

ORIGEN I NATURALES DE LES DIASTASES BACTERIOLÍTIQUES

per

R. TURRÓ

I

ORIGEN DE LES DIASTASES BACTERIOLÍTIQUES

En una sèrie de treballs publicats, llur majoria en els cinc anys primers d'aquest segle, he demostrat que les cèl·lules de tots els teixits a l'estat soluble lliuren diastases que ataquen les bactèries amb més o menys energia segons el teixit d'on provenen i segons l'espècie atacada (1). Per bé que aquests treballs fossin multiplicats i de fàcil control, passaven gairebé inadvertits. En efecte, hom creia aleshores com article de fe que únicament els polinuclears hemàtics podien rendir aquest especial gènere de diastases. Es poden recomptar encara els experimentadors que realitzen aquesta prova : entre ells n'hi hagué almenys un que, en 1908, publicà els fets apropiant-se'ls, sense que, d'altra part, obtingués més èxit que el que nosaltres havíem assolit precedentment.

Per tal de situar les noves recerques que nosaltres havem emprès més recentment (1920) sobre aquesta

matèria, i de les quals havem donat compte a la Societat de Biologia (1921) en quatre successives comunicacions, precisa de fer memòria, en un resum molt breu, dels nostres antics treballs.

Les glàndules tiroïdes de bou, moltó o porc, prèviament tallades, premsades després, proporcionen un suc que, un cop filtrat, net i transparent, es conserva amb l'addició de fluorur sòdic a l'abric de l'aire i de la llum. Si a 10 cc. d'aquest líquid s'afegeix el raspap d'un cultiu recent de *B. anthracis* sobre gelosa, a la temperatura de 40°, s'observa, passades 24 hores, que una gran part de les masses bacil·lars estan en ple període de fusió i al cap de dos dies han desaparegut quasi completament: resta un residu amorf de color gris i de consistència mucilaginosa que precipita al fons del tub i es dissol amb solucions febles de sosa o de potassa. Tractant les preparacions pel mètode de Gram, s'observa que, mentre les unes són descolorades per l'alcohol, les altres conserven encara la coloració llur : a una fase més avançada del procés sols s'arriben a tenyir algunes granulacions. La fusió comença per punts isolats de vacuolització, que s'engrandeixen progressivament, fins que es reuneixen, convertint així el filament en una ombra del que era abans. Quan el suc tiroïdà no filtra, i quan resta molt espès o bé quan se l'escalfa a 50° durant deu minuts, la seva difusibilitat sembla que disminueixi; no penetra el bloc bacterià, atacant únicament la superfície de contacte, damunt la qual es formen membranes transparents, de variades dimensions, a voltes desmesurades, que resisteixen els colorants. Evaporant lentament a l'estufa l'aigua que contenen, fixant i colorant la preparació, hom remarca que les bactèries són més agudes.

Ultra el *B. anthracis*, el suc tiroïdà ataca moltes altres espècies de bactèries. Sobre el vibrió colèric

exerceix una acció més ràpida que l'obtinguda en el fenomen de Pfeiffer. Basta de filtrar entre el cubre i portaobjectes una gota d'aquest suc per a observar, quan arriba al camp on s'encamina, la immobilització instantània dels bacils, llur transformació esferoidal o globular i llur fusió completa poc després.

El suc de la carn es prepara com el precedent. La seva acció lítica sobre grans masses de *B. anthracis* i sobre altres espècies és evident, encara que menys enèrgica.

Els teixits que, com el teixit esplènic, l'hepàtic, el renal, etc., no donen suc per prensació, són tractats, per a obtenir extrems actius, de la manera següent. Se'ls talla a bocins (del ronyó se n'utilitza solament la substància cortical), se'ls tritura al morter amb sorra fina fins a reduir-los a pasta, s'hi ajunta el triple o el quàdruple de llur pes d'aigua saturada de fluorur de sodi, es decanta, es filtra el líquid de la maceració, i es recull en els meus tubs d'anaeròbics (simple modificació del tub de Buchner) (1). S'afegeix a la part superior tres o quatre centímetres cúbics d'una solució forta d'àcid pirogàl·lic i una petita quantitat de potassa, i es tapa amb un tap de goma. Si hom assaja la potència lítica de cada un d'aquests extrems sobre el *B. anthracis*, s'observa que entre certs límits és comparable a la dels suc de carn i de tiroides; també, així mateix, sobre altres espècies bacterianes. El raspat procedent d'un tub d'agar sembrat la vigília és dissolt en l'espai de 24 a 48 hores. Resten, per tant, alguns bacils, relativament poc nombrosos, que semblen refractaris a llur acció, ja que no solament conserven llurs propietats tintorials, sinó que no experimenten cap deformació.

Els ganglis limfàtics, ni ben triturats, deixen tampoc diastases en l'aigua de maceració. Però si en condicions anaeròbiques se'ls deixa a l'estufa aproximadament

un mes, sense que l'aigua hagi perdut la seva transparència natural, ella es mostra activa davant el *B. anthracis*. La polpa de substància nerviosa no cedeix pas diastases a l'aigua de maceració, per prolongada que aquesta sigui.

En resum, en els nostres primers treballs havem pogut constatar, pels procediments sobreindicats, la presència de diastases que ataquen el *B. anthracis* en els sucus obtinguts per mitjà de la premsació (carn i cos tiroides) i en les maceracions de la substància cortical del ronyó, del fetge, de la melsa, dels pulmons, dels ganglis limfàtics i de la mucosa intestinal. Com que és molt difícil de realitzar asèpticament aquestes operacions, havem assajat un gran nombre d'antisèptics per fer-les pràctiques i fàcilment controlables. Entre aquests el que millor resultat ens ha donat és el fluorur de sodi. En fi, no es deu pas oblidar que les diastases obtingudes amb els nostres extrems cel·lulars són sensibles a l'acció de l'aire: per tant deuen conservar-se en mitjà sense oxigen.

