

RECERQUES SOBRE UN ESTAFILOCOC RESISTENT AL BACTERIÒFAG

per

F. DURAN-REYNALS

Durant recerques sobre la resistència adquirida a la bacteriofàgia (V. E. Wollmann, *Annales de l'Inst. Past.*, 883; 1927), ens hem trobat en presència de fets aparentment contradictoris. En estudiar la fixació i la reproducció dels bacteriòfags per un estafilococ esdevingut resistent al principi lític, s'observava o la *indiferència* completa d'aquest germen, que es traduïa per la no fixació i la no reproducció dels bacteriòfags, o una fixació i una reproducció més o menys intensa d'aquests.

Són les experiències fetes per a investigar les raons d'aquestes irregularitats que constitueixen el punt de partida del treball actual.

Les nostres recerques s'han fet amb un estafilococ blanc molt sensible al corresponent bacteriòfag. Un i altre han estat posats amablement a la nostra disposició per Twort.

Durant tot el temps de les nostres investigacions (gairebé un any), no hem constatat mai la més petita manifestació d'un poder lisogen espontani en els nostres cultius; per altra banda, l'acció del bacteriòfag es traduïa sempre en una lisi completa amb absència de tot cultiu

secundari, quan el principi lític s'havia emprat a dosi suficient (generalment una gota per 10 cc.).

A partir d'aquest cultiu normal d'estafilococ hem aconseguit obtenir una raça resistent, semblant, sobre gelosa inclinada suspensions d'estafilococ addicionades de bacteriòfag i repicant les colònies que es desenvolupaven en la part superior del medi.

Les primeres colònies resistents així obtingudes s'han sembrat en gelosa ordinària. Aquestes colònies i els cultius derivats s'han numerat d'1 A a 5 A. Aquests cultius presentaven tots un aspecte idèntic al de la raça sensible primitiva i solament se'n distingien pel fet d'ésser un xic més magres.

És amb aquests cultius que hem fet les nostres primeres experiències. Aquestes tenien com a finalitat estudiar en el nostre estafilococ resistent, la pèrdua d'afinitat per al bacteriòfag (Meisner) i la ineptitud del bacteriòfag a reproduir-se (Bail, Jaumain), fets observats en altres bactèries resistents.

Reproduïm algunes de les experiències en relació amb la primera de les dues finalitats.

Experiment 1

Es preparen dos tubs que contenen, el primer, una suspensió — uns 2,000 milions per centímetre cúbic aproximadament — d'estafilococ sensible; el segon i el tercer suspensions de races resistents 2 A i 4 A. S'introdueix en cada tub una gota d'una dilució de bacteriòfag antiestafilocòcic 1 per 200. Passats vint minuts de contacte es centrifuga. S'agafa una gota de líquid sobrenedant de cada un dels tres tubs i s'introdueix, sense diluir i diluint, en tres tubs sembrats amb l'estafilococ sensible.

Resultats

Líquid sobrenedant d'estafilococ sensible:

Pur.....	Lisi parcial
1 per 40.....	No hi ha lisi
1 per 200.....	No hi ha lisi

Líquid sobrenedant d'estafilococ, col·lecció 2 A:

Pur.....	Cultiu
1 per 40.....	Lisi completa
1 per 200.....	Lisi completa

Líquid sobrenedant d'estafilococ, col·lecció 4 A:

Pur.....	Cultiu
1 per 40.....	Lisi completa
1 per 200.....	Lisi completa

Així, doncs, és ben clar que hi ha hagut fixació completa amb les dilucions d'1 per 40 i 1 per 200 en el cas de l'estafilococ sensible, i que no hi ha hagut fixació amb els estafilococs resistents. En aquests dos darrers, amb el líquid sobrenedant pur, hi ha hagut cultiu, molt probablement degut a la presència en aquest d'uns rars gèrmens resistents no sedimentats.

