

# ORIGEN I NATURALES DE LES DIASTASES BACTERIOLÍTIQUES

Ramon Turró

El treball que segueix va ser publicat al "Journal de physiologie et de pathologie générale" i la versió catalana aparegué a (ciència) per primera vegada el juny de 1926, en el número homenatge que aquesta revista li va dedicar l'any de la seva mort. Aquest treball és un exemple de la seva tasca com a investigador experimental en el camp de la microbiologia, del qual R. Turró ens ha llegat una àmplia bibliografia.

## I

### ORIGEN DE LES DIASTASES BACTERIOLÍTIQUES

En una sèrie de treballs publicats, en la seva majoria en els cinc primers anys d'aquest segle, jo he demostrat que les cèl·lules de tots els teixits forneixen, a l'estat soluble, diastases que ataquen les bactèries amb més o menys energia segons sigui el teixit del qual provenen i l'espècie atacada (1). Tot i que aquests treballs foren molt divulgats i d'un fàcil control, passaren gairebé del tot inadvertits. En efecte, es creia, llavors, com un article de fe, que únicament els polinuclears hemàtics eren capaços de proporcionar aquesta classe especial de diastases. És ben petit el nombre d'experimentadors que feren aquest control; entre ells, però, n'hi hagué un que en 1908 publicà els fets com si fossin una obra pròpia, sense obtenir, altrament, més èxit del que nosaltres havíem obtingut precedentment.

Per situar les noves recerques que hem emprès més recentment (1920) sobre aquest te-

ma i de les quals hem donat compte a la Societat de Biologia (1921) en quatre comunicacions successives, creiem interessant de resumir ací els nostres antics treballs.

Les glàndules tiroides de bou, moltó o porc, prèviament tallades i després premsades, donen un suc que, un cop filtrat, es conserva net i transparent a l'abric de l'aire i de la llum mitjançant l'addició de fluorur de sodi. Si a deu cc d'aquest suc, hom incorpora el rasclatge d'un cultiu recent de *B. anthracis* a la temperatura de 40° sobre gelosa, s'observa, al cap de 24 hores, que una gran part de les masses de bacils es troben en ple període de fusió i que al cap de dos dies han desaparegut gairebé del tot, deixant un residu amorfe, de color gris i de consistència mucilaginosa, que precipita al fons del tub i es dissol en les solucions febles de sosa o de potassa. Els bacils del filament no són atacats simultàniament. Tractant les preparacions pel·l metode de GRAM s'observa que mentre els uns són decolorits per l'alcohol, els altres conserven, encara, llur coloració; en una fase més avançada del procés hom arriba, solament, a tenyir algunes granulacions. La fusió comença a produir-se per punts isolats de vacuolització, que s'exemplen progressivament fins a reunir-se i convertir el filament en una ombra del què era. Quan el suc tiroidià no filtra i quan és molt espès o bé quan és escalfat a 50° durant deu minuts, la seva difusibilitat sembla disminuir; ja no penetra el bloc bacterià, del què ataca solament la superfície de contacte, sobre la qual es constitueixen embolcalls transparents, de dimensions diverses i de vegades desproporcionades, que resisteixen els colorants. Fent evaporar lentament a l'estufa l'aigua que aquests embolcalls contenen, fixant i colorant la preparació, hom remarca que els bacils són més prims.

Ultra el *B. anthracis* el suc tiroidià ataca altres nombroses espècies bacterianes. Sobre el vibrió del còlera exerceix una acció més ràpida que la que s'obté pel fenomen dit de PFEIFFER. N'hi ha prou amb fer

(1) R. TURRÓ, Zur Bakterienverdauung (*Centralblatt für Bakteriologie*, 1900, p. 173; 1902, núm. 2). - Ursprung und Beschaffenheit der Alexine (*Berliner klinische Wochenschrift*, 1904, núm. 38). - Beiträge zum Studium der natürlichen Immunität (*Centralblatt für Bakteriologie*, 1904, núm. 1). - Der Mechanismus der natürlichen Immunität auf physiologischer Grundlage, R. TURRÓ i A. PI SUNYER (*Deutsch. Ärzte Zeitung*, 1 novembre de 1905). - Sur les propriétés bactériologiques des tissus, R. TURRÓ i A. PI SUNYER, XVI Congrès Internacional de Medicina, Budapest, 1909. - Les bactériolysines naturelles, R. TURRÓ i A. PI SUNYER, Congrès de Zaragoza. - Sur l'origine tissulaire des bactériolysines, V. Congrès de Fisiologia, 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, sez. prat. 1903). - Mécanisme physiologique de l'immunité naturelle, R. TURRÓ i A. PI SUNYER (*Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1905, p. 60).

filtrar entre el porta i el cobreobjecte una gota del suc esmentat per observar, a mida que es difon en el camp que s'examina, la immobilització instantània dels bacils, llur transformació esferoidal o globular i, poc després, llur fusió completa.

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

Els teixits que, com el teixit esplènic, hepàtic, renal, etc. no proporcionen suc en ésser premsats, són, per tal d'obtenir extractes actius, tractats de la forma següent: Se'ls talla en petits fragments (del ronyó hom n'utilitza solament la substància cortical), se'ls tritura al morter amb sorra fina fins a formar una pasta, s'afegeix tres o quatre vegades llur pes d'aigua saturada en fluorur de sodi; es decanta i es filtra el líquid de la maceració i es recull dins els meus tubs de conreus anaerobis (simple modificació del tub de BUCHNER)<sup>2</sup>. Hom disposa a la part superior d'aquests tubs, tres o quatre centímetres cúbics d'una solució concentrada d'àcid pirogàlic i una petita quantitat de potassa i es tapen amb un tap de cautxú. Si s'assaja la potència lítica de cada un d'aquests extractes sobre el *B. anthracis*, hom observa que dintre de certs límits aquesta potència és comparable a la dels suc de carn i de tiroide, i el mateix s'esdevé amb altres espècies bacterianes. El rasclatge provinent d'un tub d'agar sembrat del dia abans experimenta la dissolució en l'espai de 24 o 28 hores. Resten, per tant, alguns bacils, relativament poc nombrosos, que semblen refractaris a llur acció, puix que conserven llurs propietats tintorials i no experimenten, demés, cap deformació.

Adhuc ben triturats, els ganglis limfàtics no deixen diastases actives en l'aigua de maceració; però si en aquestes condicions anaeròbies són deixats dins l'estufa un mes aproximadament, l'aigua, sense perdre la seva transparència natural, es mostra activa en front del *B. anthracis*. La pulpa de substància nervosa no cedeix diastases a l'aigua de maceració, per prolongada que aquesta sigui.

