

# ESTUDIS SOBRE UN CERT FACTOR EXISTENT EN LES BACTÈRIES I EL SEU SIGNIFICAT EN LA INVASIVITAT BACTERIANA

per

F. DURAN-REYNALS

S'avançaria molt en la comprensió del mecanisme d'infecció si la virulència bacteriana pogués definitivament atribuir-se a certs constituents químics dels organismes virulents. S'han portat a cap nombrosos treballs en aquest sentit, seguint l'important descobriment d'Avery i Heidelberg (1) sobre els glúcids específics existents en diferents tipus de pneumococs. Si concedim, com la troballa suggereix, que cada organisme patògen té unes característiques bioquímiques individuals, no és menys veritat que cada un comparteix amb altres bacteries patògenes la propietat de mantenir-se o d'envair els teixits de l'hoste en una extensió més o menys gran.

Potser, com s'ha suggerit sovint, la «invasivitat» d'un organisme pot dissociar-se de la virulència. Aquesta darrera condició és més específica, però varia amb la susceptibilitat local o general o resistència per part de l'hoste i la toxigenicitat per part de la bactèria. El fenomen de la difusió d'una infecció a partir del punt d'inoculació o d'entrada, està lluny d'ésser comprès.

S'ha demostrat en aquest laboratori que en certs teixits animals, particularment en el testicle, hi ha un

factor susceptible d'extreure's i que té la propietat d'exaltar la invasivitat de certs agents patògens. Microorganismes d'un grau relativament baix de virulència inoculats amb extracte testicular produiran lesions comparables a les resultants ordinàriament d'organismes virulents, mentre que els d'un tipus més virulent tenen llur infectivitat marcadament augmentada per l'addició del factor. Hi ha proves considerables acumulades que indiquen que la propietat fonamental del factor exaltant és la creació d'una permeabilitat tissular augmentada. Sembla probable que l'exaltació de les infeccions depèn d'aquesta propietat de permetre als agents infecciosos de difondre a una àrea més gran de teixit que no ho fa quan l'organisme s'inocula sol. Aquestes observacions plantegen la qüestió de si la invasivitat d'un organisme pot dependre de l'existència, en ell, d'algun factor que faci el teixit més permeable. L'observació de Goodner (2) (1931) — que l'edema progressiu que es dona en les infeccions cutànies del conill pel neumococ porta amb ell l'agent infecció — suggereix que aquest produeix una permeabilitat augmentada dels teixits. Ha estès les seves observacions en experiments (3) més o menys paral·lels als descrits en la nota present.

Les propietats del factor derivat dels teixits són que exalta la infectivitat de totes les bacteries i de tots els virus que s'han provat (4), que augmenta la permeabilitat tissular com es veu per la difusió dels materials injectats (5), i que possiblement augmenta la permeabilitat cel·lular com indiquen els experiments sobre hematies i ous de les garotes (6). El factor d'una espècie exaltarà les infeccions no solament en la mateixa espècie, sinó també en totes les altres espècies susceptibles a l'agent infecció. La injecció intravenosa d'extracte testicular produeix un augment general de la permeabilitat

de la pell amb una susceptibilitat corresponentment augmentada del teixit per als agents infecciosos. El principi actiu és molt estable, soluble en aigua, i pot aïllar-se de la major part de les proteïnes solubles del teixit i purificar-se considerablement (7). En aquest estat de puresa resisteix l'ebullició. Hi ha proves suficients per a demostrar que li manquen propietats antigèniques (8).

La nota present és una descripció d'un factor exaltant i difusor derivat de les bacterïes, junt amb una comparació entre la quantitat de factor i la invasivitat de l'organisme. La investigació s'ha portat a cap principalment sobre estafilococs amb races d'una virulència ben distanciada.

#### MATERIAL I MÈTODES

Les races d'estafilocs emprades foren totes recentment aïllades de lesions patològiques, el cultiu partint en cada cas d'una sola colònia. El material per a provar el factor exaltant o difusor provenia d'un cultiu oblic de vint-i-quatre hores en agar suspès en 10 cc. d'aigua. Aquesta suspensió en un tub tancat incubat a 37°, s'autolitzava completament, en un temps de cinc a deu dies. Qualsevol bactèria sobrevivent se separava per centrifugació vigorosa i filtració per una bugia de Berkefeld. Un mètode més senzill utilitzat completament en la darrera part de l'estudi era extractar un cultiu de vinti-i-quatre hores amb 10 cc. d'aigua i separar aleshores les bacterïes. Com que aquests dos mètodes donaven productes absolutament comparables en llur acció, anomenarem simplement extracte bacterià al material. Per a provar la invasivitat dels organismes, se suspenien en aigua



Fig. 1

Conill 6-85. — Costat esquerre. Lesió produïda en vint-i-quatre hores per la injecció intracutània de 0'5 cc. d'una suspensió de cultiu de vint-i-quatre hores, d'una raça invasora d'estafilococs, en 10 cc. d'aigua. Les vores de la lesió s'han assenyalat amb tinta. No es veu clarament el caràcter necròtic de la lesió.

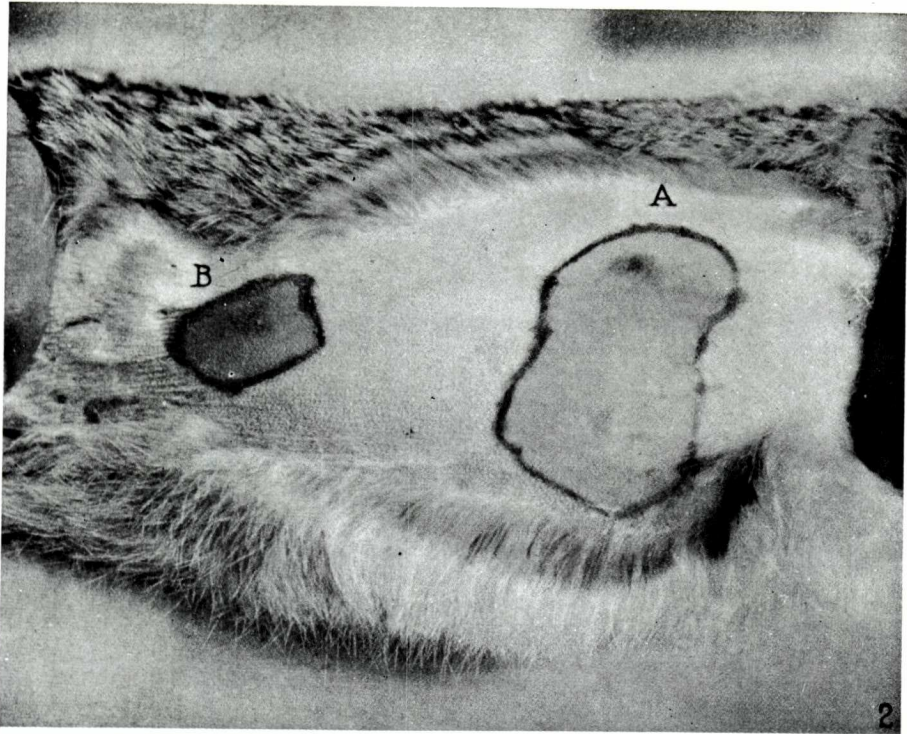


Fig. 2

Conill 6-85. — Costat dret. *A*) Difusió de la lesió produïda en vint-i-quatre hores per la injecció intracutània de 0'5 cc. d'autolisat de la mateixa raça, i 0'25 cc. de dilució de tinta xina. *B*) Extensió de la lesió vint-i-quatre hores després de la injecció de 0'5 cc. d'aigua i 0'25 cc. de tinta xina. (Control.) Les vores assenyalades en tots dos casos amb tinta xina.