Experiment 2

Feta amb races resistents 2 A i 5 A amb la mateixa tècnica que en l'experiment precedent:

Resultats

Líquid sobrenedant d'estafilococ sensible:

Pur.....	No hi ha lisi
1 per 40.....	No hi ha lisi
1 per 200.....	No hi ha lisi

Líquid sobrenedant d'estafilococ 2 A:

Pur.....	Lisi parcial
1 per 40.....	Lisi total
1 per 200.....	No hi ha lisi

Líquid sobrenedant d'estafilococ 4 A:

Pur.....	Lisi total
1 per 40.....	No hi ha lisi
1 per 200.....	No hi ha lisi

Líquid sobrenedant d'estafilococ 5 A:

Pur.....	Lisi parcial
1 per 40.....	Lisi parcial
1 per 200.....	Lisi total

Experiments 3 i 4

En aquests experiments fets amb races 2 A, 3 A, 4 A i 5 A i que és inútil consignar d'una manera detallada, s'obtenen els mateixos resultats contradictoris: l'estafilococ resistent tan aviat fixa com tan aviat no fixa el bacteriòfag.

Heus ací, ara, alguns experiments en el referent a l'augment del títol lític.

Experiment 5

S'afegeix a 10 cc. de brou ordinari sembrat amb l'estafilococ 1 A, una gota de bacteriòfag diluït a l'1 per 200. Es deixa a 37° durant vint-i-quatre hores. Es filtra sobre bugia i es titula el filtrat fent dilucions fins a 10^{-10} , afegint tres gotes de cada dilució a tubs que contenen 1 cc. de brou sembrat amb estafilococ sensible. Com a control s'han fet les mateixes operacions amb l'estafilococ sensible addicionat de bacteriòfag i amb un tub de brou contenint solament el bacteriòfag.

Resultats

La raça 1 A creix en presència del bacteriòfag com un cultiu d'estafilococ normal en brou. *El títol lític no ha sofert cap augment.*

Experiment 6

Es fa amb races 1 A i 3 A amb la mateixa tècnica, però deixant a 37° durant quaranta-vuit hores.

Resultats

La raça 1 A no dona cultius en presència de bacteriòfag. *El títol ha assolit 10^{-10} , dilució límit com el control d'estafilococ sensible.* La raça 3 A ha donat un cultiu pobre al cap de vint-i-quatre hores i un cultiu gairebé normal a les quaranta-vuit. *El títol lític no ha sofert cap augment.*

Experiment 7

Fet amb races 1 A i 3 A, amb la mateixa tècnica, i deixant vint-i-quatre hores a 37°.

Resultats

La raça 1 *A* donà un cultiu gairebé normal. *El títol lític no presenta cap augment.* El tipus 3 *A* ha donat un cultiu pobre. *El títol lític ha assolit 10^{-10} , dilució límit, exactament com el control d'estafilococ sensible.*

Experiment 8

Fet amb tipus 1 *A* i 3 *A* deixant vint-i-quatre hores a 37°

Resultats

Les dues races han donat cultius normals. *El títol lític no ha presentat cap canvi.*¹

NOTA. — En tots aquests experiments, tant en els que tenen per objecte estudiar la producció del bacteriòfag per la bactèria resistent, com en els que tracten de la seva fixació, la sembra es feia sempre a partir d'un sol i mateix tub.

Davant d'aquests resultats, no coincidents, hem provat novament, diverses vegades, la resistència de les nostres races, fent preses en diferents punts d'un cultiu i sembrant-les en 10 cc. de brou amb dues gotes de bacteriòfag.

Experiment 9

	24 hores	48 hores
Raça 1 <i>A</i>	Lisi total	Lisi total
Raça 2 <i>A</i>	Lisi parcial	Lisi total
Raça 3 <i>A</i>	No hi ha lisi	Lisi total
Raça 4 <i>A</i>	Lisi parcial	Lisi total
Raça 5 <i>A</i>	No hi ha lisi	Lisi total

¹ Aquests experiments permeten de fer una altra constatació: en tots els casos en què el microbi ha estat veritablement resistent, el títol lític del tub que contenien el bacteriòfag sol i dels que contenien el bacteriòfag en presència d'una raça resistent, ha estat el mateix. No hi ha, doncs, producció ni destrucció del principi lític per les races resistents.

