

STUDII EXPERIMENTALE ȘI DE LABORATOR

Disciplina de epidemiologie (cond.: prof. dr. L. Boér, doctor-docent) a I.M.F.
Tirgu Mureș

STUDIUL UNOR SUȘE DE SALMONELLA ABONY IZOLATE DE LA BOLNAVI CU INFECȚII IATROGENE. ROLUL ACESTOR SUȘE CA POTENȚIAL PATOGENE

dr. E. Kiss, dr. L. Boér, dr. B. Sebe

Considerațiuni epidemiologice

În cele ce urmează vom prezenta câteva considerațiuni sumare referitoare la epidemiile de i. i. (infecții iatrogene) în cursul cărora s-au izolat sușe de *Salmonella abony*, supuse analizelor noastre.

Epidemiile au apărut în spitalul R și în spitalul regional T în ultimele luni ale anului 1965.

Primele cazuri s-au înregistrat la secția de pediatrie a spitalului raional R. Din acest oraș ni s-au trimis pentru diagnostic 13 sușe bacteriene, identificate ulterior ca fiind *Salmonella abony*. Formele clinice au fost ușoare, bolnavii prezentînd doar subfebrilități și diaree cu un număr redus de scaune.

Durata mai lungă a stabilirii diagnosticului etiologic i-a obligat pe medicii din R să transfere cițiva copii la spitalul regional de boli infecțioase din T.

În urma apariției acestor surse epidemogene, la spitalul din T. apar numeroase cazuri de îmbolnăviri printre bolnavii internați cu enterocolite infecțioase și dizenterie, aflați în perioada de convalescență; aceștia prezentau următoarele simptome: subfebrilități, diaree ușoare, iar examinările bacteriologice izolează aceiași microbi *S. abony*, „importați” din orașul R.

Numărul de sușe de *S. abony* izolate din materialul celor două spitale amintite și studiate de noi a fost de 38.

Studiul acestor sușe s-a realizat prin executarea următoarelor manopere (metode de cercetare) la intervale de trei luni, timp de 6 ani (1965—70).

A. Studiul manifestărilor fenotipice ale genelor cromosomiale: activitatea enzimatică, factorii antigenici și morfologia coloniilor (set de gene notat: Mc).

B. Metoda antibiogramelor difuziometrice.

Am completat metoda prin procedeul nostru original: „antibiograma difuziometrică în inele” publicat în anul 1969 (8). (care a fost precedat de lucrări preliminare, 3, 6, 7, 20).

C. Experiențe de transfer genetic și de eliminare a factorilor R prin acridin-oranj au fost executate conform tehnicilor prezentate în lucrări anterioare (2, 9) și în studiile citate în bibliografia acelor lucrări.

D. Patogenitatea sușelor a fost testată pe șoareci, cu ajutorul unor suspensii vii omorîte prin căldură, din aceste sușe. Valoarea a fost exprimată în DL₅₀ conform calculelor recomandate de Reed și Muench (24).

Rezultate

1. Activitatea biochimică arată o periodicitate reversivă a unor activități fermentative (vezi tabelul rezumativ, pct. 2).

Evoluția sușelor de *S. abony* (38 de sușe: 1965—70)
(tabel rezumativ)

1. Patogenitatea sușelor la izolare: $DL_{50} = 1,36 \times 10^8$

2. Echipamentul enzimatic și aparatul ciliar:

	G	Mn	D	Ino	L	Sa	Z	dt	it	cC	m	St	Id	H ₂ S	cS	MR	U	Gel	Mot (tub U)
1965	☒	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
1967	☒	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
1968	☒	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0
1970	☒	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(N. b: Deviație semnificativă: valoarea peste 20%)

3. Structura antigenică: 1, 2, 5, 12: b; e. n. x.

Anul	Factori O	Factori H (specifici) (faza I)	Factori H (faza II)	Observații
1965	1, 2, 5, 12	b	e. n. x	
1966	12	-	-	La 24 sușe din 38
1967	-	-	-	
1968	1, 2, 5, 12	b	-	La 3 sușe
1970	12	b	-	La 5 sușe

(N. b: aglutinări pe lamă, inițial în tuburi și pe lamă)

4. Eliminarea factorilor R. din *S. abony* prin acridine:

Factorii R	P	S	C	E	N	T	Po
La izolare	R	R	R	R	R	R	R
După acridin oranj	S	S	R	R	S	R	R
După acridin roșu	S	S	R	R	S	R	R
Eliminare spontană	S	S	R	S	S	R	S
Revenire și eliminare	R	R	S	R	S	S	S