En resum, en els nostres primers treballs, nosaltres hem pogut constatar, pels procediments esmentats, la presència de diastases que ataquen el *B. anthracis*, en els suc obtinguts per medi de la premsa (carn i cos tiroide) i en les maceracions de la substància cortical dels ronyons, del fetge, de la melsa, dels pulmons, dels ganglis limfàtics i del rasclatge de la mucosa intestinal. Com que és molt difícil realitzar asèpticament aquestes operacions, nosaltres hem assajat, per tal de fer-les fàcilment i pràcticament controlables, un gran nombre

d'antisèptics. Entre aquests, el que ens donà més bons resultats, fou el fluorur de sodi. En fi, cal no oblidar que les diastases obtingudes amb els nostres extractes cel·lulars són sensibles a l'acció de l'aire; d'ací que calgui conservar-les en medis exempts d'oxigen.

Molt temps després de la publicació d'aquests treballs, JOHLING demostrà que les propietats antitripsiques del sèrum, depenen de la quantitat d'àcids grassos no saturats i de sabons que el mateix sèrum conté. Tractant-la pel cloroform, observà que la tripsina recobra la seva activitat, com la recobren les leucoproteases que ataquen les bacteries. Si, d'altra banda, els àcids grassos de les bacteries són prèviament tractats pel cloroform es constata que aquestes bacteries són atacades més fàcilment pel sèrum.

El descobriment de JOHLING ens suggerí la idea que tractant els àcids grassos de les nostres maceracions cel·lulars de la mateixa manera que ell havia tractat els del sèrum, nosaltres augmentariem també llur potència bacteriolítica. Nosaltres hem practicat aquest assaig amb el suc de carn i hem pogut observar que l'addició de cloroform l'enterbolia i determinava precipitacions que anul·len o disminueixen l'acció dels seus ferments sobre el *B. anthracis*. Hem repetit l'assaig amb altres maceracions, arribant a resultats idèntics. Descoratjats per aquest fracàs, hem emprès un camí diferent per tal de demostrar per a les nostres maceracions la mateixa tesi que JOHLING havia demostrat referint-se al sèrum. Veus ací el procediment adoptat com al més pràctic i demostratiu:

L'òrgan recentment extret de l'animal (fetge, melsa, pulmó, etc.), és triturat al morter i deshidratat per l'acetona; es filtra, es desseca en el buit i es pulveritza finament. 1 gr de pols és incorporat a 20 cc d'aigua salada a 1:100 amb 40 a 50 gotes de cloroform. Es remena fortament durant 15 minuts i es transporta a l'estufa, on es manté a 40° durant dotze hores. Es repeteix la mateixa operació amb un altre tub sense cloroform, el qual tub serveix de tipus o testimoni. Després del temps esmentat es centrifuguen i decanten els dos tubs, o bé, senzillament, es filtren; del primer, hom n'obté un extracte net i transparent com l'aigua clara, molt actiu sobre el *B. anthracis* i les altres espècies; del segon, un líquid gairebé sempre inactiu. La liberació de les diastases cel·lulars sota l'acció del cloroform, sembla assolir el seu màxim al cap de dotze hores; assajant l'extracte d'hora en hora, hom pot remarcar com, un cop transcorregut aquest lapsus de temps, la seva potència bacteriolítica va minvant fins a desaparèixer del tot.

(2) Vegin-se els tractats de Bacteriologia de COURMONT, BESANÇON, WURTZ, etc.

Aquest és el procediment adoptat per obtenir els nostres extractes de ferments cel·lulars, els quals es mostren actius sobre un gran nombre d'espècies, tot i que nosaltres els assagem, preferentment, sobre el *B. anthracis*. L'activitat no és menys evident quan l'assaig és fet sobre un gran nombre de compostos químics; deixem, però, de banda aquest aspecte, per tal de no apartar-nos de l'objecte principal que perseguim en aquest treball: Establir una sola excepció per al glicogen, pel fet que la diastasa que l'hidrolitza és comuna a tots els teixits i és tan enèrgica dins l'extracte pancreàtic que liquida fàcilment l'engrut de midó i ataca el midó cru. Per tal de donar més unitat a aquest treball, ens abstenim d'assenyalar ací les nostres observacions sobre les altres substàncies.

### *Leucolisines*

L'activitat de les leucolisines obtingudes pel mètode de BUCHNER o les maceracions salines i pel mètode de GENGOU, que és, indubtablement, el que dona millors rendiments, és inferior a l'activitat que hem obtingut amb el pus o les secrecions pleurals o peritoneals.

Nosaltres provoquem un abscess al baix ventre dels gossos. Quan la fluctuació és manifesta, recollim el pus, el qual és rentat tres vegades seguides. Es deshidrata tot seguit amb acetona, es filtra i s'asseca en el buit; després es pulveritza. Un gram d'aquest pols és incorporat a 20 cc d'aigua salada amb 50 gotes o més de cloroform; es tapa, es remena fortament i es deixa a l'estufa durant dotze hores. Es centrifuga i es decanta, o bé es filtra, i s'assaja la potència amilolítica de l'extracte sobre el glicogen i la seva potència bacteriolítica sobre el *B. anthracis*.

*Acció amilolítica.*—1 cc de glicogen a 1 % més 1 cc d'extracte: hidròlisi completa al cap de 24 hores.

*Acció bacteriolítica.*—Per mesurar la potència bacteriolítica de l'extracte, nosaltres no ens servim pas de la numeració de les colònies. Aquest mètode és excel·lent per demostrar aquest poder; però no és just per mesurar-lo. Cal pesar els gèrmens que l'extracte digereix en una unitat de temps. GENGOU va tenir la mateixa idea per tal d'evaluar la potència del seu extracte. Nosaltres pesem el rasclatge d'un tub de gelosa molt nutritiu de calibre mitjà, la superfície inclinada del qual ha estat sembrada de *B. anthracis* 24 hores abans, per tal d'evitar la seva esporulació; ens dona 122 mil·lígrams.