Experiment 10

	24 hores	48 hores
Raça 1 A.....	No hi ha lisi	No hi ha lisi
Raça 2 A.....	No hi ha lisi	Lisi total
Raça 3 A.....	No hi ha lisi	No hi ha lisi
Raça 4 A.....	Lisi parcial	Lisi total
Raça 5 A.....	No hi ha lisi	No hi ha lisi

Aquests resultats donen l'explicació de la no coincidència obtinguda en les experiències de fixació i de reproducció del principi lític. El cultiu considerat com a resistent conté elements sensibles al costat d'elements veritablement resistents : uns o altres dominen segons l'atzar dels repicatges, i d'això neixen els cultius resistents, parcialment sensibles o sensibles.

Per altra banda, ja havíem observat certs caràcters anormals en els cultius sobre gelosa fets a partir dels nostres primers cultius resistents; aquests cultius estaven sovint constituïts per colònies menys pigmentades, confluents, que prenien la forma de gotetes d'aigua sobre una superfície greixosa.

També eren clarament més pobres que els de la raça d'origen. Ens hem proposat separar els individus veritablement resistents dels gèrmens sensibles.

Experiment 11

Se sembra en gelosa ordinària en càpsula de Petri la raça 1 A, a fi d'obtenir colònies separades. Al cap de vint-i-quatre hores d'estufa, s'escolleixen deu d'aquestes colònies que es numeren d'1 B a 10 B.

Sobre la càpsula de Petri les quatre primeres colònies tenien un aspecte normal. Les sis darreres eren colònies planes, grises i amb una forta tendència a confluïr. Per llur forma, les anomenarem colònies en «massa». Es repiquen sobre gelosa inclinada a fi d'obtenir colònies separades.

Al cap de vint-i-quatre hores s'obtenen les colònies següents:
Colònia 1 B, tipus normal.

Colònia 2 *B*, tipus «en massa» pur.

Colònia 3 *B*, tipus «en massa» «foradat», constituït per colònies en anell, i presentant al centre la gelosa nua.

Colònia 4 *B*, tipus «mucós», constituït per colònies més voluminoses que les altres, menys pigmentades, d'un aspecte glevós i que s'estira formant filament quan s'agafa amb un fil de platí.

Colònia 5 *B*, tipus foradat pur.

Colònia 6 *B*, tipus foradat pur.

Colònia 7 *B*, tipus normal.

Colònia 8 *B*, tipus «en massa» pur.

Colònia 9 *B*, tipus «en massa» pur.

Colònia 10 *B*, tipus normal.

Totes aquestes varietats sembrades en el brou ordinari donaren a les vint-i-quatre hores cultius d'opacitat igual a la de l'estafilococ sensible sembrat en les mateixes condicions. Però la varietat mucosa 4 *B* donà un cultiu molt tèrbol, espès i filant, sobretot en les capes superiors que cauen per agitació.

El cultiu primitiu resistent es descomposat així en diferents varietats. S'havia d'estudiar la resistència d'aquestes al bacteriòfag, tant des del punt de vista de la lisi total com de la lisi tardana (*Gratia* i *Rhodes*, Duran-Reynals, Broufenbrenner i Muckenfuss). A més, tenint en compte l'aclariment espontani freqüent dels cultius, hem estudiat l'estabilitat dels cultius de les diferents varietats en brou.

Experiment 12

Se sembren en tres tubs amb 10 cc. de brou, cada una de les 8 colònies i s'afegeixen dues gotes de bacteriòfag a un d'aquests 3 tubs. Es deixen a 37°, i passades vint-i-quatre hores s'estabilitza un dels dos cultius sense bacteriòfag per escalfament a 100° i addició d'algunes gotes de formol: aquest cultiu servirà de control.

Resultats

Al cap de vint-i-quatre hores cap dels cultius no s'ha aclarit: Al cap de set i catorze dies, l'aspecte dels tubs era el següent.