(N. b: antibiograme difuziometrice „în inele”)

5. Transfer genetic: *S. abony* (S 780 donor) + *B. polymyxa* (V₁₁ receptor)

Factorii R	P	S	C	E	N	T	Po
S 780 (donor) înainte de conjugare	R	R	R	R	R	R	R
V ₁₁ (receptor) înainte de conjugare	S	S	S	S	S	S	S
V ₁₁ (receptor) după conjugare	S	S	R	R	S	R	R
factorii R transmiși prin conjugare	R	-	R	R	-	R	R

(N. b: antibiograme difuziometrice „în inele”)

Legenda

G = glucoza	Id = indol
Mn = manita	H ₂ S = hidrogen sulfurat
D = dulcita	cS = citrat Simmons
Ino = inozitol	MR = roșu de metil
L = lactoza	U = urează
Sa = salicina	Gel = gelatina (lichefiere)
Z = zaharoză	Mot = motilitate (proba biochimică)
dt = dextro-tartrat	- și Ø = reacții negative
it = tartrat inactiv	+ = fermentare
cC = citrat Cristensen	☒ = acid și gaz
m = malonat	± = reacție slabă
St = Stern (glicerol)	

P = penicilina	E = eritromicina	Po = polimixina B
S = streptomicina	N = neomicina	R = rezistent
C = cloromicetina	T = tetraciclina	S = sensibil

Cele mai stabile activități fermentative au rămas: fermentarea glucozei, manitei, dulcitei, inozitei, ureei, utilizarea citraților și lipsa gelatinazei și a fermentării lactozei. La producția de H_2S , s-au observat oscilații cantitative.

Fenomenele prezenței, apoi a dispariției și mai tirziu (după pasaje de 1—2 ani) a revenirii activității fermentative s-a observat la fermentarea dulcitei, salicinei, zaharozei, la reacțiile: indol, Stern (fermentarea glicerolului) și a roșului de metil.

Aceste fenomene se explică prin existența genelor antagoniste din cromosom care suferă modificări prin factorii inhibanți și excitanți ai mediului, ca retromutații (?).

2. Factori antigenici

Analizând periodic prezența factorilor antigenici în sușele de *S. abony* izolate, am constatat următoarele:

a) Factorii 1, 2, 5, 12: d, e, n, x. prezenți în anul 1965 (vezi tabelul rezumativ, pct. 3) au fost inhibați (după unii autori au suferit a delețiune în decurs de 2 ani); pe parcurs, în august 1966, au fost depistate 2 sușe cu antigen H de fază specifică „b”, iar în luna decembrie 1966 s-au identificat 24 de sușe purtând antigenul 012. Antigenul H nu s-a evidențiat.

b) În anul 1968 au reapărut antigenele: 1, 2, 5, 12; b, la sușele S 92, S 968, S 6668.

c) În anul 1969 au apărut două sușe S 69 și S/115, purtătoare de antigen 012. În anul 1970 au reapărut antigenele 012 și „b” la cinci sușe.

În concluzie antigenele flagelare au suferit o inhibare rapidă în decurs de doi ani și împreună cu factorii antigenici somatici (O) au prezentat fenomenul evoluției periodice: factorul 012 după „delețiunea” suferită în decurs de 2 ani, reapare (dezinhibare?) în cursul unei perioade de patru luni (august—decembrie 1966), suferind o periodicitate nouă în următorii patru ani (1967—70); antigenul H de fază specifică arată și el o revenire după o perioadă de 2—4 ani (vezi tabelul rezumativ).

Evoluția ciclică a factorilor antigenici somatici (O) și flagelari specifici (H faza I) dovedește prezența de gene antagoniste cantitativ variabile în segmentele de ADN genetic care inițiază sinteza antigenelor.

3. Morfologia culturilor (Mc) a prezentat modificări în proporție de 30% (variația S—R).

4. Experiențele de conjugare și de eliminare a factorilor R prin coloranți de acridină au dat rezultate concludente (vezi tabelul rezumativ pct. 4 și 5). Se constată că rezistența multiplă față de antibiotice a sușelor de *S. abony* se poate transmite prin transfer genetic la sușe de *Bacillus polymyxa* (receptoare), totodată s-a putut realiza eliminarea rezistenței din aceste sușe cu ajutorul coloranților de acridină (roșu și orange).