244 mil·lígrams de conreu fresc, provinent de dos tubs, són diluïts en 20 cc d'aigua salada a la qual s'ha afegit 1 cc d'extracte. A 40°, la disminució dels

gèrmens en les preparacions és remarcable. al cap de sis hores; llur fusió és completa al cap de vuit; únicament alguns gèrmens molt comptats semblen resistir l'acció de les diastases. El líquid no s'enterboleix durant el període de la fusió dels gèrmens, els quals formen com un núvol que precipita lentament i són dissolts per la sosa. L'extracte sembla que penetri totalment el bloc bacilar i no forma mai, en la seva superfície, els embolcalls transparents de què hem fet esment en parlar de les maceracions d'alguns teixits. La fusió comença a manifestar-se per petites zones vacuolades que s'agrandeixen fins a la fusió del bloc; al començament d'aquesta vacuolització, el Gram continua essent positiu i perquè esdevingui negatiu cal que el bacil hagi arribat a un cert grau de desintegració, i encara és possible que sota l'acció de l'alcohol conservi el color en certes zones menys fluïdes.

Si després d'haver diluït els bacils en l'aigua salada se'ls fa bullir i tot seguit de refredament s'afegeix l'extracte, hom observa que les leucolisines no els ataquen; sembla que llur fixació sobre el bloc ha estat dificultada. Però si aquesta ebullició és perllongada durant trenta minuts i més encara, es facilita llur dissolució.

Les masses bacilars tractades prèviament per cloroform, seguint en aquest punt les indicacions de JOHLING, són dissoltes per les leucolisines en un promig de temps inferior a l'emprat en llur estat natural. Les espores madures no són atacades per elles, àdhuc després de sotmeses al mateix tractament. Quan en les unitats del filament comença l'esportulació, les leucolisines són sensibles a l'acció diastàsica; en una fase més avançada llur resistència és superior i quan són lliures esdevenen indemnes.

Les leucolisines de l'extracte són actives sobre un gran nombre d'espècies. Nosaltres hem observat llur efecte sobre l'*estafilococcus* i l'*estreptococcus*, sobre el *bacil tífic* i el *vibrió colèric*. Els grans dels primers perden el Gram molt més ràpidament que el *B. anthracis* i llur vacuolització és, també, més activa. Per avançada que sigui aquesta vacuolització, hom observa que sembrant-los sobre plaques es regeneren com si no fossin arribats a un període de dissolució completa; el mateix s'esdevé amb els bacils carbuncosos. Repetint pacientment l'experiència diverses vegades, s'arriba a la següent conclusió: n'hi ha prou amb què resti un sol fragment cel·lular, per poder retrobar la unitat morfològica. si se'l transporta a un medi apropiat.

Quant al *bacil tífic* i al *vibrió colèric*, s'observa que sota l'acció d'aquestes diastases i d'algunes altres, els flagells són atacats vivament, la qual cosa explica llur immobilitat instantània, i acaben per desaparèixer completament degut a la fluidificació progressiva de la substància bacilar, sense que els virus acusin la transformació globular que els hem vist

experimentar per l'acció del suc tiroidià. Es pot afirmar, d'aquesta darrera espècie, que és de les més sensibles a tots els extractes.

Els extractes obtinguts amb les secrecions pleurals o peritoneals, provocades pels procediments usuals, són més actius que els del pus.

#### *Extracció dels ferments de la carn*

Hom procedeix d'ídèntica faísó que per a les leucolisines.

La carn que ens ha donat millor resultat és la de

quals pot ésser calculada prudentment en un o dos milions. Aquests gèrmens ni doblant ni triplicant la quantitat d'extracte actiu, tampoc no es dissolen.

*Tub patró.*—S'afegeix a aquest tub una petita quantitat de fluorur de sodi. Es comprova també la seva acció bacteriolítica sobre el *B. anthracis*, però amb molta menys energia que en el cas precedent. Alguns bacils es presenten granuloses al cap de dotze hores o envoltats d'un embolcall transparent que esdevé més visible si es tenyeix de negre el fons de la preparació. La degeneració granulosa s'accentua una mica més al cap de 24 hores i després resta estacionària. L'acció favorable del cloroform devés l'alliberament de les diastases es fa evidentíssima

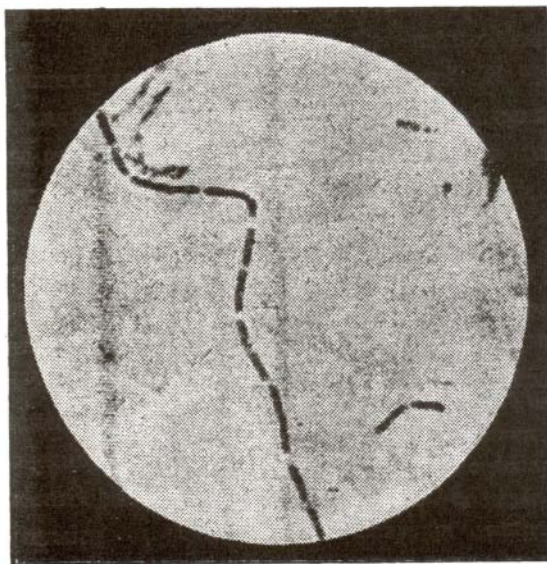


Fig. 1. *Bacillus anthracis*

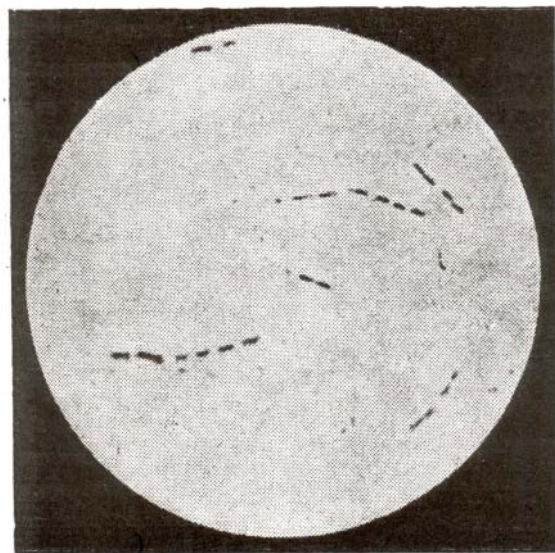


Fig. 2. Acció de l'extracte pancreàtic, al cap d'una hora

moltó sacrificat recentment. És tallada curosament, tractada per acetona, assecada i pulveritzada. Després d'haver tirat 1 gr d'aquest pols en 20 cc d'aigua salada i 50 gotes de cloroform, i 1 gr en un altre tub patró sense cloroform, es manté la totalitat, durant 12 hores, a 40°; després es centrifuga, decanta o filtra i s'assaja, simultàniament, llur acció amilolítica sobre el glicogen.

*Tub amb cloroform.*—1 cc de glicogen a 1 % i 1 cc d'extracte: hidròlisi total en menys de sis hores.

*Tub patró.*—Resultats idèntics al precedent.