	Set dies	Catorze dies
Raça 1 <i>B</i> , bacteriòfag.....	Lisi parcial	Lisi parcial
Raça 1 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	Lisi parcial	Lisi parcial
Raça 2 <i>B</i> , bacteriòfag.....	Lisi marcada	Lisi marcada
Raça 2 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	No hi ha lisi	No hi ha lisi
Raça 3 <i>B</i> , bacteriòfag.....	Lisi total	Lisi marcada
Raça 3 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	Lisi parcial	Lisi marcada
Raça 4 <i>B</i> , bacteriòfag.....	No hi ha lisi	No hi ha lisi
Raça 4 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	No hi ha lisi	No hi ha lisi
Raça 5 <i>B</i> , bacteriòfag.....	Lisi molt lleugera	No hi ha lisi
Raça 5 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	Lisi molt lleugera	No hi ha lisi
Raça 6 <i>B</i> , bacteriòfag.....	Lisi molt lleugera	Lisi total
Raça 6 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	Lisi molt lleugera	Lisi parcial
Raça 7 <i>B</i> , bacteriòfag.....	Lisi marcada	Lisi total
Raça 7 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	Lisi molt lleugera	No hi ha lisi
Raça 8 <i>B</i> , bacteriòfag.....	Lisi marcada	Lisi marcada
Raça 8 <i>B</i> , sense bacteriòfag.	Lisi parcial	No hi ha lisi

Es veu que de vuit colònies, sis han donat cultius sensibles al bacteriòfag (lisi tardana). De les dues restants, una (5 *B*) és molt lleugerament sensible, i l'altra (4 *B*) completament resistent. Aquestes vuit colònies han donat, per altra banda, cinc cultius que s'han aclarit espontàniament d'una manera més o menys accentuada, però ben clara en relació al control estabilitzat; una altra (5 *B*) s'ha lisi tan sols lleugerament. *Una sola varietat (4 B), que presentava el caràcter mucós, ha estat absolutament resistent, tant a la lisi espontània com a la del bacteriòfag.*

Les races que han sofert l'acció del bacteriòfag i han adquirit una resistència més o menys marcada, presenten una modificació des del punt de vista dels caràcters de les colònies, així com una labilitat dels cultius en brou (tendència a l'autolisi) que les distingeix de la forma sensible originària. Aquests dos fenòmens havien estat també assenyalats per Gratia i Jaumain i es presenten sense cap acció lisògena.

Abans de continuar aquestes recerques, mirem com la varietat 4 *B*, totalment resistent a l'autolisi i a la lisi pel bacteriòfag, es comporta des del punt de vista de la fixació i de la producció del bacteriòfag.

Experiment 13

Es preparen dos tubs que contenen, el primer, una suspensió (aproximadament uns 2,000 milions per centímetre cúbic) d'estafilococ sensible, i el segon, una suspensió de la mateixa concentració d'estafilococ resistent mucós 4 B. S'introdueix en cada tub una gota de dilució de bacteriòfag antiestafilocòcic a l'1 per 200.

Després de vint minuts de contacte, es centrifuga. S'agafa una gota del líquid que sobreneda en cada un dels dos tubs i s'introdueix, sense diluir i després de diluir, en tres tubs sembrats amb l'estafilococ sensible.

Resultats

Líquid sobrenedant d'estafilococ sensible:

Pur.....	No hi ha lisi
1 per 40.....	No hi ha lisi
1 per 200.....	No hi ha lisi

Líquid sobrenedant d'estafilococ 4 B mucós:

Pur.....	Lisi total
1 per 40.....	Lisi total
1 per 200.....	Lisi total

L'experiència es repeteix amb el mateix resultat.

Experiment 14

Es posen dues gotes de bacteriòfag en 10 cc. de brou sembrats amb estafilococ mucós 4 B. Es fan, durant quatre dies, passos diaris a brou ordinari. El cinquè dia, es filtra el brou dels quatre tubs i s'investiga el poder lític.

Resultats

Primer tub.....	Lisi total
Tres últims tubs.....	No hi ha lisi

Es repeteix l'experiment, però escalfant a 50° en lloc de filtrar sobre bugia.

Resultats

Cap lisi.

Aquests experiments demostren d'una manera decisiva que, en presència d'estafilococ totalment resistent, no hi ha fixació ni reproducció del bacteriòfag.

AUTOLISI DE L'ESTAFILOCOC RESISTENT

Autolisi en tub obert. — Ja hem vist que els cultius en brou obtinguts a partir de colònies d'estafilococ esdevingut resistent al bacteriòfag, poden presentar un aclariment espontani (autolisi) en tub obert. Sense que sigui un fenomen constant, l'hem observat diverses vegades, en un grau més o menys accentuat, en el decurs de les nostres recerques.

La variabilitat dels caràcters que presenten els individus d'un mateix cultiu, ens indica la inconstància dels resultats : inconstància que contrasta amb la perfecta estabilitat dels cultius de la raça sensible d'origen.