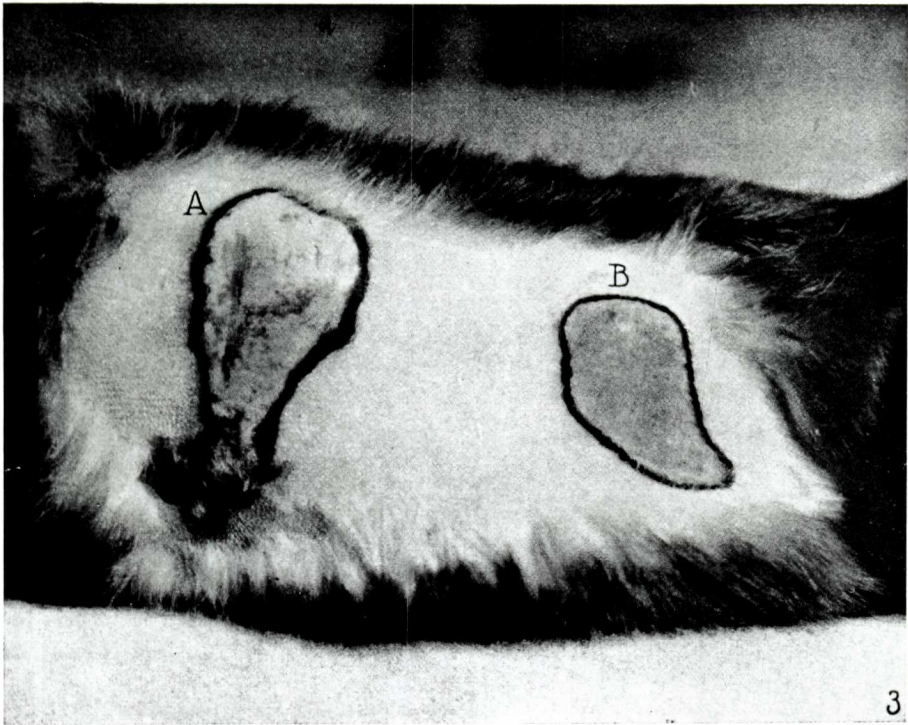


Fig. 3

Conill 6-92. — Costat esquerre. A) Lesió produïda passades vint-i-quatre hores després d'una injecció intracutània de 0'5 cc. d'una suspensió de cultiu de vint-i-quatre hores d'una altra raça invasora d'estafilococs, en 10 cc. d'aigua. El caràcter necròtic es veu ben clar. B) Lesió lleu produïda per 0'5 cc. d'un brou de cultiu de la mateixa raça, de vint-i-quatre hores. Vores, seguides amb tinta.

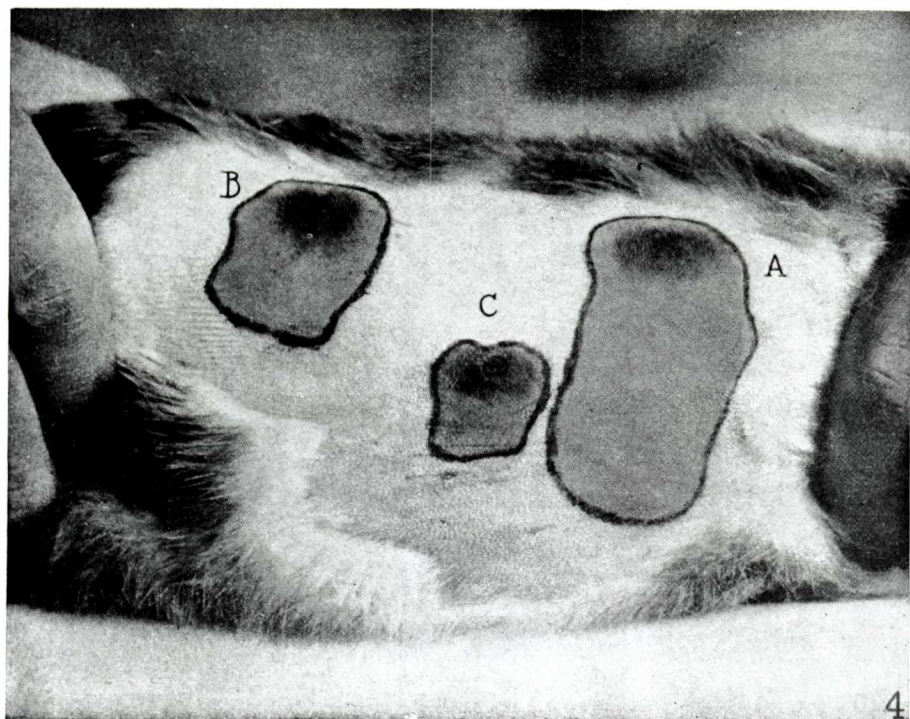


Fig. 4

Conill 6-92. — Costat dret. A) Lesió produïda en vint-i-quatre hores per una injecció intracutània de 0'5 cc. d'autolisat de la mateixa raça i 0'25 cc. d'una dilució de tinta xina. B) Lesió produïda pel líquid superior del brou de cultiu centrifugat i tinta xina. C) Lesió produïda per 0'5 cc. d'aigua i 0'25 cc. de dilució de tinta xina. Observi's l'extensió secundària de les lesions. Les vores, seguides amb tinta.

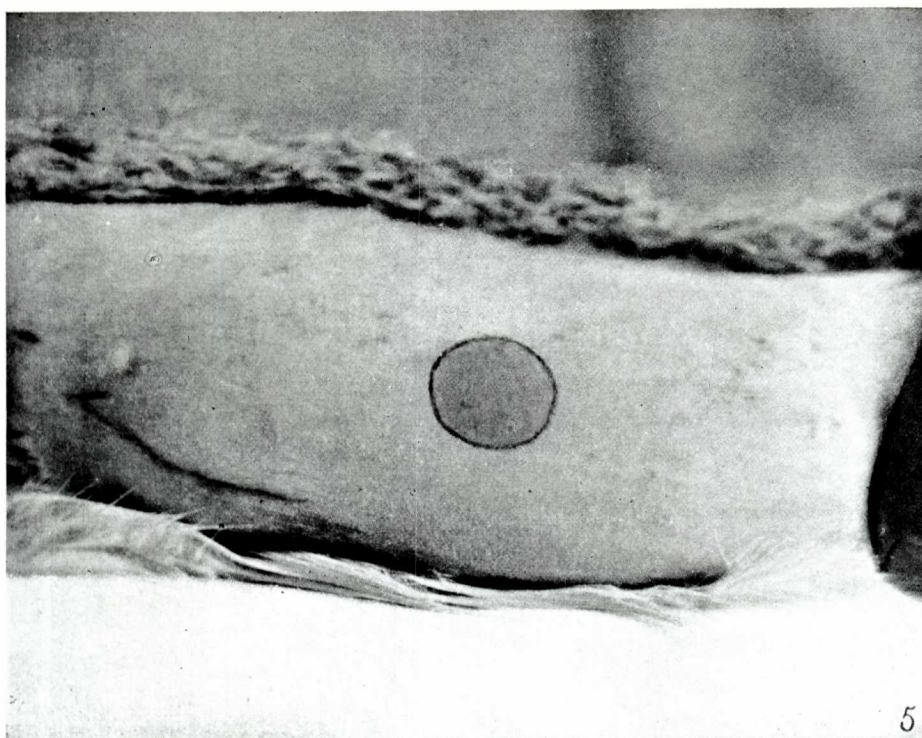


Fig. 5

Conill 5-00. — Costat esquerre. Lesió produïda vint-i-quatre hores després de la injecció intracutània de 0'5 cc. de suspensió d'un cultiu de vint-i-quatre hores, d'una raça no invasora d'estafilococs, en 10 cc. d'aigua.