Aceste experiențe au dovedit că, „determinantele” capacității de rezistență la *S. abony* sînt legate de factorul R multiplu (1, 3, 6, 9).

5. Patogenitatea (virulența) sușelor de *S. abony* a fost scăzută chiar în momentul izolării lor din produsele patologice ale bolnavilor (materii fecale și sînge).

Patogenitatea exprimată în DL_{50} conform formulei recomandate de Reed și Muench (24) a fost de $1,36 \times 10^8$ germeni, iar toxicitatea (sușe omorîte la temperatura de 58°) a fost de 10^8 germeni.

Aceste valori sînt net inferioare (cu cît cifra este mai mare, cu atîta patogenitatea e mai mică) față de cele constatate în cazul Salmonelilor în general, unde DL_{50} exprimînd patogenitatea oscilează între valorile de 10^6 — 10^8 germeni. Toxicitatea nu arată diferență față de valorile constatate la alte Salmoane (10^8), exprimînd toxicitatea endotoxinei.

Discutarea rezultatelor

Date bibliografice (*Bumbăcescu, Gaiginschi și colab., Stavri și Timoșca, Berg, Bernard, Daddi, Freerksen, Prozorov, Rist și alții*) confirmă constatarea că, sușele bacteriene devenite rezistente față de unele antibiotice devin mai puțin virulente sau chiar nepatogene față de animalele de experiență (4, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 23, 25, 26).

La om procesul patogen provocat de aceste sușe nu a fost elucidat. Relațiile epidemiologice ale infecțiilor iatrogene sînt prezentate în lucrări anterioare (10, 17, 18, 19, 21, 22).

În unele lucrări ale noastre din anii precedenți (7, 17) am supus discuției fenomenul observat în cursul anchetelor executate în epidemii de i. i., cauzate de sușe multirezistente de *Salmonella* și *Shigella* după care aceste epidemii au decurs sub forma unor cazuri clinice ușoare, forme grave observîndu-se numai la un procent redus al bolnavilor.

La rezultate similare ajung *Szabó* *Juliana și colab.* (27), observînd o epidemie de i. i. cauzată de *S. panama*.

În unele din lucrările amintite (7, 23, 17, 25—27) s-a analizat rolul rezistenței bacteriilor față de antibiotice și s-a combătut concepția eronată, după care sușele antibiotico-rezistente ar fi totdeauna mai patogene, decît cele sensibile, accentuîndu-se însă asupra altor caractere ale acestor sușe și anume: dificultatea de a se combate infecțiile cauzate de ele. În acest fapt rezidă caracterul de „sușe periculoase” și nu în acela de a fi mai patogene (virulente).

În baza acestor constatări încadrăm sușele de *S. abony* izolate de noi în categoria „potențial patogene” (17).

Fenomenul scăderii virulenței unor sușe bacteriene posedînd factori R multipli (Rn) constituie o problemă mult discutată, avînd o mare importanță. Mecanismul întîm nu este încă elucidat.

Cercetările recente ale lui *Jarolman și Kemp* (16), din anul 1969, sînt foarte convingătoare; acești autori găsesc un animal receptiv față de specia de *Salmonella* utilizată: porcul, a cărui îmbolnăvire se traduce prin semne clinice caracteristice, analoge salmonelozelor la om, rezultate în urma inoculării (ingestiei) culturilor de *S. cholerae suis* var. *Kundendorf*.

Autorii au reprodus „in vivo”, experimental, fenomenul constat de noi la cazurile de i. i. umane cu *S. abony*: virulența scăzută a tulpinilor posedînd factori R multipli.

În 1968 am publicat rezultatele cercetărilor noastre referitoare la eliminarea patogenității unor sușe de *Shigella* (2), față de conjunctiva cobailor. Experiențele noastre pledează pentru natura episomală (plasmid?) a unor factori de patogenitate. Este posibil ca acest fapt să fie în relație antagonică cu factorii R, dar experiențele noastre nu au putut fi extinse în acest sens.