Autolisi en tub tancat. — Totes les nostres varietats resistents es lisen en l'atmosfera confinada que es crea en tancar a la flama els cultius de brou de vint-i-quatre hores i àdhuc més vells, lisi tan ràpida, almenys com la de les races normals (Jaumain).

Lisi tardana pel bacteriòfag. — Hem descrit anteriorment experiències d'aquesta classe. El fenomen fou observat primerament per Gratia i Rhodes. Heus ací un exemple demostratiu.

Experiment 15

Se sembren els estafilococs 1 B i 8 B en quatre tubs que contenen cada un 2 cc. de brou. S'afegeix a dos tubs de cada sèrie, una gota de bacteriòfag, i queden els dos altres com a controls. És manté tot a 37°.

	Vint-i-quatre hores	Cinc dies	Sis dies	Vuit dies
Tipus 1 B.	No hi ha lisi	Lisi parcial	Lisi parcial	Lisi total
Tipus 8 B.	No hi ha lisi	No hi ha lisi	Lisi total	Lisi total

La lisi tardana de l'estafilococ demostra l'existència en la suspensió d'un cert nombre d'individus sensibles. Se sap, efectivament, que n'hi ha prou en iniciar el fenomen de la lisi pel bacteriòfag o per un altre mecanisme qualsevol, perquè el fenomen es continuï fins a l'acabament (Gratia i Rodhes, *C. R. Soc. Biol.*, 90, 640, 1924; Duran-Reynals, *C. R. Soc. Biol.*, 94, 242, 1926), però sense que hi hagi un augment del títol lític.

Experiment 16

Es posen dues gotes de bacteriòfag en 10 cc. de brou sembrat amb la varietat 6 B, dotada d'una resistència parcial al bacteriòfag. Es fa el mateix amb el tub control que no conté més que 10 cc. de brou. Es fan passos diaris, durant quatre dies, a brou ordinari. El cinquè dia es filtra el brou dels quatre tubs i es titula el poder lític.

Resultats

Estafilococ tipus 6 B:

Primer, segon i tercer tub.....	Lisi total
Quart tub.....	No hi ha lisi

Controls, bacteriòfag sol:

Primer tub.....	Lisi total
Segon, tercer i quart tub.....	No hi ha lisi

El bacteriòfag ha pogut multiplicar-se en presència de l'estafilococ, encara que no hi hagi hagut lisi visible immediata; aquesta multiplicació s'ha realitzat solament per un nombre limitat de bactèries sensibles, ja que a partir del quart pas el bacteriòfag ha estat eliminat.

Poder lisogen. — La tendència a l'autolisi dels cultius en brou podia fer sospitar una acció lisògena en les nostres races resistents. Hem mirat de trobar-la en els filtrats dels cultius vells, d'aspecte normal, així com en els filtrats dels cultius aclarits en atmosfera confinada. *Mai, cap de les nostres races no presentà el més petit poder lisogen.*

El fenomen de la lisa espontània no té la més petita relació amb la bacteriofàgia.

Hem portat més lluny l'anàlisi de les races resistentes, partint, aquesta vegada, del tipus mucós 4 B.

Experiment 17

Se sotmet la varietat mucosa 4 B a un aïllament en càpsula de Petri. Al cap de vint-i-quatre hores s'obtenen els següents tipus de colònies:

1. Grans colònies mucoses, glevoses i filants i menys pigmentades que les colònies normals (col. muc.).
2. Colònies més petites amb depressió o cavitat central, també filants, però menys que les precedents (col. foradades).
3. Colònies petites d'apariència normal, poc o gens glevoses i d'un blanc intens (col. nor.).
4. Colònies molt petites, no viscoses (col. Pt.).

Se sembla en tres tubs de brou dues colònies de cada tipus, i s'afegeix bacteriofag a un dels tubs. Al cap de vint-i-quatre hores a 37°, s'estabilitza per escalfament i algunes gotes de formol, un dels dos cultius restants. L'altre es queda com està.

Resultats

Les colònies mucoses són totalment resistentes a l'acció lítica del bacteriofag, tant a la immediata com a la tardana, així com a l'autolisi espontània en tub obert.