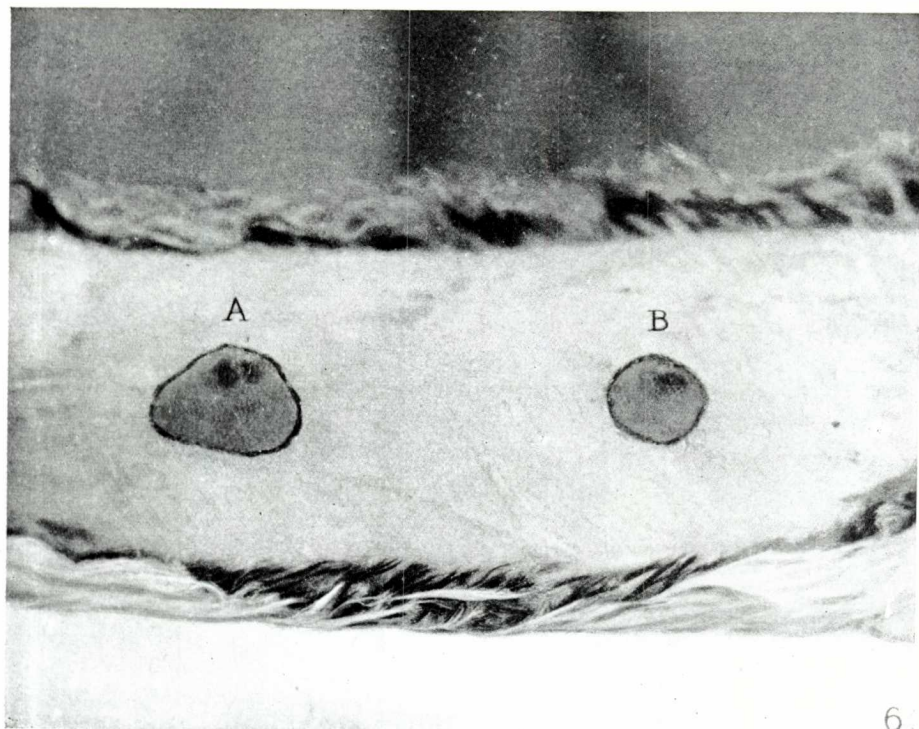


Fig. 6

Conill 5-00. — Costat dret. *A*) Lesió produïda en vint-i-quatre hores per la injecció intradèrmica de 0'5 cc. d'extret aquós de la mateixa raça i 0'25 cc. de tinta xina. *B*) Lesió produïda per 0'5 cc. d'aigua i 0'25 cc. de dilució de tinta xina. (Control.) Observi's que no hi ha extensió secundària de la lesió.

ro cc. de les bactèries d'un cultiu oblic en agar de vint-i-quatre hores.

Cada raça bacteriana es provà de la manera següent: S'afaitaven ambdós costats d'uns conills. En un costat es practicava una inoculació intradèrmica de 0'75 cc. d'organismes, representant 0'5 cc. de la suspensió diluïts amb 0'25 cc. d'aigua. A l'altre costat es feia una inoculació similar amb 0'5 cc. d'un extracte o autolitzat de la mateixa raça bacteriana, al qual s'havia afegit 0'25 cc. de tinta xinesa diluïda. Una tercera àrea rebia una injecció de 0'25 cc. de tinta xinesa diluïda fins a 0'75 cc. amb aigua. Les dimensions de les lesions produïdes per les bactèries i l'àrea de difusió de la tinta sola i de la tinta amb extracte bacterià es mesuraven vint-i-quatre hores més tard. Emprant mesures curoses com a base, s'expressava l'àrea afectada en centímetres quadrats.

Ultra les proves anteriorment descrites, les característiques culturals de cada raça es determinaven pels mètodes bacteriològics standard.

### *Experiments amb l'estafilococ*

Per a aquest estudi s'han emprat cinquanta-tres races d'estafilococs aïllats de fresc de lesions patològiques.<sup>1</sup>

*Correlació entre el contingut en factor difusor i la virulència de l'organisme.* — Basant-se en les dimensions i la qualitat de les lesions produïdes en la pell del conill, les cinquanta-tres races d'estafilococs han estat dividides

1. Volem expressar el nostre agraïment al doctor G. Shwartzman, dels Laboratoris del Mount-Sinai Hospital, per haver-nos proporcionat la majoria de les races d'estafilococs.

en els tres següents grups : onze foren classificades com a no invasores, o d'invasivitat lleugera, perquè les lesions resultants de llur inoculació eren benignes i rarament s'estengueren fora dels límits de la butllofa produïda per la inoculació. Aquestes lesions foren ben aviat reabsorbides o resoltes per la formació de petits abscessos, i la cicatrització no tardà gaire. El segon grup comprengué vint-i-dues races considerades com posseint una tendència invasora moderada. Produïen lesions d'un tipus mixt congestiu i necròtic, acompanyat d'edema, amb una difusió definida als teixits veïns. Hi havia formació d'escara amb acumulació de pus a sota, i la cicatrització fou lenta. El tercer grup, format per vint-i-dues races també, era fortament invasor. Les lesions produïdes eren similars a les descrites anteriorment, però eren molt més extenses, i en alguns casos provocaren una infecció general que matà l'animal. Utilitzant el mètode anteriorment descrit, cada raça fou provada en un sol conill, de manera que la mesura de la lesió produïda era comparada amb la quantitat d'agent difusor extractable de la bactèria. En les figures de l'1 a la 6 es poden veure els exemples típics de cada grup, i els resultats comparatius estan representats en la figura en text n.º 1. En aquesta l'àrea de la lesió i la difusió de la tinta es donen en centímetres quadrats.

De les fotografies i de la figura en text n.º 1 és evident que hi ha un parel·lelisme estret entre les dimensions de lesions produïdes i l'àrea de difusió de la tinta xinesa sota la influència de l'extracte de l'organisme. Com en l'extracte testicular, la difusió del producte dels microorganismes invasors és fàcilment visible uns moments després de la injecció. Mentre el material de control o l'extracte de bactèries no invasores persisteix com una butllofa elevada, les formades per la injecció del ma-

terial actiu s'aplanen en un temps molt curt (4), i en una hora, generalment, han infiltrat una gran àrea de pell. És possible predir amb alguna exactitud el grau d'invasivitat de l'organisme per l'àrea de difusió deguda a l'extracte, que es presenta en la primera hora després de la injecció. De les dades anteriors sembla clar que la invasivitat és paral·lela a l'existència en la cèl·lula bacteriana d'un factor difusor soluble.

*Grandària de les lesions produïdes per 53 races d'estafilococs en comparació amb el poder difusor de llurs autolitzats o dels extractes aquosos*










	Grandària mitjana de les lesions produïdes	Àrea mitjana de difusió de la tinta xinesa més els autolitzats o els extractes aquosos	Àrea mitjana de difusió de la tinta xinesa sola (control)
1.º grup d'11 races no invasores	 29x21 cm.	 34x23 cm.	 23x21 cm.
2.º grup de 21 races mitjanament invasores	 45x34 cm.	 46x31 cm.	 31x23 cm.
3.º grup de 21 races molt invasores	 60x35 cm.	 55x33 cm.	 40x21 cm.