*Acció bacteriolítica.*—A 1 cc d'extracte addicionat a 20 cc d'aigua salada es barreja el rasclatge de dos tubs d'agar sembrats del dia abans amb 244 mil·ligrams de *B. anthracis*. Al cap de sis hores, l'examen microscòpic demostra que els bacils han estat atacats de la mateixa forma precedentment manifestada per a les leucolisines i que un gran nombre d'ells han desaparegut completament. Al cap de 8 o 9 hores la dissolució és absoluta, llevat per a un cert nombre de gèrmens resistents, la proporció dels

per l'examen comparatiu dels efectes que determinen sobre les bacteries de l'un i de l'altra tub.

La carn de moltó dona ferments extractius quan se la tracta poc temps després d'haver estat sacrificant l'animal; en plena rigidesa cadavèrica els resultats són més incerts. El mateix s'esdevé amb les carns de bou, de vaca i de colom; la de gos no dona extracte actiu i la de conill molt difícilment. Nosaltres ignorem en quines condicions les carns cedeixen, dins l'aigua salada i sota l'acció del cloroform, la més gran quantitat de diastases; d'ací que calgui procedir empíricament respecte aquest punt.

#### *Extracció de ferments de la substància nerviosa*

En els nostres primers treballs, la maceració de la pulpa nerviosa en l'aigua salada no ens havia proporcionat resultats convincents, per

temps que aquella fos prolongada; però quan un gram de pols d'aquesta substància és macerat amb addició de cloroform, en les condicions ja esmentades, proporciona un extracte molt actiu. Els nostres assaigs han estat efectuats amb cervells de gossos.

*Acció amilolítica.*—1 cc d'extracte hidrolitza en menys de dues hores 0,01 de glicogen.

*Acció bacteriolítica.*—Aquesta és, en aquestes condicions, gairebé igual a la de l'extracte de carn. En l'espai de 8 a 9 hores, dissol el rasclatge de dos tubs sembrats de *B. anthracis*.

L'enorme quantitat de lipoides que conté la sub-

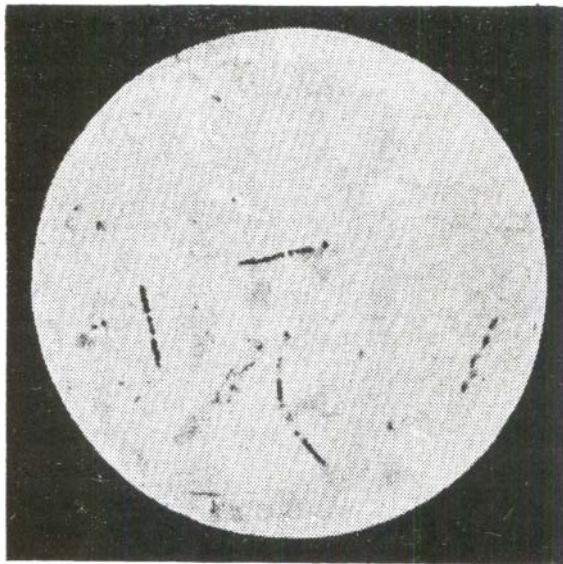


Fig. 3. Acció de l'extracte de pàncreas al cap de tres hores. Sols se ten uns poc filaments.

tància nerviosa ens ha induït a augmentar la dosi de cloroform fins a 40 i 50 per 100 i associar a la seva acció la de l'èter sulfúric. En dues sèries paral·leles de tubs preparats amb 1 gr de pols i 20 cc d'aigua salada, es nota la influència que aquesta associació exerceix sobre la riquesa diastàsica de l'extracte. Mentre que, amb els tubs que contenen 50 gotes de cloroform, s'obtenen els efectes esmentats, amb els que contenen 50 % de cloroform i 6 % d'èter, s'observa que l'acció bacteriolítica és més enèrgica. Al cap de dues hores, hom comprova que una gran quantitat de bacils han estat atacats i que les masses de conreu que no s'han diluït lliurement en l'aigua han estat dissoltes en bona part; llur dissolució és completa al cap de sis hores. El nombre de bacils resistents és molt inferior al que resta en l'extracte de carn. Aquests fenòmens s'accentuen encara més quan s'eliminen els principis greixosos que formen part de les substàncies nervioses.

La pulpa cerebral fresca de gos, addicionada de cloroform al 40 %, cedeix a l'aigua salada, dins de

la qual és en maceració a la temperatura de 40°, diastases la potència amilolítica i bacteriolítica de les quals és tan manifesta com en els extractes pulveritzats. Si a la maceració hom afegeix èter sulfúric al 4 %, l'acció d'aquestes diastases és reforçada, igual que en el cas precedent. Centrifugant la maceració de la pulpa fresca hom no obté pas un extracte líquid com en el cas de la maceració del pols, sinó un extracte d'aspecte gelatinós que precipita al cap de 24 hores.

#### *Extracció dels fermentes del pàncreas*

Amb el pols de la glàndula pancreàtica del

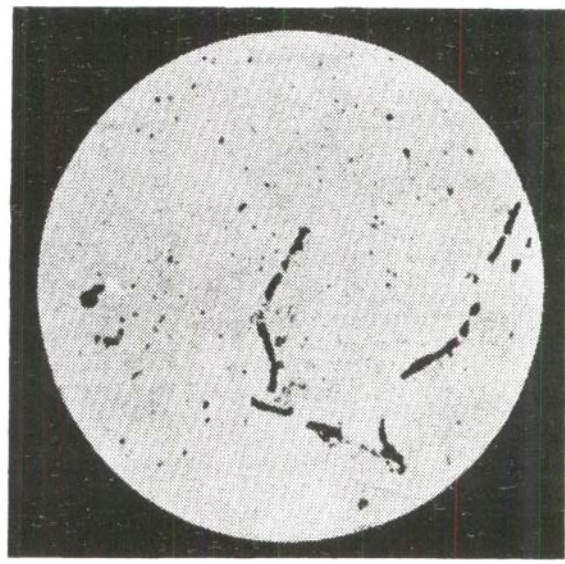


Fig. 4. Desintegració del *B. anthracis* després de sis hores d'acció de l'extracte de carn.

gos, del moltó o del bou, s'obté l'extracte més actiu de tots els que hem assajat.