Dels sis tubs sembrats amb les colònies foradades, solament tres han crescut, donant un cultiu feble i tardà. S'ha repetit la prova amb el mateix resultat.

Els sis tubs sembrats amb les colònies Pt, no han donat cultiu.

El tipus mucós de l'estafilococ s'ha descompost en una sèrie de subtipus, en els quals pot observar-se una tendència accentuada a l'autolisi en medi líquid i una absència de resistència a la lisa tardana per bacteriofag. Altres colònies reproduïxen els caràcters que hem constatat en el tipus mucós : resistència total al bacteriofag, així com a l'autolisi espontània en tub obert.

Hom podia demanar-se si aquesta descomposició de la varietat mucosa resistent en subtipus més làbils es produïa amb certa regularitat.

Experiment 17 bis

Se sotmet una de les colònies mucoses obtingudes en l'experiment precedent a l'aïllament en càpsula de Petri. S'obté un cultiu pur de colònies mucoses totalment resistentes. Es replica una d'aquestes colònies i se li fan sofrir vuit passos sobre gelosa ordinària. S'obtenen solament cultius mucosos purs.

Sembla que en aquesta experiència s'ha arribat a una descendència pura d'individus de tipus mucós, la resistència dels quals al bacteriòfag és absoluta.

Experiments 18, 19 i 20

En aquests tres experiments d'aïllament a partir de tres colònies mucoses que no detallem, s'ha obtingut un cultiu pur de colònies foradades en la primera, en la segona una barreja de grosses colònies mucoses i de petites colònies de caràcter mucós poc accentuat, però que donaven cultius mucosos al repicatge. En un tercer experiment, per fi, s'ha reproduït el tipus mucós pur.

Hem refet una sèrie d'aïllaments consecutius, però partint d'una altra varietat que la 1 A, punt de partida de les experiències que s'han descrit. S'ha escollit la varietat 6 A després d'haver-li fet sofrir alguns passos per brou.

Diem solament que s'ha pogut retrobar a les vint-i-quatre hores tota la gama de colònies ja descrites : *colònies foradades*, *colònies aparentment normals*, *colònies molt petites* i, per últim, *colònies mucoses*.

Les proves de lisi pel bacteriòfag, així com les d'autolisi espontània en tub obert confirmen el que hem trobat en les experiències anteriors. Entre les formes resistents al bacteriòfag, el tipus mucós sol resisteix tan bé al bacteriòfag com a l'autolisi en tub obert.

CARÀCTERS DE L'ESTAFILOCOC MUCÓS

Aspecte microscòpic. — En els frotis colorejats, no es diferencia en res de l'estafilococ normal, però en les preparacions en gota penjant, se'l veu voltat d'una càpsula espessa més acusada en certs individus.

Propietats fermentatives. — No es diferencia en res

de la forma sensible d'origen, ni per l'acció sobre la gelatina, ni per l'acció sobre els glúcids.

Aglutinabilitat. — S'aglutina solament a 1 per 400 per un sèrum antiestafilocòcic preparat amb la forma sensible i el títol del qual és 1 per 200.

Fent passos diaris en el brou que conté cinc gotes d'aquest sèrum antiestafilocòcic amb l'estafilococ mucós i amb l'estafilococ tipus 6 A, es veu aquest créixer en la seva aglutinabilitat en tots els passos, mentre que la varietat resistent mucosa acaba per créixer-hi sense ésser aglutinat.

Creixença en els medis desfavorables. — L'estafilococ mucós creix més malament en els medis àcids (àcid acètic) o alcalins (sosa), que l'estafilococ sensible.

Experiment 21

Se sembla l'estafilococ mucós i sensible en els tubs de brou que contenen una o dues gotes d'àcid acètic per 10 cc. de líquid. És deixa a 37°.

Resultats

L'estafilococ sensible creix bé en els dos tubs. L'estafilococ mucós creix en el tub que conté una gota, però no en el tub que conté dues gotes d'àcid acètic.

Experiment 22

Se sembren els estafilococs mucosos sensibles en tubs que contenen 2 i 3 cgr. i també, si bé tardanament, en el tub que conté 4 cgr. de sosa. L'estafilococ mucós creix en un medi que conté 2 cgr. d'alcalí, però ja no ho fa en els tubs amb 3 cgr.