Figura 1

*Efecte dels extractes bacterians sobre la infecciositat.* —

El factor de l'extracte testicular que augmenta la permeabilitat dels teixits sembla, de tots els fets que coneixem, ésser idèntica a un factor en el mateix teixit que causa una marcada exaltació de la infecció (5). L'exaltació depèn, segurament, de la permeabilitat augmen-

1. En el segon i tercer grup les superfícies dels controls amb tinta xinesa s'han estès un xic més del normal, ja veurem perquè.

tada dels teixits per a l'agent infecció. Si això és veritat, l'extracte de l'estafilococ invasor exaltaria les infeccions. Aquest punt de vista s'ha provat amb bacteries homòlogues i heteròlogues i amb un virus.

*Exaltació de la infecciositat de les bacteries homòlogues.* — Aquests experiments tracten de l'acció d'extractes de races invasores i no invasores d'estafilococs sobre la infecciositat d'altres races de la mateixa espècie amb diferents graus d'invasivitat.

La preparació del material es féu com s'ha descrit anteriorment. 0'5 cc. de la suspensió bacteriana es barrejaren amb 0'5 cc. de l'extracte. Això s'injectà intradèrmicament al costat d'un conill, i a la pell de l'altre costat s'injectà la mateixa quantitat de suspensió bacteriana diluïda amb aigua. Així els materials d'experiment i de control per a cada raça es provaren en un sol conill. Les dimensions de les lesions es mesuraren a les vint-i-quatre hores, i llurs àrees es registraren en termes de centímetres quadrats. En la taula I poden veure's els resultats.

*Exaltació de les infeccions bacterianes heteròlogues.* — Aquest grup d'experiments fou similar a l'anterior, però els extractes dels estafilococs invasors es provaren amb altres tipus de microorganismes : el *B. dysenteriae* de Flexner, estreptococs, proteus i *E. typhi*. Els resultats vénen donats en la taula II.

*Exaltació de la infecció per virus.* — Com a material de prova s'emprà una raça de neuro-vacuna.

A una suspensió standard s'afegiren extractes de races invasores d'estafilococs, mentre els controls consistien en una quantitat idèntica de virus diluïda amb aigua. Les dimensions de les lesions produïdes es registraren cinc dies després de la inoculació. Els resultats vénen donats en la taula III.

TAULA I  
Efecte dels autolitzats o dels extractes aquosos de races invasores i no invasores d'estafilococs sobre les lesions produïdes per races invasores i no invasores de la mateixa bactèria<sup>1</sup>

Origen de la suspensió bacteriana	Lesions produïdes per 0'5 cc. de suspensió bacteriana més 0'5 cc. de H <sub>2</sub> O		Lesions produïdes per 0'5 cc. de suspensió bacteriana més 0'5 cc. d'autolitzat o d'extracte	
	Cm. <sup>2</sup>	Cm. <sup>3</sup>	Cm. <sup>2</sup>	Cm. <sup>3</sup>
No invasora	Raça 1.....	8'1	Raça 13	18'5
	Raça 1.....	8'1	Raça 5	21'2
	Raça 2.....	8'4	Raça 5	10'2
	Raça 3.....	4'2	Raça 5	25'5
	Raça 3.....	4'2	Raça 5	16'0
	Raça 4.....	6'2	Raça 5	31'2
	Raça 4.....	6'8	Raça 5	11'6
	Raça 4.....	5'1	Raça 5	16'4
	Raça 4.....	7'2	Raça 5	20'2
	Raça 1.....	8'1	Raça 14	12'2
	Raça 1.....	8'1	Raça 15	12'2
	Raça 4.....	6'8	Raça 15	14'4
Raça 4.....	6'8	Raça 15	16'0	
Invasora	Raça 5.....	21'2	Raça 14	44'9
	Raça 5.....	19'4	Raça 14	34'8
	Raça 6.....	21'2	Raça 14	39'1
	Raça 7.....	15'6	Raça 7	15'6
	Raça 8.....	16'0	Raça 7	16'0
	Raça 9.....	16'0	Raça 15. Moderadament invasora.	16'0
	Raça 9.....	16'0	Raça 1. No invasora.	16'0
	Raça 9.....	16'0	Raça 1. No invasora.	16'8
	Raça 5.....	29'1	Raça 4. No invasora.	29'1
	Raça 5.....	29'1	Raça 15. Ijeugerament invasora.	29'1
	Raça 5.....	29'1	Raça 1. No invasora.	27'0
	Raça 5.....	29'1	Raça 7. No invasora.	26'0
Raça 5.....	29'1	Raça 4. No invasora.	26'0	
No invasora	Raça 10.....	8'4	Raça 2. No invasora.	7'0
	Raça 11.....	7'0	Raça 2. No invasora.	7'6
	Raça 12.....	6'8	Raça 2. No invasora.	7'0

1. Les dimensions de les lesions es mesuraren vint-i-quatre hores després de les injeccions.

TAULA II

*Efecte dels autolitzats d'estafilococ invasors sobre les lesions produïdes per bacteries heteròlogues*<sup>1</sup>

Espècies bacterianes	Lesions produïdes per 0'5 cc. de suspensió de bacteries més autolitzat	Lesions produïdes per 0'5 cc. de suspensió de bacteries més autolitzat	Origen de l'autolitzat
B. dysenteriae Flexner...	3'8	16'6	Raça 50
B. dysenteriae Flexner...	3'8	7'8	Raça 56
Estreptococ Rosenow....	6'2	12'9	Raça 50
Estreptococ Rosenow....	6'2	14'1	Raça 56
Estreptococ.....	9'0	32'3	Raça 45
Proteus XI9.....	20'2	32'3	Raça 50
E. typhi.....	4'5	26'0	Raça 50

1. Les dimensions de les lesions es mesuraren vint-i-quatre hores després de les injeccions.

TAULA III

*Efecte dels autolitzats d'un estafilococ invasor sobre les lesions produïdes per la raça nerviosa del virus vacunal*<sup>1</sup>

Dilució del virus	Lesions produïdes per 0'5 cc. de dilució de virus més 0'5 cc. d'aigua	Lesions produïdes per 0'5 cc. de dilució de virus més 0'5 cc. d'autolitzat	Origen de l'autolitzat
	cm <sup>2</sup>	cm <sup>2</sup>	
I : 10	23'5	52'6	Raça 50
I : 50	15'2	46'9	Raça 50
I : 100	13'1	34'2	Raça 50
I : 500	13'2	26'0	Raça 56

1. Les dimensions de les lesions foren mesurades cinc dies després de les injeccions.

Els resultats dels experiments demostren clarament que els extractes de les races invasores d'estafilococs exalten la infecciositat de les races invasores i de les no invasores del mateix organisme. El grau d'exaltació sembla guardar una relació definida amb la invasivitat de l'organisme que ha proporcionat l'extracte, essent totalment inactius els

extractes de les races no invasores. L'exaltació de les bactèries heteròlogues i de la infecció per un virus, per l'acció dels extractes de races invasores queda també clarament demostrada. Com en el cas del factor present en l'extracte testicular, hi ha una relació definida entre l'exaltació de les infeccions i la difusió produïda pel factor.

