacillus polymyxa)	(R ⁻)
4.	lac ⁺ E ₁₋₂₂ (Escherichia)	P(R ₁)

„In vivo“ transformarea și transducția se întâmplă cu o frecvență și mai redusă, decît „in vitro“, deoarece ar fi nevoie de cantități mari de ADN genetic și de particule fagice transductoare ale rezistenței, ori aceste cantități mari nu se pot pune în evidență prin cercetările directe ale biocenozelor naturale, deci nu sînt prezente.

În cazul *episomilor R* situația e cu totul alta. Celulele donatoare (donor) eliberează episomii într-un număr mare; conjugarea celulelor bacteriene se petrece cu o frecvență mare la bacteriile, care recepționează recent factorii R (HFRT = high frequency resistance transfer). În plus, prezența factorului R nu dăunează bacteriei care îl poartă, aceasta rămînînd tot atît de viabilă, ca înainte de a recepționa factorul R, care este un factor de apărare și nu nociv, ca bacteriofagul sau colicinele.

Descoperirea factorilor cu rezistență multiplă transferabilă a contribuit la explicația apariției în masă a fenomenului de rezistență.

Studiile noastre au demonstrat existența rezistenței multiple pe teritoriul nostru atît la sușele izolate de la bolnavi, cit și la cele izolate din apele de suprafață.

Importanța epidemiologică a constatărilor de mai sus este mare. Prin instalarea tot mai frecventă a rezistenței multiple lupta contra infecțiilor devine mai dificilă și sîntem obligați de a găsi unele metode adecvate de profilaxie.

Într-o altă serie de cercetări am ajuns la concluzia, că factorii R nu-și au originea în bacteriile saprofite din mediul fizic extern, ci se formează în cavitățile naturale ale corpului uman și animal, în cazul nostru în intestin (3).

În cursul experiențelor noastre am reușit să transferăm factorii R din *Escherichia*, *Salmonella* și *Pseudomonas-Aeromonas* în *Bacillus polymyxa*.

Sosit la redacție: 2 octombrie 1967.

Bibliografia la autor.