Experiment 23

Virulència. — S'inocula sota la pell de dos conills, 2 cc. de cultiu en brou de vint-i-quatre hores d'estafilococ mucós resistent i d'estafilococ normal sensible.

Resultats

El primer ha produït un enduriment més dolorós, més persistent i més marcat que el segon.

Persistència del tipus mucós. — Com ja ho hem dit, s'ha pogut repicar una descendència mucosa sobre gelosa, així com en brou, vuit vegades seguides sense obtenir altres colònies que les del tipus mucós : aquesta descendència pot considerar-se com pura. Hem buscat l'efecte sobre aquesta raça del pas en brou alcalí (2 cgr. de sosa en 10 cc.) o d'àcid (una gota per 10 cc.).

Experiments 24 i 25

En els dos casos, a partir del tercer o quart pas, s'obté, en mitjà líquid, un cultiu sense rastre de mucus, però els cultius típics mucosos apareixen de seguida que es transporta la bactèria el medi corrent.

ACCIÓ DE L'ANAEROBIOSI

Experiment 26

Es cultiva l'estafilococ mucós, així com el tipus normal sensible, en anaerobiosi obtinguda pel pirogalat de sosa (tub Legros).

S'observa durant els dos primers dies un creixement inicial de la mateixa intensitat i del mateix caràcter en les dues races; després els cultius comencen a aclarir-se per acabar en una lisi total.

Se sap que queden sempre gèrmens vius en els lisats en atmosfera confinada; si se sembra sobre gelosa solament s'obtenen colònies mucoses.

L'acció dels àcids o dels alcalís, la de l'anaerobiosi no fan més que suspendre d'una manera passatgera la producció de mucus. El tipus mucós reapareix de seguida que es transporta el microbi als medis corrents.

Ens hem preguntat si la supressió del poder mucigen del nostre estafilococ faria reaparèixer la sensibilitat al bacteriòfag. Per veure-ho hem sotmès les races mucoses a agitació (dues, quatre hores) en solució fisiològica addicionada d'àcid acètic i a passos per brou addicionat de sèrum antiestafilocòcic.

En un d'aquests experiments, després de dues hores d'agitació i centrifugació, el líquid sobrenedant havia donat un cultiu pur de colònies *no mucoses* i aquestes han estat perfectament sensibles al bacteriòfag. El centrifugat ha donat un cultiu mucós resistent. Aquest experiment fou repetit tres vegades sense que s'hagi pogut obtenir, tant en el líquid sobrenedant com en el filtrat, altres individus que els mucosos resistents.

RESUM

Com ja se sabia per als bacils del grup coli, disenteric (Bordet, Gratia, Arkwright, d'Hérelle) i com ja s'havia assenyalat per al mateix estafilococ per Gratia i Jaumain, aquest germen, sota l'acció del bacteriòfag, pot adquirir nous caràcters, sobretot des del punt de vista de propietats antigèniques i de la virulència, així com de l'aspecte de les colònies : pigmentació, forma i dimensions de les colònies. Les races, esdevingudes més o menys fortament resistents al bacteriòfag, adquireixen, per altra banda, una labilitat particular que es manifesta per una tendència marcada a l'autolisi en medi líquid.

Hem pogut descompondre aquestes races resistents i les hem pogut classificar en dos grups. El primer grup agafa diferents tipus la resistència dels quals al bacteriòfag és més o menys inestable : tan aviat es lisen immediatament, tan aviat només d'una manera més o menys tardana. La majoria d'aquestes races presenten una tendència a l'autolisi espontània en tub obert, de la qual hem parlat. Les colònies presenten un aspecte variable; colònies «en massa», molt petites. Moltes, en començar, tenen un tipus més o menys mucós. Amb aquests cultius, tan aviat hi ha fixació i reproducció dels bacteriòfags més o menys accentuats, tan aviat no hi ha ni reabsorció ni reproducció del principi lític.

Cada un dels tipus d'aquest grup pot donar naixement a d'altres, així com a individus del segon grup, o sigui el tipus mucós pur.