Propietats de 53 races d'estafilococs

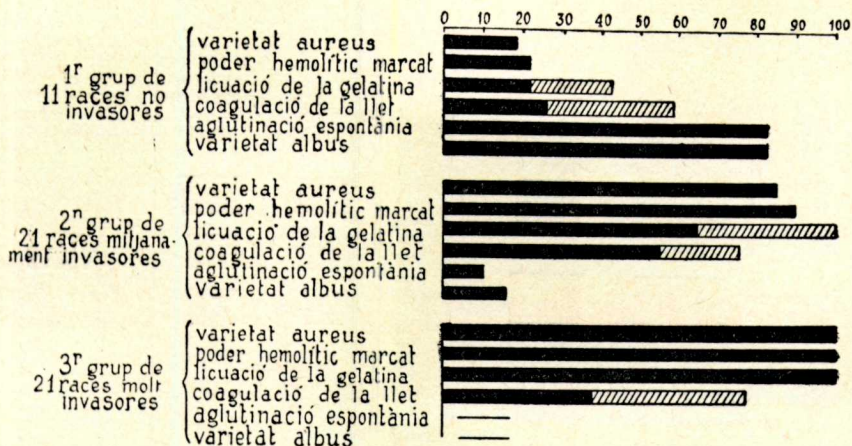


Figura 2

*Correlació entre el valor difusor i les característiques culturals dels estafilococs.* — Les característiques culturals de les cinquanta-tres races d'estafilococs emprats en l'estudi anterior s'han determinat per a veure si presenten alguna relació amb la quantitat de factor difusor.

S'han utilitzat els mètodes bacteriològics standard, i s'ha determinat el tant per 100 de les races de cada grup que presenten característiques particulars. El resultat d'aquesta investigació es dona en la figura en text n.º 2.



Les indicaciones són que la presència del factor difusor en aquestes bacteries pot relacionar-se generalment amb les característiques considerades típiques per al *Staphylococcus aureus*. Les desviacions d'aquest tipus estan regularment associades amb un baix contingut o una manca de factor difusor. Això correspon amb la coneguda associació de virulència amb les característiques culturals típiques aquest tipus d'organisme.

Colònies d'un cultiu d'estafilococ aureos invasor en gelatina, vell de tres mesos

Raça 56

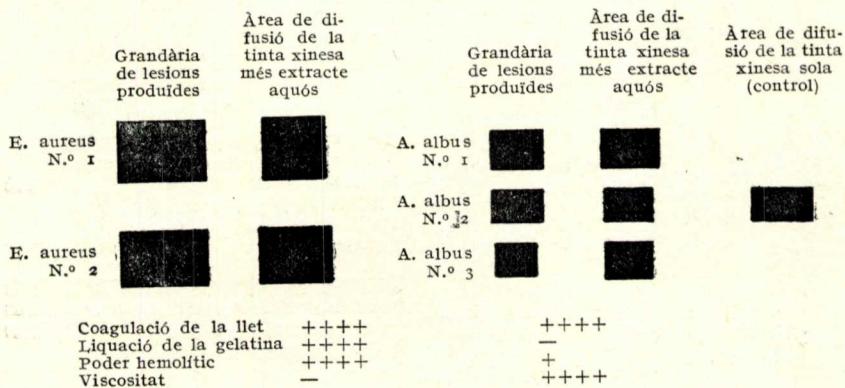


Figura 3

*Condicions que determinen variacions en la quantitat de factor difusor associat als microorganismes.* — Ha semblat interessant determinar si les condicions que influeixen sobre la virulència d'una raça particular d'un microorganisme influïrien sobre el seu contingut en factor difusor.

Se sap que les races virulents d'estafilococs es dissocien espontàniament en els cultius vells (9). Aquestes variants presenten alteracions en el color de l'aureus

a l'albus, en aspecte del llis al rugós i en cohesió del no viscós al viscós. A més de les investigacions de les variants obtingudes, s'han fet assaigs per a alterar les races virulents per subcultius repetits i per passos per animals en condicions diverses.

*Experiments amb variants.* — Les variants s'aconseguien de cultius en gelatina líquats de deu races d'estafilococs aureus. Unes poques colònies de cada una de les variants foren subcultivades i provades en conills per a llur infectivitat i el poder difusor de llurs extractes. A més es determinaren les característiques culturals més importants. Les variants R típiques que eren blanques i viscoses, amb colònies rugoses, no eren invasores i no presentaven factor difusor. En llurs característiques culturals es veié que hi havia hagut un canvi des del cultiu d'origen en una de les característiques típiques; per exemple, coagulació de la llet, líquació de la gelatina o poder hemolític. Hi havia diferents exemples de variants blanques obtingudes de fresc que conservaven la invasivitat de la raça d'origen, i els extractes de les quals contenien el factor difusor. Aquestes races eren no-viscoses, llises, i tenien les característiques culturals típiques de l'organisme primitiu. Moltes d'elles retornaren al tipus aureus en subcultius. En la figura en text n.º 4 es presenten les dades sobre la invasivitat, la propietat difusora i les característiques culturals dels exemples típics entre les múltiples variants estudiades.

Les proves posaren en relleu el fet que les variants obtingudes de races invasores d'estafilococs presenten, amb la pèrdua de la invasivitat, una pèrdua també del factor difusor. Quan la invasivitat es conserva, també persisteix el factor difusor.

*Factor difusor en races invasores repetidament subcultivades.* — Es practicaren vint passos, en trenta-cinc

dies, en agar i brou, amb dues races invasores. Al final d'aquest temps, les proves en animals demostraren que la invasivitat i el poder difusor dels autolitzats dels microorganismes no presentaven variació respecte a les propietats de les races d'origen. Per altra banda, la raça invasora subcultivada, amb trenta passos en agar i brou que contenen 25 per 100 de glucosa, es modificà.

Colònies d'un cultiu vell de tretze dies d'una raça invasora d'estafilococ aureus en gelatina  
Raça 26

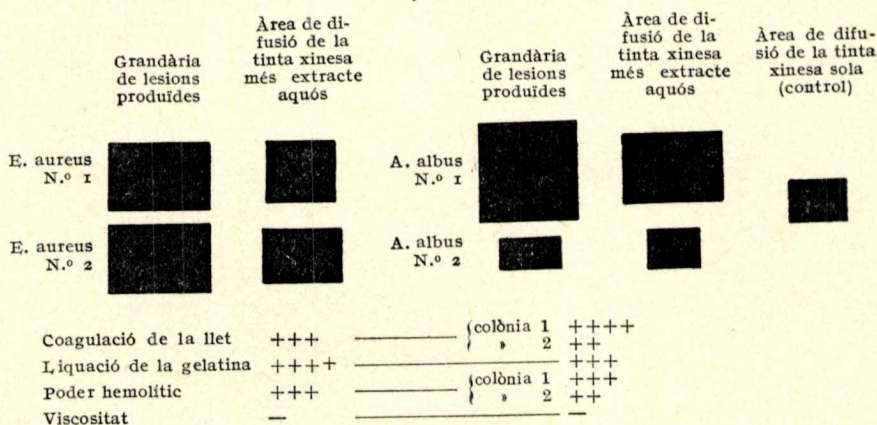


Figura 4

El pigment s'havia perdut i no reaparegué, àdhuc després de deu passos per agar sol. La invasivitat per a la pell de conill estava minvada i paral·lelament a això hi havia una minva equivalent en el poder difusor dels extractes bacterians.

*Efecte del pas per animals sobre la invasivitat i el factor difusor.* — Intentant augmentar la invasivitat d'una raça no invasora d'estafilococs, se la sotmeté al pas per inoculació a la pell, cavitat peritoneal i testicle de conills

o cobais. El microorganisme s'injectà sol, i també afegint-li autolitzat d'una raça invasora, amb el seu antisèrum i amb l'autolitzat d'una raça invasora respectivament. Les races recuperades després d'aquests passos, provades per a la invasivitat i producció de factor difusor, demostraren estar intactes i iguals a la raça original. En assaigs ulteriors per a alterar els microorganismes, s'inocularen en animals parcialment immunitzats per a la mateixa raça; se les posà in vitro en brou contenint autolitzats de races invasores; i amb brou amb els antisèrums corresponents o junts antisèrum i autolitzat. Cap d'aquestes manipulacions canvià la invasivitat o la quantitat de factor difusor.