Temps després de la publicació d'aquests treballs, Jobling demostrà que les propietats antitripsiques del sèrum depenen de la quantitat d'àcids grassos no saturats i de sabons que conté. Tractant-la amb cloroform s'observa que la tripsina recobra la seva activitat, com la recobren les leucoproteases que ataquen les bactèries. Si, d'altra part, els àcids grassos de les bactèries són primerament tractats pel cloroform, hom constata igualment que són més fàcilment atacades pel sèrum.

La descoberta de Jobling ens suggerí la idea que, tractant els àcids grassos de les nostres maceracions cel·lulars com els del sèrum, augmentariem també llur potència bacteriolítica. Practicàrem l'assaig amb suc de carn, observant que l'addició de cloroform la pertorbava i determinava precipitacions que anul·len o dismi-

nueixen l'acció dels seus ferments sobre el *B. anthracis*. Assajarem de seguida amb d'altres maceracions, i els resultats foren anàlegs. Descoratjats per aquest fracàs, encaminarem les coses en un altre sentit per demostrar en les nostres maceracions la tesi mateixa que Jobling havia demostrat relativament al sèrum. El procediment adoptat a la fi com a més pràctic i més demostratiu fou el següent. L'òrgan recentment extret de l'animal (fetge, melsa, pulmó, etc.), triturat al morter, és deshidratat per mitjà de l'acetona : es filtra, es desseca en el buit, i després es polvoritza finament. 1 gr. de pólvor és incorporat a 20 cc. d'aigua salada a 1 : 100 amb 40 o 50 gotes de cloroform. S'agita fortament durant quinze minuts, i es transporta a l'estufa a 40°, on la barreja resta dotze hores. Hom repeteix la mateixa operació en un altre tub sense cloroform que serveix de testimoni. Després d'aquest temps, se centrifuga i es decanten els dos tubs o simplement es filtra : del primer se n'obté un extret net i transparent com l'aigua clara, molt actiu sobre el *B. anthracis* i les altres espècies; del segon un líquid gairebé sempre inactiu. L'alliberament de les diastases cel·lulars sota l'acció del cloroform apar assolir el seu màxim al cap de dotze hores : si hom assaja l'extret d'una hora, s'adona que, passat aquest temps, la seva potència bacteriolítica decreix fins a desaparèixer completament.

Aquest és el nostre procediment per a obtenir els nostres extrems de ferments cel·lulars, que es mostren actius sobre un gran nombre d'espècies, per bé que nosaltres l'assagem preferentment sobre el *B. anthracis*. L'activitat llur no és pas menys evident quan hom els fa actuar sobre un gran nombre de compostos químics, dels quals deixarem de banda l'estudi per no separar-nos de l'objecte principal d'aquest treball. L'única excepció

que fem a aquest punt de vista és per al glucogen, tota vegada que la diastasa que l'hidrolitza és comuna a tots els teixits i és tan enèrgica en l'extret de pàncreas que liquida fàcilment l'engrut de midó. Ens abstenim d'assenyalar aquí el que havem observat en altres substàncies per donar més unitat al nostre treball.

Leucolisines. — L'activitat de les leucolisines obtingudes pel mètode de Buchner o les maceracions salines i el mètode de Bengou, que és indubtablement el que dóna més gran rendiment, és inferior a la que havem obtingut amb el pus o els exudats pleurals o peritoneals.

Provoquem un abscess al baix-ventre dels gossos. Quan la supuració és manifesta, hom recull el pus i el renta tres vegades seguides. Hom deshidrata de seguida per mitjà de l'acetona, filtra i desseca al buit, després polvoritza. S'incorpora 1 gr. de pólvor a 20 cc. d'aigua salada amb 50 gotes o més de cloroform, es tapa, s'agita fortament i es transporta a l'estufa durant dotze hores. Es centrifuga i es decanta o bé es filtra i s'assaja la potència amilolítica de l'extret sobre el glucogen i la seva potència bacteriolítica sobre el *B. anthracis*.

Acció amilolítica. — 1 cc. de glucogen a 1 : 100 més 1 cc. d'extret : hidrolisi completa al cap de 24 hores.

Acció bacteriolítica. — Per a mesurar la potència bacteriolítica de l'extret, no ens servim pas de la numeració de les colònies. Aquest mètode és excel·lent per a demostrar aquest poder, però no per a fixar-ne la mesura. Precisa de pesar els bacils que l'extret digereix en una unitat de temps. Bengou tingué la mateixa idea per a evaluar la potència del seu extret. Nosaltres pesem colònies d'un tub de gelosa molt nutritiu, de calibre

mitjà, la superfície del qual, inclinada, ha estat sembrada de *B. anthracis* 24 hores abans, per tal d'evitar la seva esporulació : ens dóna 122 mil·ligrams. 224 mil·ligrams de cultiu fresc provinent dels dos tubs són diluïts en 20 cc. d'aigua salada, a la qual s'ajunta 1 cc. d'extret. A 40° la disminució dels gèrmens és remarcable en les preparacions al cap de sis hores : llur fusió és completa després de vuit; només alguns bacils molt rars semblen resistir l'acció de les diastases. El líquid no es pertorba pas durant el període de la fusió dels gèrmens, els quals formen una mena de núvol que precipita lentament i es dissol per la sosa. L'extret apar filtrar-se pel bloc bacil·lar en la seva totalitat : no forma mai a la superfície les membranes transparents de les quals havem parlat a propòsit de les maceracions d'alguns teixits. La fusió comença per petites zones vacuolades que s'engrandeixen fins a la fusió del bloc. El Gram continua positiu al començ d'aquesta vacuolització : perquè esdevingui negatiu precisa que el bacil arribi a un cert grau de desintegració, i encara és possible que a l'acció de l'alcohol retingui la color en certes zones menys desintegrades.