Aquest estafilococ mucós presenta una resistència absoluta al bacteriòfag i a l'autolisi espontània en tub obert, no fixa el principi lític i no en permet la reproducció. Aquest tipus presenta generalment una gran estabilitat; tanmateix, de vegades es veu, per repicatge, néixer, de colònies mucoses pures, colònies pertanyents als tipus del primer grup.

Els estafilococs no mucosos poden presentar una resistència marcada, àdhuc total, més o menys constant a la bacteriòfagia. Aquesta resistència va sovint acompanyada d'una tendència exagerada a l'autolisi (aclariement de suspensions en tubs oberts) (Wellman i Duran-Reynals, *C. R. Soc. Biol.*, 94, 1336, 1926). El tipus mucós es presenta absolutament resistent tant a la bacteriòfagia com a l'autolisi en tub obert. *Conserva, com l'estafilococ normal sensible i com els estafilococs no mucosos, esdevinguts resistents al bacteriòfag, la propietat d'autolitzar-se en tubs tancats. Sempre que en aquest tipus falta la producció de mucus, es veu reaparèixer, d'una manera més o menys marcada, la sensibilitat a la bacteriòfagia.*

El principi lític no podia ja demostrar-se en els nostres cultius resistents. No és pas menys veritat que és sota la seva influència que la bactèria ha presentat les diferents anomalies i que ha adquirit la seva extraordinària variabilitat.

Aquests fets, s'expliquen per la sola selecció? És a dir, els individus de tipus aberrants, inestables i resistents, preexisteixen en tots els cultius d'estafilococ, i solament apareixen després que la bacteriòfagia ha alliberat el medi dels individus normals?

Realment, els canvis que un cultiu presenta espontàniament a través del temps per un fenomen de «dissociació activa», són ben semblants als que presenta sota la influència del bacteriòfag «dissociació passiva».¹ Altres causes encara, com l'acció dels antisèptics, dels antisèrums, de la inanició, de la temperatura, etc., poden provocar les mateixes variacions.² Bigger, Roland i O'Meara³ han estudiat recentment les formes anormals (mucoses en molts casos) de l'estafilococ des del punt de vista del color, de l'estructura i de la consistència de les colònies.

Hauria estat interessant saber si els tipus descrits pels autors irlandesos presenten la mateixa variabilitat i la mateixa tendència a l'autòlisi i sobretot la mateixa resistència al bacteriòfag.

Si l'origen bacterià del bacteriòfag esdevingués indubtable, podríem preguntar-nos fins a quin punt aquests tipus «anormals» que es troben en la majoria de cultius, no serien deguts a una activitat larvada dels bacteriòfags capaços de fer «evolucionar» certs tipus microbians i que esdevindrien, doncs, una mena d'agents actius de les «mutacions».

CONCLUSIONS

I. Els cultius d'estafilococs esdevinguts resistents al bacteriòfag i no lisògens, es descomposen en tipus molt nombrosos d'una gran variabilitat des del punt de

1. V. Philip. Hadley, Microbic dissociation. The instability of bacterial species, with special reference to active dissociation and transmissible autolysis. *Journ. of Infect. Diseases*, 40, 1927, 312.

2. Per exemple, recentment, L. Rosenbalt ha assenyalat com, en fer viure la bacterià carbuncosa en els filtrats de cultius vells, s'obtenien races asporògenes i mucoses. *C. R. Soc. Biol.*, 95, 1926, 445.

3. *The Journ. of Path. and Bact.*, 30, 1927, 261.

vista de la morfologia, de la pigmentació i de la consistència de les colònies; en molts casos, les colònies presenten un caràcter mucoide i els cultius en medi líquid tenen una forta tendència a l'autolisi espontània (aclariment en tub obert).

2. Els individus d'aquest grup fixen i reproduïxen el bacteriòfag amb més o menys intensitat, seguint la seva resistència més o menys accentuada al principi lític.

3. Per evolució d'alguns individus d'aquest grup, s'obté un tipus mucós estable, la resistència del qual al bacteriòfag o a l'autolisi en tub obert és absoluta, però que s'autolitza tan fàcilment com la raça originària sensible en tub tancat. Aquest tipus mucós pot, per altra banda, donar neixement a races pertanyents al primer grup.

4. Aquest tipus mucós no fixa ni reproduïx el bacteriòfag i està dotat de propietats noves que es descriuen.

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