Podem concloure dels experiments anteriors que en un conjunt de manipulacions encaminades a augmentar o a disminuir la invasivitat, el paral·lelisme entre la invasivitat i el contingut en factor difusor, no s'alterà, tant si les manipulacions eren eficients, com si fracassaven. Els assaigs per a transformar les races no invasores en invasores, o per a augmentar el factor difusor pels mètodes emprats amb èxit amb el neumococ (10) fallaren amb l'estafilococ<sup>1</sup>.

*Acció generalitzada del factor bacterià difusor.* — La capacitat de la cèl·lula de l'estafilococ invasor de fabricar el factor difusor in vitro, fa creure que, probablement, també ho fa in vivo. Que això és veritat, ho fan pensar els resultats d'experiments anteriors, presentats en la figura en text n.º 1. La tinta xinesa injectada com a control difon més en els animals inoculats amb un organisme invasor, que en els animals inoculats amb races

1. Amb tot i això, Pinner i Voldrich (11) han assenyalat darrerament que, després de molts intents, han aconseguit obtenir variants aurens virulents, fent desenvolupar varietats albus rugoses en llurs corresponents antisèrums.

no invasores. Els experiments següents constitueixen una prova d'un efecte generalitzat del factor difusor.

*Efecte de la injecció intravenosa del factor difusor.* — Proves preliminars demostraren que el factor difusor present en els extractes bacterians podia ésser fàcilment evidenciada en el sèrum d'un conill cinc minuts després de la injecció intravenosa d'aquest extracte. Una hora després, encara s'hi trobava, un xic minvat, i era solament detectable a les tres hores. Aquesta desaparició ràpida de la sang fa creure en una eliminació, una neutralització o possiblement una fixació pels teixits. Aquesta darrera possibilitat fou provada determinant l'efecte de la injecció intravenosa del factor sobre la difusió de la tinta xinesa injecta en la pell.

S'agafaren cinc conills i se'ls injectà intradèrmicament en 3 àrees, 0'75 cc. de tinta xinesa diluïda; immediatament després, per via intravenosa, de 7 a 22 cc. d'extracte bacterià. A dos animals de control se'ls injecta similarment en la pell, però en la injecció intravenosa es substituï l'extracte bacterià per aigua. En els animals de control la difusió de la tinta xinesa en la pell fou insignificant, i al final de les vint-i-quatre hores recobria una àrea de 5 a 6 centímetres quadrats. Per altra banda, la difusió de la tinta en els conills injectats intravenosament amb extracte bacterià, fou molt ràpida, de manera que al cap d'una hora era molt més gran que en els controls. Passades vint-i-quatre hores, recobria de 10 a 20 centímetres quadrats de pell.

*Pas del factor a la sang des de lesions locals.* — Per a determinar si el factor difusor el podia trobar en la sang d'animals que tinguessin una infecció del tipus invasiu de microorganismes, s'inocularen animals per via testicular i llur sang es provà a intervals buscant-hi el factor.

Els conills foren inoculats intratesticularment en la forma següent : tres amb  $1/5$  d'un cultiu de vint-i-quatre hores d'una raça invasora d'estafilococ; un amb  $1/10$  del mateix cultiu; i un amb  $1/5$  d'un cultiu d'una raça no invasora. Es feien preses de sang a cada animal, abans de la inoculació i després a intervals, i el sèrum s'investigava, per al factor difusor, en la forma corrent.

Els tres conills inoculats amb  $1/5$  dels cultius invasors moriren en les primeres vint-i-quatre hores. Els sèrums recollits presentaren una quantitat definida, però solament moderada de factor difusor a les proves corrents, i el desenvolupament era paral·lel amb el progrés de la lesió local i de la septicèmia. L'animal que havia rebut  $1/10$  d'un cultiu presentà un progrés més lent de la malaltia i donà una major oportunitat per a estudiar el procés. La presència del factor es demostrà, per les injeccions cutànies usuals; en la sang de l'animal, a les tres hores de la inoculació i hi continuà durant tota la vida. Els detalls d'aquestes proves es donen en la taula iv. El conill que rebé una inoculació de l'estafilococ no invasor va presentar un enduriment local passatger, amb una breu elevació tèrmica, però en cap moment pogué trobar-se factor difusor en el sèrum.

Els experiments anteriors indiquen que el factor difusor injectat intravenosament té una acció general sobre la permeabilitat de la pell i que el factor fabricat per les bacteries pot demostrar-se en la sang de l'animal inocula amb una raça invasora d'estafilococs.

TAULA IV

*Pas del factor difusor a la sang d'un conill des d'una lesió testicular produïda per una raça invasora d'estafilococs (3)*

Mostra de sèrum injectada	Àrea de difusió del sèrum més tinta xinesa	Temperatura recta	Observacions
	cm <sup>2</sup>	°F	
Abans de la injecció...	7'2	99'8	
3 h. després.....	20'2	101'0	Induració clara del testicle.
6 h. després.....	21'1	101'8	Més induració.
24 h. després.....	12'9	100'1	Orquitis aguda. Necrosi escrotal.
29 h. després.....	16'0	101'0	Animal molt malalt.
48 h. després.....	10'8	100'6	Animal pitjor.
60 h. després.....	12'4	100'1	Animal pitjor.
72 h. després.....	10'8	101'0	Animal mort. Cultiu en sang +++.
96 h. després.....	11'5	100'6	Animal mort.
Control: Aigua + tinta xinesa.....	6'7		

4 Les dimensions de les lesions es mesuraren vint-i-quatre hores després de les injeccions.

#### *Factor difusor en altres organismes*

Si bé no s'han fet estudis extensos sobre el factor difusor i exaltant en altres bacteries que els estafilococs, ha semblat important tenir alguna idea de si els principis establerts eren aplicables a altres bacteries.

*Correlació entre el valor difusor i la invasivitat de l'estreptococ.* — Per a aquest grup de proves s'empraren

catorze races diferents<sup>1</sup>. Les lesions produïdes en la pell de conills eren similars a les descrites del Rivers (12). La tècnica emprada era essencialment la mateixa que en l'estudi de l'estafilococ. Les bactèries, desenvolupades en plasma o en agar-sang, se suspenien o s'extractaven amb aigua. Per a algunes proves s'empraren cultius complets en brou i els extractes, en aquests casos, consistien en filtrats de cultius. En la taula v es dona una descripció de les races amb els resultats de les proves.

L'anàlisi de les dades de la taula v presenta un paral·lisme constant entre la invasivitat per a la pell i l'existència del factor difusor en cada espècie, troballa similar a l'observada amb l'estafilococ. No obstant, la raça 090/4/8 hemolítica i la seva derivada presenten una desviació d'ordre quantitatiu respecte a aquest paral·lisme. Encara que són riques en factor difusor, les àrees de llurs lesions són molt més grans que les àrees de difusió de llurs extractes, i en aquest punt es diferencien dels altres organismes estudiats. Un altre punt d'interès és que algunes de les races considerades virulents, segons llur capacitat de matar rates i conills, no contenen més factor difusor, i àdhuc poden contenir-ne menys, que altres races considerades menys virulents. Aquests són exemples de l'observació que la virulència general depèn d'altres factors al costat de la invasivitat local i el factor difusor.

*Exaltació de la infecciositat pels extractes d'estreptococs invasors.* — La propietat exaltant dels extractes bac-

1. El doctor G. Shwartzman ens proporcionà les dues races erisipelatoses. Les altres, excepte les últimes quatre de la taula v, ens foren amablement cedides pels doctors McEwen i Lancefield, de l'hospital del The Rockefeller Institute. També ens donaren les dades sobre llur virulència en conills i rates. S'ha respectat la nomenclatura usada per aquests investigadors per a designar llurs races.