Si, després d'haver diluït els bacils en aigua salada, hom els fa bullir i quan esdevenen freds hi afegeix extret, observa que les leucolisines no els ataquen : sembla que s'hagi fet difícil llur fixació damunt el bloc. Però si es perllonga aquesta ebullició trenta minuts i més, llur dissolució esdevé fàcil.

Les masses bacil·lars tractades primerament pel cloroform, seguint en aquest punt les indicacions de Jobling, són dissoltes per les leucolisines en menys de la meitat del temps emprat en llur dissolució natural. Les espores madures no són atacades sinó després d'aquest tractament. Quan l'esporulació comença en les unitats del filament, són més sensibles a l'acció diastàsica : a

una fase més avançada resisteixen millor, i quan estan lliures són indemnes.

Les leucolisines de l'extret són actives sobre un gran nombre d'espècies. Nosaltres n'hem comprovat els efectes sobre l'*estafilococ* i l'*estreptococ*, sobre el *bacil tífic* i el *vibrió colèric*. Les granulacions dels primers perden el Gram més ràpidament que el *B. anthracis*, i es vacuolitzen també més activament. Per avançada que sigui aquesta vacuolització, s'observa que, sembrant-les sobre plaques, es regeneren com si no haguessin arribat a un període de completa dissolució : passa el mateix amb els bacils carbunculosos. Repetint, amb paciència, diverses vegades l'experiment, s'arriba a concloure: mentre resti un fragment cel·lular, ell és suficient per a generar la unitat morfològica, transportant-lo a un mitjà apropiat.

Amb el *bacil tífic* i el *vibrió colèric* s'observa que, sota l'acció d'aquestes diastases i d'algunes altres, els flagells són atacats vivament; cosa que explica llur momentània immobilitat. Acaben per desaparèixer completament per la fluïdificació progressiva de la substància bacil·lar sense que els vibrions acusin la transformació globular que havem vist que sofrien a l'acció del suc tiroidià. D'aquesta darrera espècie es pot afirmar que és de les més sensibles a l'acció dels extrems.

Els extrems obtinguts amb els exudats pleurals o peritoneals provocats pels procediments usuals són més actius que els del pus.

Extracció dels ferments de la carn. — Es procedeix de la mateixa manera que per a l'extracció de les leucolisines. La carn que ens ha donat millors resultats és la de moltó sacrificat recentment. Es talla curosament, es tracta per l'acetona i es polvoritza. Després d'haver

posat 1 gr. d'aquests pólvors en 20 cc. d'aigua salada i 50 gotes de cloroform, i 1 gr. en un altre tub testimoni sense cloroform, hom manté el tot a 40° durant dotze hores : després centrifuga i decanta, o bé filtra i assaja simultàniament llur acció amilolítica sobre el glucogen.

Tub amb cloroform. — 1 cc. de glucogen a 1 : 100 i 1 cc. d'extret : hidrolisi total en menys de sis hores.

Tub testimoni. — Resultats iguals al precedent.

Acció bacteriolítica. — A 1 cc. d'extracte addicionat a 20 d'aigua salada es barreja el raspat de dos tubs d'agar sembrada la vigília amb *B. anthracis* de pes 244 mil·ligrams. Després de sis hores, l'examen microscòpic demostra clarament que els bacils són atacats de forma igual a la descrita precedentment per a les leucolisines, i que un gran nombre d'ells han desaparegut ja quasi completament. Al cap de 8 o 9 hores la dissolució és completa, llevat per a un cert nombre de gèrmens resistents, la proporció dels quals pot calcular-se aproximadament entre un i dos milions. Aquests gèrmens no són dissolts així quan es dobla o triplica la quantitat d'extret actiu.

Tub testimoni. — S'afegeix a aquest tub una petita quantitat de fluorur de sodi. Es constata també la seva acció bacteriolítica sobre el *B. anthracis*, però amb menys d'energia que en el precedent. Alguns bacils es presenten granuloses al cap de dotze hores o rodejats d'una membrana transparent, que esdevé més visible quan es tenyeix de negre el fons de la preparació. La degeneració granulosa s'accentua un poc més després de 24 hores, passades les quals resta estacionària. L'acció favorable

del cloroform en l'alliberament de diastases és extraordinàriament evident mitjançant l'examen comparatiu dels efectes que determinen sobre cada un dels tubs. La carn de moltó lliura ferments extractius quan se la tracta poc després d'haver-se sacrificat l'animal : en plena rigidesa cadavèrica els resultats no són tan clars. Tampoc no ho són tant en la carn de bou, vaca i colom; la de gos no dóna extret actiu : la del conill molt difícilment. Ignorem en quines condicions les carns cedeixen la més gran quantitat de diastases en l'aigua salada sota l'acció del cloroform, i en aquest punt ens es forçat de procedir empíricament.