1 cc hidrolitza gairebé instantàniament 20 cc de glicogen al 1 per cent, la mateixa quantitat d'engrut de midó en 15 minuts i de midó cru en 24 hores. El rasclatge de quatre tubs de *B. anthracis* sembrats la vigília, el pes dels quals és de 488 mil·ligrams, emulsionats en 20 cc d'aigua salada addicionada de 1 cc d'extracte, es presenta, a l'examen microscòpic, sensiblement modificat al cap de una o dues hores; en un gran nombre de filaments hom constata les darreres fases de la fusió, els espais que separen els bacils els uns dels altres són més amples i molts d'entre ells són lliures, amb Gram positiu o negatiu segons l'estat de la vacuolització. Entre dues i tres hores, aquests fenòmens s'accentuen i, entre tres i quatre, llur desaparició és gairebé completa. Si l'emulsió es fa bullir abans d'afegir-hi l'extracte, sembla que els bacils resistixin quelcom més l'acció diastàsica, però l'atac es produeix, enc que

una mica més retardat, amb la mateixa energia i si l'emulsió és perllongada durant trenta minuts l'acció esmentada es facilita. Els bacils, tractats prèviament amb cloroform, es fonen amb una rapidesa prodigiosa.

Els extractes pancreàtics ataquen un gran nombre d'espècies saprofites o patògenes, bé siguin assajades en conreu pur, bé mesclades les unes a les altres; determinen també la transformació globular del vibrí colèric, del qual digereixen, en trenta minuts, deu mil·ligrams de conreu. Contràriament, el bacil típic és atacat amb molta lentitud.

*Extractes de fetge i de ronyó.*—Per tal d'elimi-

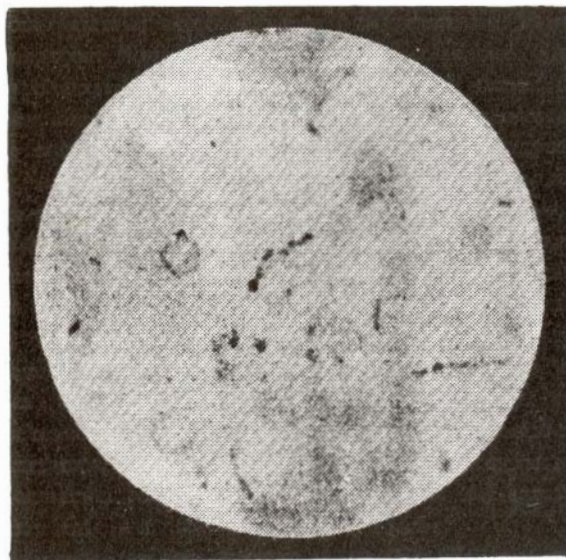


Fig. 5. Acció de l'extracte de substància nerviosa al cap de tres hores

quelcom inferior a la de l'extracte de carn. Ataca el vibrí colèric sense inflar-lo esfèricament, com fa l'extracte pancreàtic. El bacil típic es mostra molt sensible a l'acció de l'extracte hepàtic. De tots els extractes que jo he assajat, en cap no he pogut observar una acció tan decisiva i ràpida com la que aquest extracte exerceix sobre el bacil típic.

Nosaltres obtenim l'extracte renal del pols elaborat, únicament, amb la substància cortical. La seva acció amilolítica és molt feble: 1 cc de glicogen en solució a 1 % no és hidrolitzat, i encara sols parcialment, fins al cap de 24 hores. L'acció bacteriolítica sobre el *B. anthracis* és comparable a la de l'extracte hepàtic; el mateix pot dir-se també de l'acció lí-

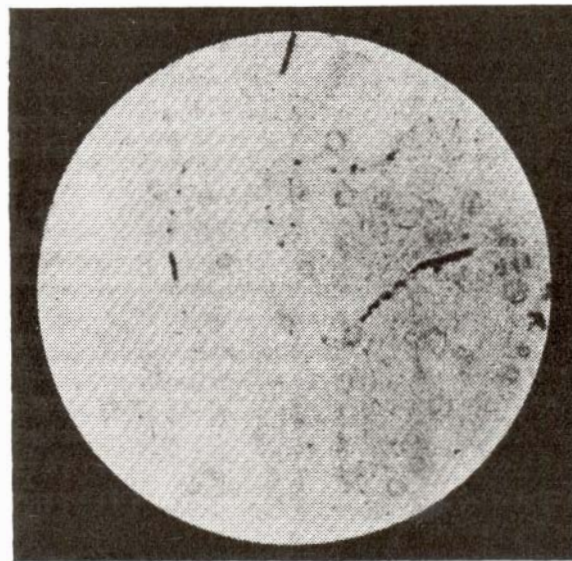


Fig. 6. Acció de l'extracte de substància nerviosa al cap de quatre hores

útila, deshidratada per l'acetona i assecada al buit, proporciona un pols la maceració del qual en l'aigua salada dóna un extracte molt actiu contra el *B. anthracis*. L'addició de cloroform no afavoreix l'acció dels ferments, fet que es pot explicar, potser, per l'acció del iode que conté la glàndula. Hom sap, en efecte, que les preparacions de iode afavoreixen la saturació dels àcids grassos, com han demostrat JOHLING i PETERSEN. L'energia bacteriolítica manifestada pel suc tiroidià obtingut a la premsa, molt superior a la d'altres maceracions, potser és deguda a aquesta causa.

*Extractes de fetge i de ronyó.*—Per tal de eliminar totes les causes d'error en els extractes de teixit hepàtic, per les que s'atribueixen al fetge ferments que potser són d'origen hemàtic, hem sotmes l'esmentat teixit hepàtic a un rentat per un corrent d'aigua (CL. BERNARD). Després de reduït a pols i obtingut l'extracte, el ferment amilolític hidrolitza un centígram de glicogen en 24 hores. L'energia amb què ataca la unitat de pes de *B. anthracis* és

tica exercida per aquest darrer extracte sobre el vibrí colèric.

En els nostres primers treballs (quan era encara en peu la qüestió de saber si les bacteries injectades dins els parenquimes eren o no fixades, com esdevé a les que són englobades pel leucocit), nosaltres poderem demostrar com la glàndula renal *in vivo* era l'únic teixit que permetia, per al vibrí colèric, una manifestació clara i ostensible. Veus ací el dispositiu de l'experiència, imaginat pel meu col·laborador PI SUNYER: després de posar al descobert un dels ronyons del gos, s'introdueix pel seu ureter un llarg tub de vidre, pel qual s'escola l'orina. En aquestes condicions, hom injecta molt suaument sota la càpsula una emulsió espessa de virus. El primer efecte d'aquesta emulsió és d'aturar la secreció urinària; al cap de tres o cinc minuts, de vegades menys, l'orina recomença a caure de gota en gota per l'extrem del tub. Aquestes gotes són recollides sobre un porta-objecte i examinades directament al microscopi, on s'observa que els bacils s'inflen en forma esferoidal

i desapareixen transformant-se en una substància d'aspecte mucós. L'extracte no ataca el bacil amb aquesta energia i rapidesa, ni determina la seva transformació globular, com si, per la seva més gran difusibilitat, penetrés el bloc bacilar vacuolitzant-lo totalment, mentre que els ferments del ronyó semblen inflar successivament les capes exteriors al punt central rodó i colorable, que fineix, igualment, per dissoldre's.