TAULA V  
Poder infecciós i difusor de catorze races d'*estreptococs* 1

Raca emprada	Origen i virulència o toxicitat de les races	Àrea de difusió		Àrea de difusió		Àrea de difusió		Àrea de difusió		Àrea de difusió	
		Cm. <sup>2</sup>	Cm. <sup>2</sup>	per la sus- pensió bacteriana	extractes aquosos	Àrea de difusió produïda per la xinxesa sola (control)	Àrea de difusió produïda per tot el cultiu en brou	Àrea de difusió produïda per amb- dós filtrats	Àrea de difusió total (control)		
E-1.....	Erisipela; virulència desconeçuda.....	17'6	16'0	6'7	19'3	14'4	8'5				
E-3.....	Erisipela; virulència desconeçuda.....	16'0	17'6	4'0	25'0	27'0	7'8				
090/4/8 hemolític.....	Bovina, molt virulent <sup>2</sup> per als conills i rates.	71'0	19'1	5'6	—	—	—				
090/4/9 no hemolític.....	Bovina, molt virulent per a rates i probable- ment per a conills.....	53'2	10'6	5'2	—	—	—				
090-R-305 <sup>4</sup> .....	Bovina, no virulent per a les rates i probable- ment per als conills.....	37'2	25'6	6'5	13'6	13'6	11'5				
S/43/75 <sup>4</sup> .....	Xarampió, molt virulent per a les rates i mit- janament per als conills.....	14'8	7'5	6'0	11'7	7'2	3'2				
S/43-M. A.....	Xarampió; no virulent per a les rates i mitja- nament per als conills.....	14'0	12'6	4'5	6'2	6'7	3'2				
S/43 brillant <sup>4</sup> .....	Xarampió; no virulent per a les rates i mitja- nament per als conills.....	6'1	8'4	5'6	—	—	—				
C-203.....	Escarlantina; no virulent per a les rates no pro- vada amb conills.....	—	—	—	4'0	9'0	6'2				
K-152.....	Reumàtica; sense dades sobre la virulència.....	7'8	10'0	6'2	—	—	—				
St. A.....	De la gorja normal; probablement no virulent.	7'2	11'6	7'2	—	—	—				
St. B.....	Piogènica; probablement no virulent.....	5'8	4'8	4'8	—	—	—				
St. C.....	Vella raça de stock, no virulent.....	7'2	7'2	4'0	9'0	11'6	10'2				
Estreptococ de Roscnov	.....	6'2	8'3	5'0	7'0	10'1	10'1				

1. Les dimensions de les lesions es mesuraren vint-i-quatre hores després de les injeccions. 2. S'entén per una raça virulent una raça que mata la rata quan s'injecta intraperitonealment, almenys a una dilució de 10-6 cc., i mata el conill quan s'injecta intravenosament a la quantitat de 0'1 a 2 cc. d'un cultiu de setze hores en brou. 3. La raça 090-R-305<sup>4</sup> derivava de la raça 090/4/8, hemolítica, procedia del desenvolupament en sèrum immune. Tenia pocs glúcids específics. La raça 090/4/9, no hemolítica, procedia del mateix cultiu que la 090/4/8, hemolítica. Les races 090/4/8 i 090/4/9 tenien el glúcid específic. 4. La raça S/43/75 derivava de la S/43-M. A. després de setanta-cinc passos per la rata. Contenia la substància M. Abans dels passos, la raça donava lesions tan superficials en la pell del conill, que passades quaranta-vuit hores havien pràcticament desaparegut. Després de setanta-cinc passos, les lesions al segon dia, si bé no més grans en dimensions, eren molt més marcadetes i pròximes i requerien un llarg temps per a cicatritzar. La raça S/43 brillant derivava de la mateixa raça S/43-M. A., i gairebé no té substància específica del tipus.

terians tan estretament paral·lela amb el factor difusor, també s'ha investigat en l'estreptococ. S'han provat, per inoculació en la pell del conill, extractes de races invasores i no invasores amb tipus invasors i no invasors del mateix microorganisme. En la taula VI es consignen els resultats.

TAULA VI

Efecte dels extractes dels estreptococs invasors i no invasors sobre la infectivitat <sup>1</sup>

Origen de la suspensió d'estafilococs	Àrees de les lesions produïdes per 0'5 cc. de suspensió bacteriana més 0'5 cc. d'aigua	Àrees de les lesions produïdes per 0'5 cc. de suspensió bacteriana més 0'5 cc. d'extracte bacterià	Origen del lisat o de l'extracte d'estreptococs
	Cm <sup>2</sup>	Cm <sup>2</sup>	
Races:			Races:
I, no invasora.....	—	—	E-1, invasora.
I, no invasora.....	—	—	E-1, invasora.
I, no invasora.....	—	—	E-1, invasora.
I, no invasora.....	—	—	E-1, invasora.
5, no invasora.....	—	—	E-3, invasora.
5, invasora.....	—	—	E-3, invasora.
5, invasora.....	—	—	E-3, invasora.
6, invasora.....	—	—	A, no invasora.

1. Les dimensions de les lesions es mesuraren a les vint-i-quatre hores després de les injeccions.

Els resultats són totalment comparables als obtinguts en l'estudi més extens sobre l'estafilococ i presenta una vegada més el paral·lelisme estret entre l'exaltació de la infecció i les propietats difusores dels extractes bacterians.

*Experiments amb altres tipus de bactèries.* — A més de les races d'estafilococs i d'estreptococs s'han provat unes catorze races d'altres bactèries i les dimensions de les lesions produïdes en la pell s'han comparat amb el poder difusor de llurs extractes. En la taula VII es dona

TAULA VII  
 Poder infecciós i difusor de quinze espècies bacterianes 1

Espècies bacterianes	Origen i virulència o toxicitat de la raça	Àrees de difusió		
		Àrees de les lesions per la suspensió bacte- riana	Àrees de difusió per extractes aquosos	Àrees de difusió per la tinta xine- sa més aigua (control)
		Cm <sup>2</sup>	Cm <sup>2</sup>	Cm <sup>2</sup>
Meningococ 1.....	Recentment aïllat d'un cas fatal d'ence- falitis humana.....	7'3	9'3	6'0
Meningococ 36 <sup>2</sup> .....	Raça de stock molt vella. No virulent.	6'3	7'3	6'0
Meningococ 44-D <sup>2</sup> .....	Aliment tòxica per als conills.....	—	6'5	4'0
B. dysenteriae Flexner <sup>3</sup> ...	Sense dades sobre la virulència.....	9'4	11'9	11'9
B. dysenteriae Shiga.....	Tòxic per als conills. Sense dades sobre la virulència.....	—	12'6	4'0
E. Typhi <sup>2</sup> .....	Tòxic per als conills. Virulent per a les rates i conills.....	—	6'6	4'0
B. coli 1 <sup>4</sup> .....	Vella raça de stock. No virulent.....	14'0	11'9	11'9
B. coli 2.....	Vella raça de stock. No virulent.....	9'0	11'9	11'2
B. coli com l'1.....	D'un tumor transplantable. Sense da- des sobre la virulència.....	12'5	8'4	5'6
B. coli com el 2.....	D'un tumor transplantable. Sense da- des sobre la virulència.....	8'4	7'3	5'1
Sarcina com 1.....	D'un cultiu contaminat. Probablement no virulent.....	9'0	7'3	5'1
Sarcina com 2.....	D'un cultiu contaminat. Probablement no virulent.....	7'1	7'3	7'0
Sarcina com 3.....	D'un cultiu contaminat. Probablement no virulent.....	7'8	7'6	7'8
V. cholerae.....	Vella raça de stock. No virulent per als conills i els cobais.....	7'8	7'0	7'8
Fickettsia prowazeki <sup>5</sup> ....	Raça guardada en cultiu de teixits. Vi- rulent per al cobai i l'home.....	7'8	8'4	8'4

1. Les dimensions de les lesions i de les àrees de difusió foren mesurades vint-i-quatre hores després de les injeccions. 2. Proporcionat pel doctor G. Rake. 3. Descriu per G. Schwartzman (13). 4. Descriu per G. Schwartzman (14). 5. Proporcionat i estudiat pel doctor C. Nigg (15).

l'origen i la descripció del material emprat amb els resultats de les proves.