Extracció de ferment de la substància nerviosa. — A la primeria dels nostres treballs, la maceració de la polpa nerviosa en l'aigua salada no ens donava resultats convincents per temps que la prolonguéssim; però quan 1 gr. de pólvor d'aquesta substància és macerat amb l'addició de cloroform, i en l'ordre de condicions ja descrites, rendeix un extret molt actiu. Els nostres assaigs els havem realitzat amb cervells de gos.

Acció amilolítica. — 1 cc. d'extret hidrolitza en menys de dues hores 0,01 de glucogen.

Acció bacteriolítica. — És, en aquestes condicions, gairebé igual a la de l'extret de carn. En 8 o 9 hores dissol els cultius de dos tubs, sembrats de *B. anthracis*.

L'enorme quantitat de lipoides que conté la substància nerviosa ens ha obligat a forçar la dosi de cloroform fins al 40 i 50 per 100, associant a la seva acció la de l'èter sulfúric. En dos sèries paral·leles de tubs preparats amb 1 gr. de pólvors i 20 cc. d'aigua salada, es nota la influència que aquesta associació exerceix sobre

la riquesa diastàtica de l'extret. Mentre que, amb els tubs que contenen 50 gotes de cloroform, s'obtenen els efectes indicats, amb els que contenen 50 per 100 de cloroform i 6 per 100 d'èter s'observa que l'acció bacteriolítica és més enèrgica.

Després de dues hores es constata que un gran nombre de bacils són atacats, i que les masses de cultiu que no han estat diluïdes lliurement en l'aigua han esdevingut dissoltes en gran part i llur lisi és completa després de sis hores. El nombre de bacils resistents és inferior al que resta amb l'extret de carn. Aquests fenòmens s'accentuen encara més quan hom exhaureix els principis greixosos que formen part de la substància nerviosa. La polpa cerebral fresca de gos addicionada de cloroform al 40 per 100 lliura a l'aigua salada, on hi és macerada a la temperatura de 40°, diastases la potència bacteriolítica i amilolítica, de les quals no es manifesta també sinó en els extrems en pòlvor. Si a la maceració hom hi associa èter sulfúric al 4 per 100, l'acció d'aquestes diastases és reforçada, com en el cas precedent. Centrifugant la maceració de la polpa fresca, no s'obté pas un extret líquid com amb la maceració de pòlvor, sinó un extret d'aspecte gelatinós que forma precipitat al cap de 24 hores.

Extracció dels ferments dels pàncreas. — Amb els pòlvors de la glàndula pancreàtica del gos, del moltó i del bou, s'obtenen els extrems més actius d'entre els que havem assajat. 1 cc. hidrolitza quasi instantàniament 20 cc. de glucogen al 1 per 100, la mateixa quantitat d'engrut de midó en 15 minuts i de midó cm. en 24 hores. Colònies de quatre tubs sembrats de *B. anthracis* la vigília, de pes 488 mil·ligrams, emulsionats en 20 cc. d'aigua salada, a la qual hom afegeix 1 cc. d'extret, es

mostra a l'examen microscòpic sensiblement modificat en una o dues hores. Un gran nombre de filaments es presenten a les darreres fases de la fusió : els espais que separen els bacils els uns dels altres són més amples i molts d'entre ells estan lliures amb Graham positiu o negatiu, segons l'estat de vacuolització. En dues o tres hores aquests fenòmens s'accentuen, i després de tres o quatre llur desaparició és completa. Si és fa bullir l'emulsió abans d'ajuntar-hi l'extret, sembla que resisteixin una mica més a l'acció diastàtica, però poc després són atacats amb la mateixa energia; si l'ebullició es manté durant trenta minuts, es facilita la seva acció. Els bacils tractats primerament pel cloroform es fonen amb una velocitat prodigiosa.

Els extrems pancreàtics ataquen un gran nombre d'espècies sapròfitas o patògenes, tant si s'assagen en un cultiu pur com en una barreja de cultius. Determinen la transformació globular del vibrió colèric. En trenta minuts digereixen 10 mil·ligrams del seu cultiu. En contra, ataquen tardament el bacil tífic.

Extret de tiroide. — La polpa d'aquesta glàndula deshidratada per l'acetona i dessecada al buit dona uns pólvors la maceració dels quals a l'aigua salada proporciona un extret molt actiu contra el *B. anthracis*. L'addició de cloroform no afavoreix l'alliberament de ferments. Tal vegada el fet podria explicar-se per l'acció del iode que la glàndula conté. Hom sap, en efecte, que les preparacions de iode afavoreixen la saturació d'àcids grassos, com ho han demostrat Jobling i Petersen. L'energia bacteriolítica manifestada pel suc tiroidià obtingut per premsació, molt superior a la de les altres maceracions, és deguda potser també a aquesta causa.

Extret de fetge i de ronyó. — Amb l'objecte d'eliminar totes les causes d'error en els extrems del teixit hepàtic, atribuint al fetge ferments potser d'origen hemàtic, l'havem sotmès durant força estona a un rentat per corrent d'aigua (Cl. Bernard). Després d'haver-lo reduït a pólvor i obtingut l'extret, el ferment amilolític hidrolitza 1 cgr. de glucogen en 24 hores. L'energia amb què ataca la unitat de pes de *B. anthracis* és un poc menor que la de l'extret de carn. Ataca el vibrió colèric sense inflar-lo esfèricament, com fa l'extret pancreàtic. El bacil tífic es mostra més sensible a l'acció de l'extret hepàtic. En cap cas de tots els extrems que he assajat no he pogut observar una acció tan decisiva i tan ràpida com la que exerceix sobre aquesta espècie.