Concluzii

Studiînd prin metode biologice și biochimice 38 de sușe de *Salmonella abony*, izolate de la cazuri de infecții iatrogene ușoare și repetînd analizele timp de șase ani consecutiv, de patru ori pe an, am constatat:

- a) virulența scăzută a sușelor;
- b) o evoluție periodică (ciclică) a caracterelor morfo-fiziologice studiate;
- c) natura episomală a factorilor R multipli (Rn) produși în aceste sușe;
- d) transmisibilitatea factorilor R multipli din sușele de *S. abony* și *B. polymyxa*;
- e) posibilitatea ca factorul R multiplu (Rn) să funcționeze ca un inhibitor parțial al patogenității în sușele studiate.
- f) Autorii consideră că, sușele de *S. abony* studiate de ei se încadrează în categoria bacteriilor „potențial patogene”.

Sosit la redacție: 27 februarie 1971.

Bibliografie

1. AKSZENYUK MARIA, KISS E.: Rev. Med. (1966), 12, 3, 314;
2. AKSZENYUK MARIA BOËR L., KISS E.: Rev. Med. (1968), 3, 310;
3. AKSZENYUK MARIA, HORVÁTH G., KISS E.: Rev. Med. (1965), 11, 3—4, 377;
4. BERNARD E. și colab.: Revue de la tuberculose (1957), 2, 1/3, 351;
5. BERG G., MESSNER G.: (cit. de: Bernard E. și colab.);
6. BIRO I., TAMÁS GHIZELLA, KISS E., DOMOKOS L., PÉTER M., LÁSZLÓ J., DOMOKOS CLARA: Microbiol. (1961), 1, 58;
7. BOER L., KISS E., HORVÁTH G., AKSZENYUK MARIA, FÖLDVÁRI PARASCHIVA, PAPUC LIDIA: Problema anti-biogramei în diagnosticul de laborator și în lupta contra epidemiilor. Comunicat la U.S.S.M., Filiala Mureș, 6 VI 1964;
8. BOER L., KISS E., AKSZENYUK MARIA, KELEMEN N.: Produse farmaceutice (1969), 1, 16;
9. BOER L., KISS E., AKSZENYUK MARIA: Contribuții la problemele factorului de rezistență transferabil la bacterii. Conf. Naț. de microbiol. gen. și aplicată, București, 4—7 XII 1968, 61;
10. BOER L., KISS E., HORVÁTH G., SZÉKELY B., AKSZENYUK MARIA: Boala lui Botkin (hepatita inframicrobiană) ca infecție intraspitalicească. Comunicat la a IV-a Sesiune științifică a I.M.F. Tirgu Mureș, 21—22 XII, 1962;
11. BUMBĂCESCU N. și colab.: Rev. Med. Chir. (1958), 1, 23;
12. BUMBĂCESCU N. și colab.: Rev. Med. Chir. (1958), 2, 259;
13. DADDI G., LUCCHESI M.: Bul. Union internat. c. la tuberculose (1956), 26, 3—4, 268;
14. FREERKSEN E., MEISSNER G.: Bull. Union internat. c. la tuberculose (1956), 26, 3—4, 248;
15. GAIGINSCHI AL. și colab.: Rev. Med. Chir. (1961), 1, 113;
16. JAROLMAN H., KEMP C.: J. Bacteriol. (1969), 99, 2, 487;
17. KISS E.: Contribuții la microbiologia și epidemiologia infecțiilor iatrogene, Teză de doctorat, 1971;
18. KISS E., BOER L., HORVÁTH G., AKSZENYUK MARIA: Studii epidemiologice al profilaxiei și combaterii infecțiilor intraspitalicești în cadrul unităților sanitare din Tirgu Mureș. Comunicat la U.S.S.M., Filiala Mureș, 15 II 1962;
19. KISS GY., IZSÁK B., KISS E., FEKETE MAGDA: Rev. Med. (1962), 4, 196;
20. KISS E., NAGY Ö., BIRO I., BOER L., HORVÁTH G., AKSZENYUK MARIA: Rev. Med. (1965), 11, 3—4, 366;
21. KISS E., AKSZENYUK MARIA: Rev. Med. (1966), 1, 66;
22. KISS E., AKSZENYUK MARIA, BOER L.: Viața Med. (1968), 16, 114;
23. PROZOROV A. A.: Sovremenniiye problemi tuberculioza (1956), 3, 9;
24. REED L. I., MUENCH I.: Am. J. Hyg. (1938), 27, 493;
25. RIST N., KREIS B.: Bull. Union internat. c. la tuberculose (1956), 26, 3—4, 214;
26. STAVRI NATALIA, TIMOȘCA S.: Rev. Med. Chir. (1961), 3, 671;
27. SZABÓ JULIANNA și colab.: Pediatria (1969), 1, 57.