Entre el grup inclòs en la taula VII hi ha microorganismes coneguts com a virulents per l'home i pels animals de laboratori, sense, però, un poder invasor local marcat i amb un contingut corresponentment baix de factor difusor. Es el mateix fet que es troba en tres races d'estreptococs en el grup anteriorment consignat.

### DISCUSSIÓ

Els experiments consignats ací semblen justificar la conclusió que la invasió de la pell pels estafilococs depèn de la presència en el microorganisme d'una substància que augmenta marcadament la permeabilitat del teixit, facilitant així la invasió. La presència d'aquest factor sembla ésser la principal diferència, entre les races invasores i no invasores de la bactèria ja que la raça no invasora, injectada amb el factor derivat de la bactèria invasora o del testicle, és capaç de produir lesions comparables, per l'extensió i la gravetat, a les produïdes pels microorganismes invasors. Com el factor testicular, la substància de les bactèries no és específica en la seva acció, ja que no solament augmenta la permeabilitat cutània de totes les espècies animals provades, independentment de les diferències en llur susceptibilitat al microorganisme productor del factor, sinó que també exalta la invasivitat d'altres bactèries, a més de la de la qual deriva, i dels virus. Queda per a determinar quina relació existeix entre aquesta substància i la toxina estafilocòccica.

Que un factor similar juga un paper important en la invasivitat d'altres microorganismes al costat dels

estafilococs, es veu clarament pels nostres resultats amb els estreptococs i més completament per les observacions de Goodner sobre el neumococ (3). D'aquestes investigacions sembla cert que el poder d'aquest important grup de patògens d'envair el teixit de l'hoste depèn de la presència en l'organisme d'un factor capaç d'augmentar la permeabilitat tissular.

El terme invasivitat sembla descriure el poder difusor de les races estudiades, i per aquesta raó se l'ha emprat en tota aquesta nota. En la majoria de casos el microorganisme posseeix la virulència i la invasivitat, però hi ha exemples de bacteries que són francament virulents quan s'introdueixen per certes vies, i que no presenten invasivitat local i no fabriquen el factor difusor. Pot deduir-se d'això que la virulència i la invasivitat no són la mateixa cosa. S'han d'estudiar moltes més espècies bacterianes abans de formular cap conclusió final sobre aquest punt.

El pas del factor difusor a la circulació a partir d'infeccions locals i la seva acció generalitzada augmentant la invasivitat pot donar una explicació de certes observacions clíniques sorprenents sobre infeccions combinades. És possible que un organisme portador d'aquest factor pugui obrir els teixits a un altre agent potencialment més perillós. Les anomenades invasions secundàries tenen un paper important en certes epidèmies d'influenza, i particularment en la influenza dels porcs, per actuar molt bé en aquest sentit (16).

En les consideracions sobre la naturalesa del factor derivat de les bacteries, es pensa de seguida amb les seves relacions amb les agressines de Bail. Les agressines i el factor difusor tenen de comú la propietat d'exaltar les infeccions experimentals i ambdues són formades per les bacteries *in vivo* i *in vitro*. Per altra

banda, les agressines es diferencien de l'agent difusor que són específiques, antigèniques, termolàbils, i llur acció se suposa ésser la inhibició de la fagocitosi. A més, les agressines s'han trobat en espècies bacterianes que no produeixen factor difusor en quantitats apreciables. És veritat que les agressines estan lluny d'ésser entitats ben definides i és possible que l'anàlisi portat a darrer extrem, certs extractes agressítics continguin el factor difusor en quantitats suficients per a tenir certa activitat difusora.

#### CONCLUSIONS

Les races invasores d'estafilococs i d'estreptococs contenen un factor soluble que augmenta marcadament la permeabilitat tissular i exalta les infeccions produïdes per aquests organismes, per altres bactèries i per virus vacunal.

Les races no invasores de la mateixa espècie d'estafilococs i d'estreptococs no contenen aquest factor.

La substància exaltant fabricada localment pels microorganismes passa a la sang circulant i produeix un augment general de la permeabilitat tissular; pot actuar exaltant infeccions locals.

El factor és similar, en els fenòmens que produeix al factor difusor extractat de molts teixits animals, especialment del testicle.

És un plaer remerciar el doctor J. B. Murphy, en el laboratori del qual s'ha portat a cap aquest estudi, pel seu interès constant i pels seus consells en el decurs del treball experimental i en la redacció d'aquesta nota.

*The Rockefeller Institute for Medical Research.  
New York.*

## BIBLIOGRAFIA

1. M. Heidelberg i O. T. Avery, Journ. Exp. Med., xxxviii, 73; 1923.
2. K. Goodner, Journ. Exp. Med., LIV, 847; 1931.
3. K. Goodner, Journ. Exp. Med., LVIII, 153; 1933.
4. F. Duran-Reynals, C. R. de la Soc. de Biol., xcix, 6, 1928; Journ. Exp. Med., I, 327, 1929. — F. Duran-Reynals i J. Pi i Suñer, C. R. de la Soc. de Biol., xcix, 1908; 1928. — F. W. Stewart i F. Duran-Reynals, Journ. Exp. Med., I, 341; 1929. — D. C. Hoffman, Journ. Exp. Med., LIII, 43; 1931. — M. Pijoan, Journ. Exp. Med., LIII, 37; 1931. — F. Duran-Reynals i F. W. Stewart, Amer. Journ. Cancer, xv, 2790, 1931, i d'altres.
5. D. C. Hoffman i F. Duran-Reynals, Journ. Exp. Med., LIII, 387; 1931. — D. McClean, Journ. Path. and Bact., xxxiii, 1045; 1930.
6. G. Favilli, Journ. Exp. Med., LIV, 197, 1931; Journ. Cell and Comp. Physiol., II, 1, 1932. — D. McClean, Journ. Path. and Bact., xxxiv, 459; 1931.
7. A. Claude i F. Duran-Reynals, observacions no publicades.
8. F. Duran-Reynals, Journ. Exp. Med., LV, 703; 1932.
9. J. W. Bigger, C. R. Boland i R. A. O. O'Meara, Journ. Path. and Bact., xxx, 261; 1927.
10. F. Griffith, Journ. Hyg., xxvii, 113; 1928. — M. H. Dawson i H. P. Sia, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., xxvii, 989; 1929-30. — J. L. Alloway, Journ. Exp. Med., LV, 91; 1932.
11. M. Pinner i M. Voldrich, Journ. Infect. Dis., I, 143, 185; 1932.
12. T. M. Rivers, Journ. Exp. Med., xli, 179; 1925.
13. G. Shwartzman, Journ. Infect. Dis., xlv, 232; 1929.
14. G. Shwartzman, Journ. Infect. Dis., lII, 563; 1930.
15. C. Nigg i K. Landsteiner, Journ. Exp. Med., LV, 563; 1932.
16. R. E. Shope, Journ. Exp. Med., LIV, 373; 1931.