Obtenim l'extret renal dels pólvors elaborats únicament amb la substància cortical. La seva acció amilolítica és molt feble. 1 cc. de glucogen en solució a 1 per 100 és hidrolitzat parcialment al cap de 24 hores. La seva acció bacteriolítica sobre el *B. anthracis* és comparable amb la de l'extret hepàtic; també així per la lisi del vibrió colèric.

En els nostres primers treballs — llavors que era viva la qüestió de saber si les bacteries injectades en els parènquimes eren o no fixades, com ho són les que estan englobades en el leucocit — nosaltres poguérem demostrar que la glàndula renal «in vivo» era el sol teixit amb el qual es podia demostrar el fet pel vibrió colèric d'una manera clara i ostensible. El dispositiu de l'experiència imaginat pel meu col·laborador Pi i Suñer era el següent. Posat al descobert un dels ronyons d'un gos, hom introdueix en el seu urèter un llarg tub de vidre per on s'escola l'orina. En aquestes condicions, s'injecta ben a poc a poc sota la càpsula una emulsió espessa de vibrions. El primer efecte d'aquesta inspecció és la

inhibició de la secreció urinària; després de tres o cinc minuts, a voltes menys, l'orina recomença a gotejar escassament per l'extremitat del tub. Es recullen aquestes gotes sobre un portaobjectes i s'examinen directament al microscopi, i s'observa que els bacils s'inflen en forma esferoidal i desapareixen, transformant-se en una substància d'aspecte mucós. L'extret no ataca el bacil amb aquesta energia i aquesta rapidesa, i no determina la seva transformació globular, com si, per la seva més gran difusibilitat, penetrés en el bloc bacil·lar, vacuolititzant-lo totalment, mentre que els ferments del ronyó semblen inflar successivament les capes exteriors al punt central rodó i colorejable, que acaba igualment per dissoldre's.

Altres extrets dels ferments cel·lulars. — Demés dels precedentment mencionats, havem obtingut extrets dels ganglis limfàtics, el raspat de la mucosa intestinal, del teixit pulmonar, dels testicles, d'ovaris i de medul·la d'os. L'lur potència bacteriolítica sobre el *B. anthracis* i els altres gèrmens, més o menys gran segons l'òrgan d'on provenen, és general, com ho és també la presència de la diastasa que hidrolitza el glucogen.

Inactivació dels extrets. — Els extrets que obtenim de la matèria cel·lular primerament reduïda a pólvor, comprenent-hi l'extret pancreàtic, que és el més actiu de tots, perden llur activitat a 40° al cap de 12 hores. Ni l'aire ni la llum semblen ésser la causa d'aquest fenomen, ja que en els tubs anaeròbics i en l'obscuritat passa el mateix, en igualtat de condicions tèrmiques. Aquesta inactivació esdevé en 6 hores quan els extrets actuen sobre una emulsió de *B. anthracis*. Per a demostrar-la, és suficient de centrifugar-les i d'assajar l'aigua de de-

cantació amb nous bacils : no s'observa deformació encara que el contacte sigui indefinit. Aquesta segona inactivació, més precoç que la primera, sembla dependre de la fixació de les diastases solubles que l'extret conté, sia sobre les substàncies dissoltes, sia sobre els blocs bacterians no dissolts encara. Així, nosaltres, havem observat que, després de 6 hores de contacte entre l'extret de carn i l'emulsió, la lisi bacteriana és visible i remarkable, i encara que l'extret sigui inactiu, aquesta lisi no arriba als seus últims límits fins al cap de 8 o 9 hores; cosa que tendeix a demostrar que les diastases solubles que han desaparegut de l'aigua salada continuen exercint llurs efectes sobre la matèria bacteriana, en la qual s'han fixat. El fet següent provoca la justesa d'aquesta interpretació : si hom recull el sediment centrifugat i l'evapora en el buit, es mostra de nou actiu, quan se l'emulsiona amb aigua salada, sense que en aquesta sigui possible de provar-hi l'existència de diastases solubles. És precís, doncs, d'admetre que aquestes diastases, adherint-se a les substàncies que liquiden o hidrolitzen, no es redissolen en l'aigua salada perquè hi resten fixades.

L'ebullició suprimeix l'activitat dels extreus; però quan aquests són sotmesos durant una hora a una temperatura de 55°, aquesta activitat no és sensiblement modificada. És difícil de fixar experimentalment l'«òptimum» dels nostres extreus. Si llurs diastases es comportessin sobre les emulsions de *B. anthraci* amb la mateixa uniformitat que ataquen l'engrut de midó, seria fàcil de fixar amb exactitud la temperatura més convenient per a la dissolució completa d'una unitat de pes determinat en relació amb la unitat de temps. Però hi ha moltes raons per a creure que els bacils són més o menys resistents a l'acció diastàsica, i, com s'ha indicat, n'hi ha que són refractaris a aquesta acció. La manca d'ho-

mogeneïtat en la matèria bacil·lar fa difícil la determinació d'aquest «òptimum». La temperatura més favorable oscil·la aproximadament entre 40° i 45°.

Els pólvors dels teixits s'inactiven espontàniament. Sis hores després d'haver estat dessecats en el buit, no cedeixen ja a l'aigua salada diastases d'igual activitat. Durant sis o vuit dies resten sensiblement estacionaris d'aquesta pèrdua inicial. El dècim dia aquesta decreixença s'accentua notablement : els extrems que se n'obtenen són molt febles, però poden reactivar-se amb l'addició d'extrems frescos. Al cap de més dies resten completament inactius i no reactivables. Convé de conservar-los a baixa temperatura o en una atmosfera seca.