*Altres extractes de ferments cel·lulars.*—Ultra els esmentats precedentment, nosaltres hem obtingut extractes de ganglis limfàtics, de rasclatge de la mucosa intestinal, de teixit pulmonar, de testicles, d'ovaris i de medula d'os. L'ur potència bacteriolítica sobre el *B. anthracis* i els altres gèrmens, més o menys gran segons l'òrgan del qual provenen, és general, com ho és també la presència de la diastasa que hidrolitza el glicogen.

### *Inactivació dels extractes*

Els extractes que obtenim de la matèria cel·lular prèviament reduïda a pols, comprènent-hi l'extracte pancreàtic que és el més actiu de tots, perden naturalment llur activitat a 40° al cap de dotze hores. Ni l'aire ni la llum semblen ésser la causa d'aquest fenomen, puix, a igualtat de condicions tèrmiques, el mateix s'esdevé en la foscor i en els tubs anaeròbis. Aquesta inactivació es produeix ja al cap de sis hores quan els extractes actuen sobre una emulsió de *B. anthracis*. Per demostrar-ho, n'hi ha prou amb centrifugar-los i assajar l'aigua de decantació amb nous bacils: s'observarà que no són deformats, ni per una acció prolongada. Aquesta segona inactivació, més precoç que la primera, sembla dependre de la fixació, bé sobre les substàncies dissoltes, bé sobre els blocs bacterians encara no dissolts, de les diastases solubles que l'extracte conté. Així, hem observat que al cap de sis hores de contacte entre l'extracte de carn i l'emulsió, la dissolució bacteriana és visible i remarcable i encara que l'extracte sigui inactiu, aquesta dissolució no arriba als seus darrers límits fins al cap de 8 o 9 hores, la qual cosa sembla demostrar que les diastases solubles que han desaparegut de l'aigua salada continuen desenrotllant llurs efectes sobre la matèria bacteriana damunt la qual han estat fixades. El fet següent demostra la justesa d'aquesta interpretació: si es recull el sediment centrifugat i s'evapora en el buit, es mostra novament actiu si se l'emulsiona amb aigua salada, sense que sigui possible de demostrar, dins d'aquesta aigua, la presència de diastases solubles. Cal, doncs, admetre que aquestes diastases, adhe-

rint-se a les substàncies que liquen o hidrolitzen, no es redissolen pas en l'aigua salada, puix que han quedat fixades sobre les esmentades substàncies.

L'ebullició suprimeix l'activitat dels extractes; però quan són sotmesos durant una hora a una temperatura de 55°, aquesta activitat no és sensiblement modificada. És difícil de fixar, experimentalment, l'*optimum* dels nostres extractes. Si llurs diastases es comportessin sobre les emulsions de *B. anthracis* amb la mateixa uniformitat amb què ataquen l'engrut de midó, seria cosa fàcil assenyalar la temperatura més convenient per a la dissolució completa d'una unitat de pes determinat en relació amb la unitat de temps. Hi han, però, raons que menen a creure que els bacils són més o menys resistents a l'acció diastàsica i n'hi han, com ja hem dit, que són refractaris a aquesta acció. La falta d'homogeneïtat en la matèria bacilar fa difícil la fixació d'aquest *optimum*. La temperatura més favorable oscilla, aproximadament, entre 40 i 45°.

Els teixits pulveritzats s'inactiven espontàniament. Sis hores després d'haver estat assecats en el buit, ja no cedeixen a l'aigua salada diastases d'activitat igual. Després d'aquesta pèrdua inicial, llur activitat es conserva sensiblement estacionària durant sis o vuit dies. Al desè dia l'inactivació s'accentua notablement; els extractes que amb ells s'obtenen són molt febles però poden reactivar-se mitjançant l'addició d'extracte fresc. Després d'això ja no es possible reactivar-los i resten del tot inertes. Convé conservar-los a baixa temperatura en una atmosfera seca.

## II

### NATURALESA DELS FERMENTS BACTERIOLÍTIQS

Després del descobriment, en els leucocits primer i en els humors més tard, dels ferments que ataquen les bactèries, és corrent creure que la teoria que llavors es formulà i que continua admetent-se, és idèntica a la teoria general dels ferments donada per la química biològica. A primer cop d'ull, sembla que la liquèfacció de la fibrina o de l'albumina coagulada sota l'acció d'una proteòlisi o la dissolució del bloc bacterià sota l'acció de determinades energies zimòtiques, són fenòmens del mateix gènere. Aquesta identitat és més aparent que real. Per demostrar-ho n'hi ha prou amb recordar, encara que breument, la concepció que la teoria humoral i la teoria fagocitària formularen sobre els ferments que

ataquen les bactèries i la concepció que tenen els fisiòlegs dels ferments en general, la qual qüestió cal precisar curosament, per tal d'evitar confusions ulteriors.

Quan METCHNIKOFF descobrí 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 protozoaris i metazoaris enfront les partícules alimentàries empresonades. Creient que la naturalesa havia donat aquests elements cel·lulars d'enzimes apropiades per a la digestió de les bactèries, ni un moment dubtà que estaven destinats a aquest objecte i que, per consegüent, aquestes enzimes es diferenciaven de les altres, en el fet que solament atacaven les bactèries i, en canvi, romanien inactives davant de qualsevol altra substància de naturalesa no bacteriana.