II

NATURALESA DELS FERMENTS BACTERIOLÍTICS

Descoberts, primer en els leucocits i de seguida en els humors, ferments que ataquen les bactèries, sembla que la teoria, formulada ja de primer antuvi, admesa després encara, sobre llur naturalesa, és idèntica a la teoria general dels ferments que ens dóna la química biològica. A primera vista, apar que la liqüefacció de la fibrina o de l'albumina coagulada sota l'acció d'una proteolisi o la dissolució del bloc bacterià sota l'acció de certes energies zimòtiques, són fenòmens del mateix gènere. Aquesta identitat, però, és més aparent que real. Per a demostrar-ho bastarà recordar, encara que breument, la concepció que la teoria humoral i la teoria

fagocitària formulaven sobre els ferments que ataquen les bactèries i la concepció que els fisiòlegs tenen dels ferments en general; qüestió important de precisar currosament per tal d'evitar confusions ulteriors.

Quan Metchnikoff hagué descobert la fagocitosis, s'explicà la desaparició progressiva de les bactèries en la massa del leucocit que les englobava per una digestió intracel·lular anàloga a la que havia observat en els mixomicets protozous i metazous enfront les partícules alimentoses que empresonen. Creient que la naturalesa havia dotat aquestes cèl·lules d'enzimes apropiats per a la digestió de les bactèries, no dubtà pas un moment que no estiguessin destinats a aquest objecte, i que, per consegüent, aquests enzimes es diferenciarien dels altres perquè si atacaven les bactèries, restaven inactius en presència de tota altra substància. Quan hom descobrí, poc després d'aquests treballs, propietats bacteriolítiques semblants en l'humor sanguini, s'atribuí el fet a una substància protectora, possiblement isolable, que Buchner, per aquesta raó anomenà *alexina*. Es cregué, així, que aquesta acció zimòtica s'exercia *únicament* sobre les bactèries. Ningú no prejutjà, al principi, l'origen d'aquesta substància: es suposava formada en la sang. Metchnikoff l'atribuí a la lisi dels leucocits. En condicions normals aquesta lisi seria nul·la o gairebé nul·la; la defensa de l'organisme, confiada preferentment a l'activitat fagocitària. *Post mortem* seria molt activa; de la qual cosa se segueix l'augment de la potència bacteriolítica en el sèrum. Enteses així les coses, les bacteriolisis intracel·lular i humoral s'explicaren per una mateixa causa : les energies que atacaven les bactèries englobades pels leucocits les atacaven en els humors quan, per un accident cel·lular qualsevol hi eren difoses. Aquest ferment lliure fou anomenat *citasa* per Metchnikoff. Buchner no cregué

que l'*alexina* fos adventícia o purament accidental en els humors, sinó constant, i l'atribuí a una exudació o secreció leucocitària que la vessava en el mitjà ambient. De la seva part, Ehrlich li atribuí un origen pluricel·lular, imaginant per a això *en les cadenes laterals* un grup zimògen destinat a elaborar-la o elaborar-les, si se suposa que són diverses, ja que no s'ha pogut demostrar que a aquesta pluralitat d'origen cel·lular correspongui una pluralitat d'*alexines* en els humors.

Els ferments que ataquen les bactèries en els humors provenen exclusivament dels polinuclears hemàtics o de grups zimògens «ad hoc» existents en elements cel·lulars, admetent sempre l'existència suposada de ferments especials per a les bactèries. Totes les teories coincideixen sobre aquest punt : doncs, aquest punt és precisament el que hi ha de discutible en totes. *No hi ha ferments que ataquen les bactèries : el que hi ha són ferments que ataquen les espècies químiques que les componen i independentment de la individualitat de la qual formen part.* Quan, amb tècnica admirable, es demostrà la digestió intracel·lular de les bactèries, no s'observà que aquests éssers eren complexos químics, dels quals cada component havia d'ésser atacat per una reacció zimòtica adequada a la seva naturalesa : es veié, en contra, en el fenomen, la simple destrucció d'éssers extremadament perjudicials, i sota l'obsessió de la idea de defensa hom no dubtà de creure que la naturalesa havia dotat les cèl·lules de ferments especials contra les bactèries per preservar l'organisme de llur atac. La «immunologia», en lloc de cenyir-se a observar què és el que en les bactèries ataquen els enzimes leucocitaris i com ho ataquen, procedint com els fisiòlegs davant la digestió gàstrica, per exemple, s'ha demanat *per què les ataquen*, enfocant així filosòficament un problema de naturalesa experimental. Si posem

el problema damunt el seu propi terreny, no podrem establir cap diferència entre la forma d'atac dels ferments leucocitaris sobre determinades substàncies i llur manera d'atac sobre les espècies químiques que componen les bactèries. Hom sap que els extrems leucocitaris ataquen la peptona, líquiden la clara d'ou coagulada, la gelatina, la fibrina, la caseïna; que hidrolitzen el glucogen; que en presència de la margarina o l'estearina formen àcids grassos. Com que no és possible dissociar la naturalesa d'aquestes accions de la naturalesa química de les substàncies sobre les quals s'efectuen, hom anomena la major part proteolítiques, amilolítiques les altres i les restants lipolítiques. Igualment amb les bactèries englobades. En presència del *B. amylobacter*, és per una acció amilolítica que ens expliquem la líquiefacció del midó, potser el seu desdoblament: únicament una acció proteolítica o lipolítica pot explicar la fusió o la fragmentació de la proteïna del *B. tífic* o del greix del *B. tuberculós*. No tenim necessitat de la intervenció de *ferments providencials* per a explicar les modificacions que poden sofrir dintre la massa leucocitària els gèrmens empronats: basta que la presència d'aquesta matèria estranya desperti en la matèria viva reaccions zimòtiques apropiades a la seva naturalesa química. Així comprem que, de la mateixa manera que és atacat el bloc fagocitat, ho serien els seus components si ens fos cosa fàcil dissociar-los.