Quan, poc temps després d'aquests treballs, es descobriren propietats bacteriolítiques anàlogues en l'humor sanguini, s'atribuí aquest fet a una substància protectora, potser isolable, que BUCHNER, per aquesta mateixa raó, denominà *alexina*. Es creia també que la seva acció zimòtica s'exercia solament sobre les bactèries. Al principi, no es prejutjà pas l'origen d'aquesta substància: hom la suposava simplement formada dins la sang. METCHNIKOFF l'atribuí a la fagòlisi dels leucocits. En condicions fisiològiques, aquesta fagòlisi fóra nul·la o gairebé nul·la, puix la defensa de l'organisme fóra confiada, preferentment, a l'activitat fagocitària; *post mortem* seria molt activa i d'ací l'acreixement de la potència bacteriolítica en el sèrum. Acoplats els fenòmens d'aquesta guisa, les bacteriolisis intracel·lulars i humorals s'explicarien per una mateixa causa: les energies que ataquen les bactèries englobades pels leucocits, les atacarien dins els humors, quan, per un accident cel·lular qualsevol, s'hi haurien difós. Aquest ferment lliure, METCHNIKOFF l'anomena *citasa*. BUCHNER no creia pas que, en els humors, l'alexina fos adventícia o purament accidental, sinó constant, i l'atribuí a una exsudació o secreció leucocitària que la llençava en el medi ambient. Per la seva banda EHRLICH li atribuï un origen pluricel·lular, per a la qual cosa imaginava, en les cadenes laterals, un grup zimogen destinat a elaborar-la o elaborar-les, si hom suposa que són múltiples, puix que no s'ha pogut demostrar que a aquesta pluralitat d'origen cel·lular li correspongui, dins els humors, una pluralitat d'alexines.

Els ferments que ataquen les bactèries en els humors provenen, exclusivament, dels polinuclears hemàtics o de grups zimògens *ad hoc* existents dins els elements cel·lulars, admetent sempre l'existència de ferments especials per

a les bactèries. Totes les teories coincideixen sobre aquest punt i és precisament aquest punt el que hi ha de discutir-se en totes elles. *No existeixen ferments que ataquen les bactèries; el que hi ha, són ferments que ataquen les espècies químiques que les componen i, això, independentment de la individualitat de la qual formen part.* Quan, amb una tècnica admirable, s'ha observat i demostrat la digestió intracel·lular de les bactèries, no s'ha observat que aquests éssers eren complexos químics, cada component dels quals havia d'ésser atacat per una reacció zimòtica adequada a la seva naturalesa; contràriament, s'ha vist en el fenomen la senzilla destrucció d'éssers extraordinàriament perillósos i, sota l'obsessió de la idea de defensa, no s'ha dubtat a creure que la naturalesa, per tal de preservar l'organisme contra contra llur atac, havia dotat les cèl·lules de ferments especials contra les bactèries. L'immunòleg en lloc de cenyir-se a observar què ataquen les enzimes leucocitàries dins de les bactèries i com ho ataquen, procedint, per exemple, com el fisiòleg davant la digestió gàstrica, s'ha preguntat *perquè les ataquen i, d'aquesta guisa, ha arribat a plantejar-se, filosòficament, un problema de naturalesa experimental.* Si hom posa el problema sobre el seu veritable terreny, hom no pot establir cap diferència entre la forma d'atac dels ferments leucocitaris sobre certes substàncies i llur forma d'atac sobre les espècies químiques que componen les bactèries. Es sap que els extractes leucocitaris ataquen la peptona, liquiden la clara d'ou coagulada, la gelatina, la fibrina, la caseïna, que hidrolitzen el glicogen, que en presència de la margarina i de l'estearina formen àcids grassos. Atenent que no és possible de dissociar la naturalesa d'aquestes accions de la naturalesa química de les substàncies sobre les quals elles desenrotllen llurs efectes, s'ha donat a les unes el nom de *proteolítiques*, a les altres el d'*amilolítiques* i a les altres el de *lipolítiques*. Amb les bactèries englobades, esdevé exactament el mateix. En presència del *B. amilobacter*, solament és per una acció amilolítica que hom s'explica la liquèfacció del seu 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 de la grassa del *B. tuberculós*. No tenim necessitat de la intervenció de *ferments providencials* per explicar les modificacions que poden experimentar en la massa leucocitària els gèrmens empresonats; n'hi ha prou que la presència d'aquesta matèria estranya provoqui en la matèria vivent reaccions



zimòtiques apropiades a la seva naturalesa química. Així, nosaltres entenem que, de la mateixa manera que és atacat el bloc fagocitat, ho foren els seus components si ens fos factible de dissociar-los. Aquests components serien també atacats, dins el bloc inerte que hauríem format amb ells, si ens fos possible d'obtenir-los per síntesi.

El què diem dels ferments leucocitaris és aplicable també als dels plasmes circulants. Se sap que en aquests plasmes existeixen potents energies que descomponen la matèria alimentícia entrada per via parenteral. Com sigui que les bacteries, per la llur composició, no difereixen de les altres matèries orgàniques, les espècies químiques que les componen són atacades pels grups similars dels altres aliments. És cert que en l'estat actual dels nostres coneixements, sabem molt poc o res del què esdevenen aquests components una vegada reduïts a matèria soluble, com ho sabem pels altres grups químicament definits, la desintegració dels quals és estudiada en sèrie (glucòsids, sacàrids, polipèptids, etc...). Precisament perquè nosaltres ignorem la naturalesa química d'aquests components dins les espècies que nominalment diferenciem, no sabem si la proteòlisi de llurs matèries proteïques és més o menys completa en els uns que en els altres i si n'hi han que no són atacats; no sabem tampoc el mecanisme de la desintegració de llurs hidrats de carboni i de la de llurs grasses; la sola cosa que observem positivament és que els blocs bacterians es dissolen en el si de l'humor sanguini fins a desaparèixer, i, encara que ignorem com són atacats llurs principis components, no tenim el més petit dubte de què passen per fases anàlogues a la de tota matèria alimentícia en el curs dels canvis que experimenta. Si enfoquem la qüestió des del punt de vista en què els progressos de la química biològica ens han situat, la hipòtesi de l'*alexina* s'esvaeix. Mentre el fenomen era conegut isoladament, era natural atribuir la dissolució de les bacteries a ferments especials; però si la bacteriòlisi forma part d'un procés digestiu més general, és evident que aquesta hipòtesi ja no té raó d'existir.

La qüestió que acabem d'examinar, de la naturalesa dels ferments que ataquen la matèria bacteriana, està relacionada íntimament amb el problema de l'anabolia d'aquesta matèria i la formació dels anticossos dins l'organisme vacunat. EHRLICH, qui fou el primer a considerar l'antigen bacterià com una matèria alimentícia, suposà que una vegada reduït, per

*l'alexina o complement*, en matèria soluble, estava en condició d'ésser fixat pels receptors, puix que ell el creia directament anabolitzable. Com sigui que ell no podia concebre'l així separat del seu element tòxic, una necessitat més lògica que objectiva el menà a distingir, dintre la molècula alimentària, el grup *toxofor* del grup *haptofor*. Mentre que la fixació del primer determinava la caiguda o desprendiment dels receptors, llur regeneració consecutiva i llur multiplicació ulterior, el segon podia ésser fixat impunement, car era inofensiu.