El que diem dels ferments leucocitaris és igualment aplicable als dels plasmes circulants. Se sap que en aquests plasmes existeixen potents energies que descomponen la matèria entrada per via parenteral. Com que les bactèries no difereixen de composició de les altres matèries orgàniques, les espècies químiques que les componen són atacades com els grups similars dels altres

aliments. És cert que, en l'estat actual dels nostres coneixements, no sabem gairebé res del que passa després que aquests compostos són pervinguts a matèria soluble; contràriament al que ens passa per als altres grups químicament definits, dels quals hom estudia en sèrie la desintegració (glucosids, sacàrids, polipèptids, etc.). Precisament perquè ignorem la naturalesa química dels components en les espècies que diferenciem nominalment, no sabem si la proteolisi de llurs matèries proteiques és més o menys completa en les unes que en les altres o si n'hi ha que són atacades : així mateix en el que afecta a la desintegració dels hidrats de carboni als greixos. La sola cosa que positivament observem és que els blocs bacterians es dissolen en el si de l'humor sanguini fins a desaparèixer. Però encara que ignorem com són atacats els seus principis components, no tenim el més petit dubte que passen per fases anàlogues a les de tota matèria alimentosa en el curs de les transformacions. Si la qüestió s'examina des del punt de vista on ens col·loca la química biològica, la hipòtesi de l'*alexina* s'esvaeix. Era natural que s'atribuís la dissolució de les bactèries a ferments especials mentre aquest fenomen fou conegut isoladament; però si la bacteriolisi forma part d'un procés digestiu més general, evidentment aquesta hipòtesi no té ja raó d'existència.

La qüestió que acabem d'examinar de la naturalesa dels ferments que ataquen la matèria bacteriana està en íntima relació amb el problema de l'anabòlia d'aquesta matèria i la formació dels anticossos en els organismes vacunats. Ehrlich, que fou el primer de considerar l'antigen bacterià com una matèria alimentosa, suposà que, una vegada reduït a matèria soluble per l'*alexina* o *complement*, estava en condició d'ésser fixat en els *receptors*, per la qual cosa el creia directament anabolit-

zable. Com que no el podia concebre així fora del seu element tòxic, una necessitat més lògica que objectiva el forçà a distingir, en la molècula alimentosa, el grup *toxophor* del grup *haptophor*. Mentre que la fixació del primer determinaria la *caiguda* o *despreniment* dels receptors, llur regeneració consecutiva i llur multiplicació ulterior, el segon, inofensiu, podria fixar-se impunement.

La tesi d'Ehrlich és, en aquest punt, tan inadmissible com la de l'*alexina*. La molècula estranya, sigui tòxica o no, no pot tenir afinitats amb la matèria vivent sense que aquestes afinitats donin lloc a la neoformació de productes que alteren la composició d'aquella : pel simple fet d'ésser estranya, no pot en cap ocasió ésser inofensiva. La unitat de composició de la matèria vivent de tots els elements cel·lulars homogenis es conserva idèntica a ella mateixa a través de la vida individual i la de l'espècie, encara que es renovelli amb materials que són en llur origen de composició diferent i molt variada. Per tal que aquestes unitats, molt complexes, es puguin conservar indefinidament, és indispensable que, sota l'acció dels ferments, la matèria alimentosa amb la qual deuen reparar llurs pèrdues sigui successivament simplificada, fins a ésser reduïda a molècules molt simples que s'hi incorporen sense alterar llur tipus original de composició. Aquesta demolició primera i aquesta reconstrucció ulterior han estat comparades a l'edifici que pot elevar-se amb les ruïnes d'altres edificis segons un pla arquitectural determinat.

Si la nutrició s'efectua en aquestes condicions, és evident que la tesi d'Ehrlich és insostenible. No basta que la matèria bacteriana hagi estat reduïda a l'estat soluble per a considerar-la ja anabolitzable, determinant en el si de la matèria vivent aquestes reaccions pròpies de la immunitat adquirida que coneixem amb el nom

d'aglutinines, opsonines, antitoxines, lisines, etc. : és absolutament indispensable que l'antigen hagi passat per una demolició digestiva primera de la mateixa naturalesa que la soferta per tota mena de matèria alimentosa. Fins a una època relativament recent no s'obtingué de la digestió de la matèria heterogènia el concepte que en tenim ara. Hom creia aleshores que els productes de la digestió intestinal, depurats pel fetge, lliuraven directament als elements cel·lulars els principis amb els quals reparen llurs despeses : i així se suposava que una lavativa de peptona, per exemple, era nutritiva. La líquefacció dels productes estranys introduïts per via parenteral (la seda o el catgut, per exemple, amb els quals hom saturava les ferides) bastava perquè la reabsorció els cedís als teixits com a materials assimilables. Després d'uns quants anys s'ha vist que els mecanismes fisiològics que preparen la matèria alimentosa per a una incorporació possible són molt més complexos del que es creia. Llurs cèl·lules conserven indefinidament llur unitat de composició a condició que restin inaccessibles a la irrupció de la matèria exterior : els canvis que en resultarien li serien sempre nocius. Els antígens bacterians no formen excepció de la llei comuna. Fisiològicament no es concep pas llur anabòlia sense una destrucció primera. Suposar que aquesta destrucció es realitza per mitjà de ferments especials encarregats d'atacar les bactèries per defensar l'organisme contra la infecció, és suposar que aquests ferments distingeixen els cossos dels quals les espècies antigèniques formen part, i això és tèrbola metafísica. Els ferments són mecànicament apropiats a les substàncies que ataquen : es fixen sobre elles, sobre elles desenrotllen llurs energies en sèrie fins al grau de simplificació necessari perquè els canvis siguin possibles. Si l'atzar vol que aquestes substàncies formin part integrant