La tesi d'EHRLICH sobre aquest punt és tan inadmissible com la de *l'alexina*. La molècula estranya, sigui o no tòxica, no pot tenir afinitats amb la matèria vivent sense que aquestes afinitats donin lloc a la neoformació de productes que alteren la composició de la mentada molècula, puix que aquesta, pel fet d'ésser estranya, no pot, de cap de les maneres, 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 de la vida de l'espècie, encara que es renovi amb materials que són, en llur origen, de composició diversa i variada. Per tal que aquestes unitats molt complexes es puguin conservar indefinidament, és indispensable que, sota l'acció dels ferments, la matèria alimentària amb la qual han de renovar les seves 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 prèvia i la reconstrucció ulterior, han estat comparades a l'edifici que s'aixeca segons un plan arquitectònic determinat amb les desferres d'altres edificis caiguts en runes.

Si la nutrició s'efectua en aquestes condicions, és evident que la tesi d'EHRLICH és insostenible. No n'hi ha pas prou que la matèria bacteriana hagi estat reduïda a l'estat soluble, perquè hom la pugui considerar anabolitzable, determinant en el si de la matèria vivent aquestes reaccions pròpies de la immunitat adquirida que coneixem sota el nom d'*aglutinines*, *opsonines*, *antitoxines*, *lisines*, etc...; és absolutament indispensable que l'antigen hagi passat per una demolició digestiva prèvia, de la mateixa naturalesa que la que sofreix qualsevol espècie de matèria alimentària. En una època relativament recent hom no tenia pas de la digestió de la matèria heteròloga la concepció que en tenim actualment. Llavors, es creia que els productes de l'absorció intestinal depurats pel fetge, propor-

cionaven directament als elements cel·lulars els principis amb els quals podien refer llurs pèrdues; era així que es creia que un clisteri de peptona, per exemple, era nutritiu. La líquefacció dels productes estranys entrats per via parenteral (la seda o el catgut amb els quals es fan les sutures quirúrgiques) bastava, es creia, perquè la reabsorció els convertís, enfront dels teixits, en materials assimilables. Després d'alguns anys, hom ha vist que els mecanismes fisiològics que preparen la matèria alimentària per a una incorporació possible, són molt més complexes del què es suposava. Les cèl·lules conserven indefinidament llur unitat de composició, a condició que elles restin inacessibles a la irrupció de la matèria exterior: els canvis que en resultarien els serien nocius. Els antígens bacterians no són pas una excepció a la llei comuna. Fisiològicament, no es concebeix llur anabolia sense una destrucció prèvia. Suposar que aquesta destrucció és realitzada per ferments especials encarregats d'atacar les bacteries per tal de defensar l'organisme contra la infecció, *equivale a suposar que aquests ferments distingeixen els cossos dels quals formen part les espècies antigèniques* i això és metafísica abstrusa. Els ferments són mecànicament apropiats a les substàncies que ataquen; es fixen sobre d'elles i sobre d'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 dels cossos que nosaltres anomenem bacteries, el cert és que elles són atacades de la mateixa manera que si no en formessin part, d'on resulta que els ferments bacteriolítics, en el sentit estricte del mot, si és cert que no n'hi han que ataquin les bacteries i si solament les substàncies químiques que les componen, són una pura ficció. Naturalment, l'organisme no es defensa pas en realitat contra les bacteries, com es creu, sinó que es defensa contra la matèria estranya que amb elles li és importada, per procediments idèntics en el fons, si bé de mecanisme més complexe, als que empra enfront de la sacarosa i del midó que hom li injecta; la invertasa o l'amilasa, gràcies a les quals ataca aquests productes, són de la mateixa natura que la suma de les reaccions per les quals ataca els components del bloc bacterià. És sols així que l'organisme pot utilitzar la matèria alimentària que rep i que es constitueixen les reaccions pròpies de la immunitat adquirida. Gràcies a elles l'orga-

nisme s'oposa, amb més energia, a les agressions de l'antigen i veu augmentar les propietats digestives que sobre ell tenia. La immunitat natural esdevé, d'aquesta guisa, la condició que ha de precedir la creació possible de la immunitat adquirida. Una bactèria que no pot ésser atacada pels ferments del medi intern és una bactèria contra la qual l'organisme no té defensa; si és difícilment digerida pels esmentats ferments, ben difícilment també ella vacunarà. El cas invers s'esdevindrà si l'antigen és fàcilment digestible. Tot depèn, com es veu, d'una banda, de les energies zimològiques de què disposa l'organisme i, d'una altra, de la naturalesa química de l'antigen.

Així concebudes, les defenses orgàniques són els resultats dels mecanismes fisiològics que preparen la matèria bacteriana per a la seva anabolia (immunitat natural) i donen lloc, consecutivament, a la formació dels anticossos immunitzants (immunitat adquirida). Considerant-les com al producte de *ferments bacteriolítics especials*, es suposa que l'organisme n'ha estat dotat amb *la finalitat i la intenció* de poder lluitar contra l'accés dels gèrmens o contra llurs productes solubles, en el qual cas ens fem de les defenses una concepció antropomòrfica.

Nosaltres teníem necessitat d'aclarir i de definir el concepte de ferment bacteriolític, i és per això que hem procedit a la seva revisió. Per a molts, aquestes explicacions seran ocioses. El fet d'estudiar, per exemple, l'acció de la tripsina sobre certes bacteries mostra que no es preocupen dels *ferments especials*. Aquesta preocupació és, per tant, molt generalitzada. Jo m'he pogut convèncer, personalment, que en els extractes cel·lulars que hem estudiat en la primera part d'aquest treball, ultra la existència de ferments amilolítics, proteolítics, etc..., es constata la presència de ferments bacteriolítics, si es fa l'assaig sobre bacteries, sota la pressió d'un prejudici tradicional. És fora de dubte que l'estudi de la bacteriolisi, *in vitro* o *in vivo*, sota l'acció dels ferments que la determinen, ofereix un gran interès pràctic. Estudiats des d'aquest punt de vista, no hi ha pas cap inconvenient a considerar-los com a bacteriolítics, a condició sempre de remarcar que ataquen la matèria bacteriana perquè aquesta és alimentària; si no fos així, caldria considerar-los com una funció apart de la digestió general d'aquesta matèria. Aquesta és la causa que ens ha menat a fer la revisió d'una concepció actualment molt vaga i molt fosca.