d'aquests cossos que nosaltres anomenem *bactèries*, són atacades de la mateixa manera que si no n'haguessin de formar part; d'on resulta que els *ferments bacteriolítics*, en el sentit estricte del mot, són una pura ficció, si és veritat que no n'existeixen que ataquin les bactèries, sinó únicament les substàncies químiques que les componen. Naturalment, l'organisme no es defensa pas realment contra les bactèries, com es creu : es defensa contra la matèria estranya que li és aportada juntament amb elles per procediments en el fons idèntics, encara que el mecanisme en sigui més complexe, als que empra en front de la sacarosa o del midó que hom injecta : la invertasa o l'amilasa, gràcies a les quals ataca aquests productes, són de la mateixa naturalesa que el conjunt de les reaccions, per les quals ataca els que componen el bloc bacterià. És només així que l'organisme pot utilitzar la matèria alimentosa que rep, i és així com es constitueixen les reaccions pròpies de la immunitat adquirida. Gràcies a elles s'oposa amb més d'energia a les agressions de l'antigen i veu augmentar les propietats digestives que damunt d'ell hi havia. La immunitat natural esdevé així la condició que deu precedir la creació possible de la immunitat adquirida. Una bactèria que no pot ésser atacada pels ferments del mitjà intern és una bactèria contra la qual l'organisme no té defensa; i, si es difícilment digerida per ells, difícilment també ella vacunarà. Altrament si l'antigen és fàcilment digerible. Tot depèn, com es veu, d'una part, de les energies zimòtiques de les quals disposa l'organisme i, d'altra part, de la naturalesa química de l'antigen.

Considerades així, les defenses orgàniques són el resultat dels mecanismes fisiològics que endeguen la matèria bacteriana per la seva anabòlia (immunitat natural) i donen lloc consecutivament a la formació dels

anticossos immunitzants (immunitat adquirida). Considerant-los com el producte de *ferments bacteriolítics especials*, hom suposa que l'organisme n'ha estat dotat amb la *finalitat* i la *intenció* de poder sostenir lluita contra l'accés de gèrmens o contra llurs productes solubles : en aquest cas es va a parar a una concepció antropomòrfica de les defenses.

Tenim necessitat d'aclarir i definir el concepte del ferment bacteriolític, i és per això que havem procedit a la seva revisió. Per a molts aquestes explicacions seran sobreres. El fet d'estudiar l'acció, per exemple, de la tripsina sobre certes bactèries mostra que no es preocupen dels *ferments especials*. Aquesta preocupació és, per tant, molt generalitzada. Jo poguí convèncer-me personalment que, en els extrems cel·lulars que havem estudiat en la primera part d'aquest treball, demés de l'existència de ferments amilolítics, proteolítics, etc., hom reconeix la de ferments bacteriolítics quan els assaja damunt les bactèries, per mal de la pressió d'un prejudici tradicional. No hi ha dubte, l'estudi de la bacteriolisi «in vitro» o «in vivo» sota l'acció dels ferments que la determinen ofereix un molt gran interès pràctic. Estudiats des d'aquest punt de vista, no hi ha inconvenient a enfocar-los com a bacteriolítics, amb la condició de remarcar sempre que ataquen la matèria bacteriana, perquè és matèria alimentosa : altrament, fóra precís considerar-los com una funció a part de la digestió general d'aquesta matèria. És aquesta la raó que ens ha empès a fer la revisió d'una concepció tan vaga, actualment, i tan obscura.

Laboratori Municipal de Barcelona

BIBLIOGRAFIA

- I. R. TURRÓ, «Zur Bakterienverdauung» (*Centralblatt für Bakteriologie*, 1900, p. 173; 1902, n.º 2). — «Ursprung und Beschaffenheit der Alexine» (*Berliner Klinische Wochenschrift*, 1904, n.º 38). — «Beiträge zum Studium der natürlichen Immunität» (*Centralblatt für Bakteriologie*, 1904, n.º 1). — R. TURRÓ et A. PI SUÑER, «Der Mechanismus der natürlichen Immunität auf physiologischer Grundlage» (*Deutsch. Aerzte Zeitung*, 1.^r de novembre de 1905). — R. TURRÓ et A. PI SUÑER, «Sur les propriétés bactériologiques de tissus» (XVI^e Congrès Internationale de Médecine. Budapest, 1909). — R. TURRÓ et A. PI SUÑER, «Les bacteriolysines naturelles» (Congrès de Saragosse). — «Sur l'origine tissulaire des bactériolysines» (V^e Congrès de Physiologie. Heidelberg, 1912). — «Les bactériolysines naturelles» (Société de Biologie. Paris, 6 de juny de 1908). — G. PITTALUGA, «Poteri di digestione batterica nei liquidi e tessuti organici» (*Policlinico*, Roma, set. prat. 1903). — R. TURRÓ et A. PI SUÑER, «Mécanisme physiologique de l'immunité naturelle» (*Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1905, p. 60).